

Aus der Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Analyse der Promotorregion des LIM-Proteins Lmcd1/Dyxin von Rattus norvegicus

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Florian Eilers
aus Berlin

Kiel (2020)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Derk Frank, Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thorsten Feldkamp, Klinikum Hann.
Münden, Nephrologisches Zentrum Niedersachsen

Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2021

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.05.2021

Gez.: Priv.-Doz. Dr. med. Martina-Elisabeth Spehlmann, Klinik für Innere
Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis..... vi

1 Einleitung 1

1.1 Klassisches Modell der Transkription in Eukaryonten 1

1.1.1 Die basale Transkriptionsmaschinerie 2

1.1.1.1 RNA Polymerase II 2

1.1.1.2 Basale Transkriptionsfaktoren..... 4

1.1.1.3 Mediator 8

1.1.1.4 Basale Elongationsfaktoren..... 9

1.1.1.5 Kernpromotorelemente 11

1.1.2 Initiation 15

1.1.3 Elongation..... 17

1.1.3.1 Nucleotide Addition Cycle..... 17

1.1.3.2 Promoter Proximal Pausing 19

1.1.3.3 Backtracking 20

1.1.4 Termination..... 21

1.1.5 Anmerkungen zum klassischen Transkriptionsmodell 21

1.2 Regulation der Transkription 22

1.2.1 Regulatorische Elemente auf Ebene der DNA 22

1.2.1.1 Promotor..... 22

1.2.1.2 Enhancer..... 24

1.2.1.3 Insulator..... 26

1.2.2 Transkriptionsfaktoren..... 26

1.2.2.1 CREB-Familie..... 27

1.2.2.2 MEF2-Familie 29

1.2.2.3 Nuclear Factor 1-Familie 30

1.2.2.4 Nuclear Factor Y 31

1.2.2.5 Sp/KLF-Familie 32

1.2.2.6 Virusprotein 16..... 34

1.2.3 Epigenetische Regulationsmechanismen..... 34

1.2.3.1 DNA Methylierung 34

1.2.3.2 Histonmodifikationen..... 36

1.3 LIM and cysteine-rich domains 1 (Lmcd1) 37

1.4	Fragestellung dieser Arbeit	38
2	Material	39
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	39
2.2	Chemikalien	40
2.3	Puffer.....	42
2.4	Medien	42
2.4.1	C2C12-Zellen	42
2.4.2	NRVCM.....	42
2.5	Kits.....	43
2.6	Enzyme	43
2.7	Vektoren	44
2.8	Primer.....	44
2.8.1	Primer zur Amplifizierung der Lmcd1-Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA.....	44
2.8.2	Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung in pGL4.15.....	45
2.8.3	Primer für die Mutagenese der Transkriptionsfaktorbindestellen	45
2.9	Zelllinien	47
2.10	Software	47
3	Methoden.....	48
3.1	Überblick über die Methodik zur Klonierung der Lmcd1-Promotorfragmente in den pGL4.15-Reportervektor.....	48
3.2	Zellkultur.....	50
3.2.1	Kultivierung von C2C12-Zellen.....	50
3.2.2	Isolation und Kultivierung von ventrikulären Rattenherzmuskelzellen aus neonatalen Ratten	50
3.3	Mikrobiologie	52
3.3.1	Transformation elektrokompenter DH10B E. coli durch Elektroporation	52
3.3.2	Bakterienanzucht in Flüssigkulturen	53
3.3.3	Bakterienanzucht auf Selektivnährböden	53
3.3.3.1	Herstellung von Selektivnährböden	54
3.3.4	Anlage von Glycerolstocks.....	54
3.4	Molekularbiologie.....	54
3.4.1	Extraktion genomischer DNA aus Rattengewebe	54

3.4.2	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	55
3.4.2.1	Extraktion von Plasmid-DNA in geringem Umfang (Mini-Präparation).....	55
3.4.2.2	Extraktion von Plasmid-DNA in mittlerem Umfang (Midi-Präparation)	56
3.4.2.3	Extraktion von Plasmid-DNA in großem Umfang (Maxi-Präparation).....	56
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	57
3.4.4	PCR.....	58
3.4.4.1	Amplifizierung der Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA	58
3.4.4.2	PCR zur Selektion klonierter oder mutierter Bakterienklone (Kolonie-PCR).....	59
3.4.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	59
3.4.6	Restriktionsverdau der Promotorkonstrukte und von pGL4.15	60
3.4.7	Agarose-Gelelektrophorese	61
3.4.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	61
3.4.9	Ligation.....	62
3.4.10	Sequenzierung	62
3.4.11	Transfektion von Plasmid-DNA mit Lipofectamine	63
3.4.11.1	C2C12-Zellen.....	63
3.4.11.2	Neonatale ventrikuläre Rattenherzmuskelzellen.....	64
3.4.12	Luciferase-Assay	66
3.4.13	Bestimmung der Proteinkonzentration	67
3.4.14	Mutagenese möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen.....	69
3.5	Computergestützte Promotoranalyse	70
3.5.1	Extraktion der Promotorsequenz	70
3.5.2	Identifikation von cis-regulatorischen Elementen im proximalen Promotor	71
3.5.3	Identifikation von Kernpromotorelementen	71
3.5.4	Identifikation von CpG-Inseln.....	72
3.6	Statistische Auswertung	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Computergestützte Suche nach Kernpromotorelementen.....	73
4.1.1	Mutation einer putativen TATA-Box	74
4.2	Basale Aktivität des Lmcd1-Promotors	75
4.2.1	Bindestellen für CREB, NF-Y und Sp1 sind essentiell für die basale Aktivität des Lmcd1-Promotors	76

4.2.1.1	In C2C12-Zellen.....	78
4.2.1.2	In neonatelen ventrikulären Rattenherzmuskelzellen	80
4.3	Der Lmcd1-Promotor enthält zwei hochkonservierte MEF2-Bindestellen	82
4.3.1	Überexpression von MEF2C-VP16 führt zu einer Aktivierung des Lmcd1-Promotors in C2C12-Zellen	83
4.3.2	Mutation der MEF2-Bindestellen führt zu reduzierter Promotoraktivierung durch Überexpression von MEF2C-VP16.....	84
4.4	Behandlung der Zellen mit Phenylephrin führt zur Aktivierung des Lmcd1-Promotors in NRVCN	85
4.4.1	Die Phenylephrin-abhängige Promotoraktivierung in NRVCN ist unabhängig von MEF2-Bindestellen.....	86
4.5	Aktivierung des untersuchten Promotorfragments durch biaxiale Dehnung ist fraglich	86
4.5.1	Mutation der MEF2-Bindestellen hat keinen Einfluss auf die Stretch-abhängige Aktivität des Lmcd1-Promotors	87
5	Diskussion.....	88
5.1	Generelle methodische Einschränkungen	88
5.1.1	Unterschiede zwischen in vitro Modell und Bedingungen in vivo	88
5.1.1.1	Chromatinstruktur	88
5.1.1.2	Methylierung	88
5.1.1.3	Genomischer Kontext.....	89
5.1.2	Unterschiedliche Größe der verwendeten Plasmide.....	89
5.2	Kernpromotor.....	90
5.3	Basale Aktivität des Lmcd1-Promotors	92
5.4	Funktion der MEF2-Bindestellen	93
5.4.1	Unterschiede zwischen MEF2C und MEF2C-VP16.....	94
5.4.2	Kein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die basale Promotoraktivität	94
5.4.3	PE-induzierte Promotoraktivierung von Lmcd1	95
5.4.3.1	Kein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die PE-induzierte Promotoraktivierung von Lmcd1	96
5.4.4	Kein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die Stretch-induzierte Aktivierung des Lmcd1-Promotors	97
6	Zusammenfassung	99

7	Literaturverzeichnis	100
8	Anhang.....	134
8.1	IUPAC Nomenklatur für Nukleinsäuren.....	134
9	Eigene Veröffentlichung	135
10	Danksagung.....	136

II. Abkürzungsverzeichnis

5'-UTR	5'-Untranslated Region
5mC	5-Methylcytosin
Akt/PKB	Proteinkinase B
AP-1	Transkriptionsfaktor AP-1 (auch: Activator Protein 1)
ATF-1	Activating Transcription Factor 1
BRCA1	Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
Brd4	Bromodomain-containing Protein 4
BRE	TFIIB Recognition Element
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CAK	CDK-activating Kinase
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase
CBP	CREB-binding Protein
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CGI	CpG-Insel
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP-response Element-binding Protein
CREM	cAMP-response Element Modulator
CRTC	CREB-regulated Transcription Coactivator
CtBP	C-terminal-binding Protein
CTCF	CCCTC-bindender Faktor
CTD	C-terminale Domäne
dam	DNA Adenin-Methyltransferase
DCE	Downstream Core Element
dcm	DNA Cytosin-Methyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPE	Downstream Promoter Element
DRB	5,6-Dichloro-1-β-d-Ribofuranosylbenzimidazol
DSIF	DRB Sensitivity-inducing Factor
ERK-1	Extracellular Signal-regulated Kinase 1 (auch: Mitogen-activated Protein Kinase 3)
ERK-2	Extracellular Signal-regulated Kinase 2 (auch: Mitogen-activated Protein Kinase 1)
ERK-5	Extracellular Signal-regulated Kinase 5 (auch: Mitogen-activated Protein Kinase 7)
eRNA	enhancer-templated noncoding RNA
Gfi-1b	Growth Factor Independent Protein 1b
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC1	Histondeacetylase 1
HDAC4	Histondeacetylase 4
HDAC5	Histondeacetylase 5
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KID	Kinase-induzierbare Domäne
KLF1-17	Krüppel-like Factor 1-17
Lmcd1	LIM and cysteine-rich domains 1
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein Kinase
Mot1	Modifier of Transcription 1
mRNA	messenger RNA
MTE	Motif Ten Element
MyoD	Myoblast Determination Protein 1

NAC	Nucleotide Addition Cycle
ncRNA	non-coding RNA
NDR	Nucleosome Depleted Region
NELF	Negative Elongation Factor
NF1	Nuclear Factor 1
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-Y	Nuclear Factor Y
NF-YA	Nuclear Factor Y Untereinheit A
NF-YB	Nuclear Factor Y Untereinheit B
NF-YC	Nuclear Factor Y Untereinheit C
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NRVCM	Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes
NTP	Nukleosidtriphosphat
p300	Histon Acetyltransferase p300
p38	Mitogen-activated Protein Kinase p38
Pax-2	Paired Box Protein Pax-2
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phenylephrin
PKA	Proteinkinase A
PP1	Proteinphosphatase 1
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
RNA	Ribonukleinsäure
Rpb1-12	RNA Polymerase Untereinheit 1-12
rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
snRNA	Small Nuclear RNA
Sp1	Transkriptionsfaktor Sp1 (auch: Specificity Protein 1)
TAD	Topologisch assoziierende Domäne
TAF1-14	TBP assoziierter Faktor 1-14 (auch: TFIID-Untereinheit 1-14)
TAND	TAF N-terminal Domain
TCT	Polypyrimidin Initiator
TFIIA	Basaler Transkriptionsfaktor IIA (auch: allgemeiner Transkriptionsfaktor IIA)
TFIIB	basaler Transkriptionsfaktor IIB (auch: allgemeiner Transkriptionsfaktor IIB)
TFIIBc	B-Core-Domäne von TFIIB
TFIID	Basaler Transkriptionsfaktor IID (auch: allgemeiner Transkriptionsfaktor IID)
TFIIE	Basaler Transkriptionsfaktor IIE (auch: allgemeiner Transkriptionsfaktor IIE)
TFIIF	Basaler Transkriptionsfaktor IIF (auch: allgemeiner Transkriptionsfaktor IIF)
TFIIH	Basaler Transkriptionsfaktor IIH (auch: allgemeiner Transkriptionsfaktor IIH)
TFIIS	Basaler Elongationsfaktor IIS
tRNA	transfer RNA
TSS	Transcription Start Site, Transkriptionsstart
TTF2	Transcription Termination Factor 2

VP16	Virusprotein 16
XCPE1	X Core Promotor Element 1
XPB	Xeroderma pigmentosum group B-complementing Protein
XPB	Xeroderma pigmentosum group B-complementing Protein
XPD	Xeroderma pigmentosum group D-complementing Protein
Xrn2	5'-3' Exoribonuklease 2

1 Einleitung

Zum besseren Verständnis werden der thematischen Einführung noch einige Hinweise vorangestellt: Die Vielzahl der in dieser Arbeit verwendeten eventuell unbekannten Akronyme und Abkürzungen können schnell für Verwirrung sorgen. Dennoch werden viele davon, insbesondere solche von Enzymen und Transkriptionsfaktoren, im laufenden Text ohne vorherige Nennung des kompletten Namens verwendet. Zum einen, weil die Nennung der kompletten Namen nicht üblich und zum anderen für das Verständnis der Funktion häufig nur bedingt hilfreich ist. Bei Bedarf kann der vollständige Name allerdings im Abkürzungsverzeichnis nachgeschlagen werden.

Desweiteren werden an einigen Stellen Sequenzen von DNA-Motiven aufgeführt. Die Basenbezeichnung folgt der Nomenklatur für Nukleinsäuren der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), die im Anhang in Tabelle 12 wiedergeben ist.

1.1 Klassisches Modell der Transkription in Eukaryonten

Unter Transkription versteht man in der Biologie die Synthese von RNA anhand einer DNA-Vorlage. Diese wird von RNA Polymerasen durchgeführt, von denen in Eukaryonten drei bis sechs verschiedene Formen vorhanden sind [1]: die RNA Polymerasen I, II und III kommen in allen eukaryontischen Organismen vor und sind zuständig für die Transkription von genomischer DNA im Zellkern [2]. Pflanzen kodieren noch die zwei weiteren nukleären RNA Polymerasen IV und V [3], während das Genom von Organismen, die Mitochondrien enthalten, außerdem für eine mitochondriale RNA Polymerase kodiert, die der Transkription der mitochondrialen DNA innerhalb der Mitochondrien dient [4].

Auch die RNA Polymerasen I, II und III nehmen unterschiedliche Aufgaben wahr: die RNA Polymerasen I und III synthetisieren ausschließlich nicht-kodierende RNA-Moleküle, also RNA, die im weiteren Verlauf nicht in Proteine translatiert wird, wie zum Beispiel ribosomale RNA (rRNA) und transfer RNA (tRNA) [2]. Neben einigen nicht-kodierenden Transkripten wie der small nuclear RNA (snRNA) produziert die RNA Polymerase II über die Transkription sämtlicher kodierender Genabschnitte die messenger RNA (mRNA), die im weiteren Verlauf der Proteinbiosynthese als Vorlage für die Translation dient [2]. Da sich diese Arbeit mit der Analyse der Promotorregion eines kodierenden Genabschnittes befasst, wird im Folgenden nur auf die Transkription durch die RNA Polymerase II näher eingegangen, die sich in die Abschnitte Initiation, Elongation und Termination unterteilen lässt. Der nachfolgend vorgestellte Ablauf wurde dabei lange Zeit als universell betrachtet, erfährt aber zunehmend

Veränderung.

1.1.1 Die basale Transkriptionsmaschinerie

In diesem Abschnitt werden diejenigen Moleküle und DNA-Motive vorgestellt, denen eine mehr oder weniger universelle Notwendigkeit beim Ablauf der Transkription kodierender Genabschnitte zugesprochen wird. Dazu gehört neben der RNA Polymerase II und den basalen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, B, D E, F und H) auch der Mediatorkomplex. Zusätzlich werden in diesem Abschnitt die prominentesten DNA-Motive des Kernpromotors sowie einige basale Faktoren der Elongation (TFIIS, DSIF, NELF und P-TEFb) besprochen.

Wie oben bereits angedeutet, handelt es sich bei der Transkription aber entgegen ursprünglicher Annahmen gerade nicht um einen immer gleich ablaufenden Vorgang. Während einigen der hier besprochenen Elemente, wie beispielsweise der RNA Polymerase II oder der TBP-Untereinheit von TFIID, weiterhin eine für jedes Transkriptionsereignis notwendige Funktion attestiert wird, scheinen viele der anderen zumindest theoretisch entbehrlich zu sein. Dennoch sind auch diese vermutlich an der Mehrheit der Transkriptionsvorgänge beteiligt, allerdings eher in modulatorischer Funktion, weswegen heutzutage anstatt von „allgemeinen Transkriptionsfaktoren“ besser von „basalen Transkriptionsfaktoren“ gesprochen wird.

1.1.1.1 RNA Polymerase II

Die distinkte Existenz der RNA Polymerase II wurde erstmals Ende der 60er Jahre beschrieben [1]. Diese ist innerhalb des Zellkerns, im Gegensatz zur RNA Polymerase I, die vor allem in den Nucleoli vorkommt, hauptsächlich im Karyoplasma lokalisiert [5] und ist anders als die beiden anderen RNA Polymerasen durch das Pilzgift α -Amanitin hemmbar [6]. Sie besteht aus den 12 verschiedenen Untereinheiten Rpb1 – Rpb12 [7–9]. Rpb1 und Rpb2, zwischen denen ein Spalt existiert („cleft“) durch den die DNA eintritt, bilden dabei am Ende des Spaltes das katalytische Zentrum, welches zwei Mg^{2+} -Ionen enthält [10]. Sie werden durch einen Subkomplex aus Rpb3 und Rpb10-12 stabilisiert [10,11]. Desweiteren bilden Rpb1 und Rpb2 zusammen mit Rpb6 eine bewegliche Klemme („clamp“), die die Begrenzung auf einer Seite des Spaltes darstellt und vermutlich der Fixierung des kodogenen Stranges innerhalb des Spaltes dient [10–12]. Diese Klemme wird durch einen Keil aus Rpb4 und Rpb7 in seiner geschlossenen, die DNA fixierenden, Position gehalten [13,14]. Die weitere Begrenzung des Spaltes erfolgt durch eine sogenannte „jaw-lobe-region“, die von Rpb1, 2 und 9 gebildet wird [10]. Hinter dem aktiven Zentrum ist der Spalt durch eine Wand („wall“) begrenzt. Initial wurde postuliert, dass die Klemme während der Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIC) zunächst eine geöffnete Konformation annimmt, so dass die DNA als Doppelstrang in den Spalt

eintreten kann [11]. Dies wird mittlerweile als unwahrscheinlich erachtet, da hierfür eine Dissoziation von Rpb4/Rpb7 notwendig wäre, von der unklar ist, ob sie *in vivo* vorkommt [13]. Stattdessen wird postuliert, dass es zunächst zu einer Bindung des DNA-Doppelstranges oberhalb des Spaltes kommt [15] und der kodogene Strang nach dem Schmelzen der DNA in den Spalt und zum aktiven Zentrum abgesenkt wird [13,16]. Unterhalb des aktiven Zentrums befindet sich eine nach außen gerichtete trichterförmige Öffnung, durch die die zur RNA-Synthese notwendigen Nukleosidtriphosphate (NTPs) zum aktiven Zentrum gelangen [10,16]. Bei der Auswahl und Verknüpfung der korrekten NTPs spielt der sogenannte Trigger Loop von Rpb1 [17,18] zusammen mit Rpb9 [19] eine entscheidende Rolle.

Neben der Polymeraseaktivität besitzt das aktive Zentrum auch eine intrinsische Endonukleaseaktivität, die durch TFIIS stimuliert wird und unter anderem im Rahmen des Backtrackings (siehe 1.1.3.3) bei der Spaltung des in Synthese befindlichen RNA-Stranges eine Rolle spielt [20,21].

Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, dass eine Subpopulation der RNA Polymerase II existiert, in der eine als Gdown1 bezeichnete 13. Untereinheit vorkommt [22]. In dieser Form blockiert Gdown1 kompetitiv die Bindung von TFIIF an die RNA Polymerase II und führt dadurch zu einer Inhibition der Transkription [23], die allerdings durch die Bindung des Mediator-Komplexes aufgehoben werden kann [22,23].

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der RNA Polymerase II spielt die C-terminale Domäne (CTD) von Rpb1 [24–26], die in Eukaryonten aus 26 - 52 Wiederholungen der konservierten Aminosäuresequenz YSPTSPS zusammengesetzt ist [27,28]. Diese Heptapeptid-Wiederholungen sind Ort einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung [29,30], O-GlcNAcylierung [31,32] oder Methylierung [33] und an der Modulation sämtlicher Abschnitte der Transkription beteiligt: Zu Beginn der Transkription liegt die RNA Polymerase II in einem unmodifiziertem Zustand im Präinitiationskomplex vor [34], vermutlich weil nur in diesem Zustand eine Bindung des Mediator-Komplexes [35] sowie von TBP [36] möglich ist. Der Übergang von der Initiation zur Elongation geht mit einer Phosphorylierung von Serinresten, vor allem an Ser5 und Ser7 des Heptapeptids, durch TFIIH einher, die zu einer Dissoziation der Polymerase vom Mediator-Komplex führt und den Promotor-Escape ermöglicht [37,38]. Im weiteren Verlauf der Transkription nimmt die Phosphorylierung dieser beiden Serinreste kontinuierlich ab, während diejenige von Ser2 und Thr4 stetig zunimmt und zum Zeitpunkt der Termination ihren Höhepunkt erreicht [25].

1.1.1.2 Basale Transkriptionsfaktoren

1.1.1.2.1 TFIIA

Der basale Transkriptionsfaktor IIA (TFIIA) besteht in Eukaryonten aus zwei bis drei Untereinheiten [39–41] und beeinflusst die Transkription unter anderem über die Stabilisierung der Bindung von TBP und DNA [42,43]: Über eine Steigerung der Affinität von TBP zur DNA entfaltet TFIIA eine stimulatorische Wirkung, vor allem bei starker Abweichung der DNA-Sequenz vom TATA-Box-Konsensusmotiv [44]. TFIIA bindet dabei an die N-terminale Region von TBP [45,46] und kommt stromaufwärts von TBP auf der gegenüberliegenden Seite der DNA von TFIIB zu liegen [15]. Die Frage der Notwendigkeit von TFIIA für die basale Transkription wurde lange Zeit kontrovers diskutiert: während einige Autoren berichteten, dass TFIIA für den Vorgang der basalen Transkription entbehrlich sei [47], wurde TFIIA von anderen eine, wenn auch nicht unbedingt in Bezug auf das gesamte Genom, so doch zumindest für die Transkription einzelner Gene, essentielle Rolle zugesprochen [48,49]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine drastische Reduktion des intrazellulären TFIIA-Spiegels nur moderate Auswirkungen auf die Transkriptionsrate hat [50], so dass TFIIA mittlerweile vor allem eine modulatorische Rolle zugesprochen wird und sogar argumentiert wird, dass es sich bei TFIIA eher um einen Koaktivator als um einen basalen Transkriptionsfaktor handle [41]. Neben der Bindung von TBP sind noch eine Vielzahl weiterer Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere mit bekannten aktivierenden Transkriptionsfaktoren wie AP-1 [51] und Sp1 [52] beschrieben, über die es ebenfalls zu einer Steigerung der Transkriptionsaktivität kommt. Ein weiterer stimulierender Mechanismus liegt in der Blockade der Interaktion von TBP mit Repressoren der Transkription, wie zum Beispiel Mot1 [41,53] oder der TAND-Domäne von TAF1 [54].

1.1.1.2.2 TFIIB

TFIIB ist der einzige basale Transkriptionsfaktor, der als Monomer ohne weitere Untereinheiten vorliegt [9,55], und ist für die Initiation der Transkription absolut essentiell [42,47,56]. Funktionell wurden ursprünglich eine N-terminale Zinkfinger-Domäne, die als B-Ribbon bezeichnet wird, sowie eine C-terminale B-Core-Domäne (TFIIBc) beschrieben [55,57,58]. TFIIBc bindet von unten an den Komplex aus TFIID und DNA und sorgt so für dessen Stabilisierung [44,59]. Dabei nimmt TFIIBc sowohl Kontakt zu den TFIID-Untereinheiten TBP [44,59] und TAF9 [60], als auch zu DNA-Abschnitten up- und downstream der TATA-Box auf [59,61,62], die als TFIIB Recognition Elements bezeichnet werden (BRE, siehe 1.1.1.5.5). Neben der stabilisierenden Wirkung wird für die Bindung von TFIIB an die BREs eine Funktion

bei der Orientierung des entstehenden PICs und der Festlegung der Transkriptionsrichtung angenommen [63]. Für die B-Ribbon-Domäne wurde bereits früh eine direkte Interaktion mit der RNA Polymerase II nachgewiesen, die für deren Rekrutierung in den PIC essentiell ist [57]. B-Ribbon nimmt dabei Kontakt zur Rpb1-Untereinheit der RNA Polymerase II auf [64]. Weiterhin bindet TFIIB an die größere der beiden Untereinheiten von TFIIF [65]. Zusätzlich zu diesen beiden Domänen wurden durch hochauflösende Darstellungen der Kristallstruktur von TFIIB im Komplex mit der RNA Polymerase II zwei weitere funktionelle Bereiche identifiziert, die zwischen der B-Ribbon- und der B-Core-Domäne liegen [64,66,67] und ihre Funktion erst im Anschluss an die Rekrutierung der Polymerase entfalten: Der B-Linker kontaktiert die Klemme der RNA Polymerase II und spielt eine essentielle Rolle bei der Öffnung des Promotors bzw. bei der Stabilisierung der Transkriptionsblase [66,68]. Der B-Reader verläuft durch den Austrittstunnel für den neu synthetisierten RNA-Strang der RNA Polymerase II und nimmt nach der Promotoröffnung Kontakt zum kodogenen Strang im Bereich des aktiven Zentrums auf und trägt so zur Erkennung des Transkriptionsstarts sowie der Stabilisierung des entstehenden DNA-RNA-Hybriden bei [68]. Der B-Reader induziert außerdem eine allosterische Konformationsänderung des aktiven Zentrums der RNA Polymerase II, die zu einer Stimulation der Initiation führt [68].

Bereits 1991 konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Rekrutierung von TFIIB während der Ausbildung des PIC um einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt handelt [69], der durch die Interaktion mit einer Vielzahl von Koaktivatoren, wie z.B. CBP [70] und VP16 [71] moduliert werden kann [55].

1.1.1.2.3 TFIID

TFIID ist ein Proteinkomplex bestehend aus dem TATA-Box Bindeprotein (TBP) und 13-14 TBP assoziierten Faktoren (TAF1-14) [9,72–74] und spielt eine wichtige Rolle bei der Promotorerkennung, um anschließend die Rekrutierung der weiteren allgemeinen Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen. TFIID nimmt eine hufeisenförmige Struktur an, bei der TBP in der zentralen Konkavität lokalisiert ist [75] und daher der Mechanismus einer molekularen Klemme postuliert worden ist, mit der die DNA nach der Bindung fixiert wird [76]. Während man ursprünglich davon ausging, dass diese hauptsächlich über eine Bindung von TBP an die TATA-Box vermittelt wird [77,78], wurden mittlerweile weitere Kernpromotorelemente (siehe 1.1.1.5) identifiziert, die von Untereinheiten von TFIID erkannt werden können: TAF1 und 2 erkennen die Initiatorsequenz [79], TAF6 und 9 vermutlich das Downstream Promoter Element (DPE) [80] und das Motif Ten Element (MTE) [81] während

das Downstream Core Element (DCE) ebenfalls durch TAF1 [82] erkannt wird.

Neben dieser sequenzspezifischen Promotoridentifizierung konnte gezeigt werden, dass TFIID mit Histonen in aktiv transkribiertem Euchromatin interagiert. So bindet TAF1 an acetylierte Lysinreste von Histon H4 in aktiven Promotoren [83] und besitzt selbst die Fähigkeit zur Histonacetylierung [84] mit konsekutiver Steigerung der Transkriptionsrate (vergleiche 1.2.3.2), während TAF3 in der Lage ist an mehrfach methylierte Lysinreste von Histon H3 zu binden [85] und somit zu einer vermehrten Rekrutierung von TFIID an aktiven Promotoren führt.

Weiterhin interagiert TFIID mit einer großen Anzahl von Transkriptionsfaktoren wie Sp1 [86] oder CREB [87,88], die neben der Modulation der Aktivität der bereits versammelten Transkriptionsmaschinerie, eine Rekrutierung von TFIID, insbesondere an TATA-losten Promotoren, überhaupt erst ermöglichen [89]. Dieser Mechanismus zusammen mit der Rekrutierung über die oben erwähnten Histonmodifikationen bietet einen möglichen Weg der PIC-Bildung an Promotoren, die keine Kernpromotorelemente enthalten [74,90].

Einschränkend muss erwähnt werden, dass ein vollständiger TFIID nicht für die Transkription aller Gene notwendig ist: So konnte gezeigt werden, dass TFIID bei der Transkription von ca. 10% des Genoms von *S. cerevisiae* durch den SAGA-Komplex ersetzt wird [91]. Dieser enthält neben einer Vielzahl weiterer Untereinheiten auch einige der TAFs [92] und ist neben der Fähigkeit TBP an den Promotor zu rekrutieren [93] ähnlich wie TFIID in der Lage Histonreste zu acetylieren [94]. Insgesamt ist jedoch davon auszugehen, dass TFIID an der Transkription der meisten eukaryontischen Gene beteiligt ist.

1.1.1.2.4 TFIIIE

TFIIIE besteht aus den Untereinheiten TFIIIE α und TFIIIE β , die entgegen ursprünglicher Annahmen kein Tetramer [95], sondern ein Dimer ausbilden [96]. TFIIIE α interagiert mit der Rpb1-Untereinheit der RNA Polymerase II im Bereich der Klemme [97,98] und rekrutiert TFIIH in den PIC [99,100], während TFIIIE β die DNA im Bereich direkt proximal des Transkriptionsstarts umspannt [98] und eine stimulatorische Wirkung auf die XPB-Untereinheit von TFIIH ausübt [101]. TFIIIE entfaltet so eine essentielle Wirkung beim Übergang vom geschlossenen zum offenen Promotorkomplex durch Rekrutierung von TFIIH (siehe 1.1.1.2.6) und bei der Stabilisierung der Transkriptionsblase, die dadurch verdeutlicht wird, dass TFIIIE (ebenso wie TFIIH) zwar für die Transkription nativer Doppelstrang-DNA, nicht aber von einzelsträngiger, stark gewundener („supercoiled“) oder fehlgepaarter („mismatched“) DNA notwendig ist [102,103].

1.1.1.2.5 TFIIF

TFIIF ist ein Heterodimer bestehend aus $\text{TFIIF}\alpha$ und $\text{TFIIF}\beta$ [104] und besitzt von allen allgemeinen Transkriptionsfaktoren die höchste Affinität zur RNA Polymerase II [105]. TFIIF liegt bereits vor der Inkorporierung in den PIC zu einem großen Teil gebunden an die Polymerase vor [106] und wird als präformierter Komplex mit dieser in den PIC eingebaut [107]. Die Bindung erfolgt an die Rpb2-Untereinheit im Bereich des Spaltes, wo während der Initiation die stromabwärts vom Transkriptionsstart gelegene DNA lokalisiert ist [108,109] und liefert damit eine mögliche Erklärung für den beobachteten Einfluss von TFIIF auf die Auswahl des Transkriptionsstarts [110]. Es ist allerdings nach wie vor unklar, ob dieser Einfluss eventuell nur indirekt über die Stabilisierung von TFIIIB (siehe unten) zustandekommt. TFIIF scheint mit der Core-Domäne von TFIIIB zu interagieren und zusätzlich Kontakt zur stromaufwärts gelegenen DNA im Bereich des BRE^d aufzunehmen [111] und so zu einer Stabilisierung der DNA entlang des Spaltes der RNA Polymerase II beizutragen [111]. Gleichsam ist TFIIF essentiell für die Rekrutierung und vor allem für die Stabilisierung von TFIIIB im Präinitiationskomplex [112]. Während einige Autoren außerdem berichten, dass TFIIF eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der ersten Phosphodiesterbindung im Rahmen der Initiation bzw. bei der Trennung vom Promotor während des Übergangs zur Elongation spielt [113–115], führt die Entfernung von TFIIF aus dem fertigen PIC vor Beginn der RNA-Synthese zumindest an einigen Promotoren nicht zu einer Reduktion der Transkriptionsaktivität [112]. Auch nach dem Promotorescape assoziiert TFIIF vermutlich transient mit dem Elongationskomplex und erzielt beispielsweise durch synergistische Wirkung mit TFIIIS eine stimulatorische Wirkung auf die Elongation [116,117].

Ebenfalls nicht abschließend geklärt ist die Rolle einer möglichen Regulation der Transkriptionsaktivität über eine Phosphorylierung von TFIIF [118]: $\text{TFIIF}\alpha$ besitzt multiple Phosphorylierungsstellen, die den Wirkungsort für verschiedene Kinasen, wie der Casein Kinase 2 oder TAF1, darstellen [119,120]. Über eine Autophosphorylierung wird ebenfalls berichtet [119]. Die Auswirkungen einer Phosphorylierung auf den Vorgang der Initiation werden allerdings widersprüchlich entweder als stimulierend [120,121] oder nicht existent beschrieben [112], wohingegen phosphorylierter TFIIF seine Fähigkeit zum Verbleib im Elongationskomplex und dadurch seine stimulatorische Wirkung auf die Elongation verliert [112,121].

1.1.1.2.6 TFIIH

TFIIH ist ein Proteinkomplex aus zehn Untereinheiten [122], der drei unterschiedliche

enzymatische Funktionen ausführt: der Kernkomplex mit seiner XPB- und XPD-Untereinheit besitzt eine ATPase- und Helikaseaktivität [123,124] und der CAK (Cyclin-dependent Kinase (CDK)-Activating Kinase) Subkomplex eine Kinaseaktivität [125–127]. Es konnte gezeigt werden, dass XPB für die Transkriptionsinitiation essentiell ist [124], während XPD zwar zu einer gesteigerten Aktivität beiträgt, jedoch nicht absolut notwendig ist [128]. XPB interagiert während der Promotoröffnung mit der stromabwärts von der zukünftigen Transkriptionsblase gelegenen Doppelstrang-DNA [129] und fungiert dann als Translokase, die die Doppelstrang-DNA ATP-abhängig in den Spalt der RNA Polymerase II einfädelt und dabei durch Rotation gegenüber der, durch den PIC fixierten stromaufwärts gelegenen DNA eine Torquierung hervorruft, die zu einer Entwindung und schließlich zur Trennung der DNA-Stränge führt [98,129].

Der CAK-Subkomplex hingegen ist in der Lage die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II vor allem an Serin-5 zu phosphorylieren [130,131] und dadurch den Übergang von der Initiation zur Elongation zu fördern, ist aber, zumindest in vitro, nicht zwingend erforderlich [37,132,133].

Obwohl dies nicht unmittelbar mit dem regulären Ablauf der Transkription in Zusammenhang steht, sei noch darauf hingewiesen, dass TFIIF eine wichtige Rolle sowohl bei der Transkriptions-gekoppelten als auch bei der globalen DNA-Reparatur spielt [127,134].

1.1.1.3 Mediator

Beim Mediator handelt es sich um einen Proteinkomplex bestehend aus 20 – 30 verschiedenen Untereinheiten in variabler Zusammensetzung [135–137], die strukturell in die Einheiten Kopf, Mitte und Schwanz [138–140] sowie ein variabel vorhandenes Kinasemodul [141,142] unterteilt werden können. Die Entdeckung des Mediators geht auf Beobachtungen zurück nach denen verschiedene Aktivatoren der Transkription sich gegenseitig kompetitiv hemmten, was auf die Konkurrenz um die Bindung an einen von den allgemeinen Transkriptionsfaktoren distinkten Vermittler zurückgeführt wurde [143]. In den folgenden Jahrzehnten ist diese Rolle, die häufig als „molekulare Brücke“ zwischen Transkriptionsfaktoren und dem PIC beschrieben wird [137], genauer untersucht worden, so dass sich nach aktuellem Verständnis folgendes Bild ergibt: Im Rahmen der Ausbildung des PIC kommt es zu einer Bindung der Kopf- und Mitteldomäne an die unphosphorylierte CTD der RNA Polymerase II [35,144] sowie TFIIF [145] und TFIID [146], während die Schwanzdomäne des gleichen Komplexes [147] eine Verbindung zu den upstream des Kernpromotors gebundenen Transkriptionsfaktoren herstellt [144,148,149]. Zu beachten ist dabei, dass eine Bindung des Mediators an die RNA Polymerase

II nur stattfinden kann, wenn der Mediator dissoziiert von der Kinasedomäne vorliegt [150]. Die primäre Rekrutierung des Mediators über die Bindung an Transkriptionsfaktoren im Bereich des proximalen Promotors mit sekundärer Rekrutierung des PIC durch den Mediator bietet einen möglichen Weg der Transkriptionsinitiation an Promotoren, die keine Kernpromotorelemente enthalten [137,151]. Dabei enthält der Mediatorkomplex initial typischerweise das Kinasemodul, welches über eine Phosphorylierung sowohl der Transkriptionsfaktoren als auch des Mediators selbst, sowohl inhibierende [152] als auch stimulierende [153] Wirkungen auf die Transkription entfalten kann. Anschließend kommt es zur Dissoziation des Kinasemoduls und Rekrutierung der RNA Polymerase II sowie zur Assemblierung des PIC [147]. Nach der Öffnung des Promotors stimuliert der Mediator die Phosphorylierung der CTD durch TFIIH und damit den Übergang von der Initiation zur Elongation sowie die eigene Loslösung von der RNA Polymerase II [154].

Eine weitere wichtige Funktion während der Ausbildung des PIC ergibt sich durch die Fähigkeit die Blockade durch Gdown1 aufzuheben (siehe 1.1.1.1).

Zu den Transkriptionsfaktoren, die in der Lage sind direkt an Untereinheiten des Mediators zu binden, gehören neben vielen weiteren [155] C/EBP- β [156] und VP16 [157].

Darüber hinaus ist der Mediator-Komplex an vielen weiteren Vorgängen im Rahmen der Transkription, wie Elongation [158], Termination [159] und mRNA-Prozessierung [160] beteiligt.

1.1.1.4 Basale Elongationsfaktoren

1.1.1.4.1 TFIIIS

TFIIIS ist ein Monomer, dass sich strukturell in 3 Domänen unterteilen lässt, von denen jedoch nur die C-terminal gelegenen Domänen 2 und 3, die durch einen als Linker bezeichneten Bereich verbunden sind, von funktioneller Relevanz zu sein scheinen [161,162]. Im Rahmen des Backtrackings (siehe 1.1.3.3) bindet TFIIIS über die Domäne 2 an die Rpb1-Untereinheit der RNA Polymerase II, während der Linker durch den NTP-Eintrittstunnel (vergleiche 1.1.1.1) verläuft, so dass die Domäne 3 im Bereich des aktiven Zentrums der Polymerase zu liegen kommt [21]. Dort führt die Domäne 3 vermutlich über eine Verdrängung des Trigger Loops der RNA Polymerase und die koordinierte Bindung eines zweiten Mg^{2+} -Ions sowie eines Wassermoleküls zur Stimulation der intrinsischen Endonukleaseaktivität der RNA Polymerase II [163] und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Beendigung des arretierten Zustands der Polymerase. Domäne 3 enthält ein Zinkfinger-Motiv und ist in der Lage sowohl einzel- als auch doppelstränge RNA und DNA sowie DNA-RNA-Hybride zu binden [161].

1.1.1.4.2 DRB Sensitivity-Inducing Factor (DSIF)

DRB (5,6-Dichloro-1- β -d-Ribofuranosylbenzimidazol) ist ein Purin-Nukleosid, das in vitro eine hemmende Wirkung auf die Elongation entfaltet, allerdings nur wenn, anstatt von purifizierten Ansätzen, Zellextrakte verwendet werden, die neben der RNA Polymerase II und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren noch weitere Proteine beinhalten [164]. Dies führte zu der Vermutung, dass die Wirkung von DRB über bis dato unbekannte Faktoren vermittelt wird und führte schließlich zur Identifikation von DSIF [165], wobei die Wirkung von DRB nicht über DSIF sondern über eine Inhibition von P-TEFb vermittelt wird (siehe 1.1.1.4.4). DSIF ist ein Heterodimer bestehend aus einer großen und einer kleinen Untereinheit [165] und entfaltet seine Wirkung nach Untersuchungen an der prokaryontischen RNA Polymerase durch Bindung an die Klemmregion [166]. Die Bindestelle überschneidet sich dabei mit der Binderegion für TFIIE während der Initiation und es konnte gezeigt werden, dass TFIIE und DSIF um die Bindung an die RNA Polymerase II konkurrieren [167]. Dieser Zusammenhang erklärt die Beobachtung, dass die dosisabhängig hemmende Wirkung von DSIF auf die Initiation durch die Zugabe von TFIIE unterbunden werden kann [167].

Im Rahmen der Elongation ist der Effekt von DSIF entgegen den ursprünglichen Vermutungen nicht rein inhibierend: zwar führt DSIF (im obligatorischen Zusammenspiel mit NELF und weiteren noch unbekannten Faktoren [168]) zum Pausieren der Elongation [165], übt aber nach der Phosphorylierung der C-terminalen Region durch P-TEFb eine stimulatorische Wirkung auf die weitere Elongation aus [169].

1.1.1.4.3 Negative Elongation Factor (NELF)

Bei NELF handelt es sich um einen aus 5 Polypeptiden (A – E) bestehenden Komplex [170], der im Zusammenspiel mit DSIF in der Lage ist die RNA Polymerase II während der frühen Elongation in den pausierten Zustand zu versetzen [170]. Dabei kommt es zu einer Bindung von NELF an einen Komplex aus DSIF und der RNA Polymerase II [171] und obgleich der exakte Mechanismus noch nicht verstanden ist, scheint die zusätzliche Bindung von NELF-E an die wachsende mRNA von Bedeutung zu sein [171]. Zusätzlich konnten für NELF weitere Interaktionen mit Proteinen nachgewiesen werden, die einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription ausüben. So interagiert NELF-B zum Beispiel mit BRCA1 [172].

Neuere Untersuchungen belegen außerdem eine Interaktion von NELF mit bekannten Faktoren der Termination wie Pcf11 im Rahmen der vorzeitigen Termination [173] als alternative Möglichkeit der Beendigung des pausierten Zustandes der Polymerase (siehe 1.1.3.2) und deuten auf einen Einfluss auf die reguläre Termination hin.

1.1.1.4.4 Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb)

P-TEFb ist ein Heterodimer [174], das beim Menschen aus einer Kombination der Cyclin-abhängigen Kinase CDK9 und Cyclin T1 bzw. Cyclin T2 besteht [175]. Die Phosphorylierung der Zielstrukturen durch P-TEFb, zu denen neben bisher nicht zweifelsfrei identifizierten Serinresten der CTD der RNA Polymerase II [176,177] auch DSIF [178] und NELF [179] gehören, führt zur Beendigung des pausierten Zustandes der RNA Polymerase während der frühen Elongation [169]. Dieser Mechanismus scheint an der Mehrzahl (> 90%) der durch die RNA Polymerase II transkribierten Gene beteiligt zu sein [180] und stellt einen wesentlichen Ansatzpunkt der Transkriptionsregulation dar. Dabei kommt der Regulation von P-TEFb selbst entscheidende Bedeutung zu, die daher im folgenden skizziert wird: in HeLa-Zellen liegen mehr als die Hälfte aller P-TEFb-Moleküle gebunden in einem Komplex mit 7SK snRNA und HEXIM1 vor [181], wobei es durch die Inhibierung der Kinasefunktion zu einer funktionellen Inaktivierung von P-TEFb kommt [182,183]. Die Freisetzung von P-TEFb aus diesem Komplex wird durch Stress, beispielsweise durch Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht, gefördert [182]. P-TEFb, das nicht durch Bindung an diesen Komplex inhibiert ist, kann von einer Vielzahl von Proteinen an den Ort der Elongation rekrutiert werden: So bindet P-TEFb zum Beispiel an Brd4, das seinerseits in der Lage ist sowohl an acetyliertes Chromatin [184] als auch an den Mediatorkomplex [185] zu binden. Zusätzlich phosphoryliert Brd4 die CTD der RNA Polymerase II an Ser2 [186], eine Modifikation, die mit dem Übergang von der Pause zur weiteren Elongation assoziiert ist und führt über eine Stimulation der Autophosphorylierung von P-TEFb zur Modulation von dessen Kinaseaktivität [187]. Weitere Proteine, die über eine Rekrutierung von P-TEFb zu einer Förderung der Elongation führen können, umfassen NF- κ B [188], VP16 [189] und Myc [190]. Andererseits kann auch P-TEFb, das nicht an 7SK snRNA gebunden ist, durch Interaktion mit Repressoren in seiner Funktion inhibiert werden [191].

1.1.1.5 Kernpromotorelemente

Der Kernpromotor (vergleiche 1.2.1.1.1) bezeichnet denjenigen um den Transkriptionsstart gelegenen DNA-Bereich, der für eine minimale Transkriptionsrate notwendig ist [197,198], und umfasst meist 30-40 Nukleotide stromauf- und -abwärts des Transkriptionsstarts [198]. Die in diesem Bereich vorkommenden DNA-Motive, die für die koordinierte Bindung der

allgemeinen Transkriptionsfaktoren zuständig sind, werden entsprechend als Kernpromotorelemente bezeichnet [199]. In diesem Abschnitt sollen die häufigsten dieser Elemente besprochen werden, während auf seltenere wie TCT [200] oder XCPE1 [201] nicht eingegangen wird. In Tabelle 1 sind orientierend die Häufigkeiten dargestellt mit der diese

Kernpromotorelement	Prävalenz
TATA-Box	16-32% [192–194]
Initiator	45-66% [194–196]
DPE	20-25% [195,196]
BRE	25-30% [195,196]
MTE	~ 65% [196]
DCE	10-25% [82]

Tabelle 1: Häufigkeiten der verschiedenen Kernpromotorelemente in humanen Promotoren.

Kernpromotorelemente in humanen Kernpromotoren vorkommen, während Abbildung 1 einen Überblick über die bevorzugte Lokalisation dieser Elemente innerhalb des Kernpromotors gibt

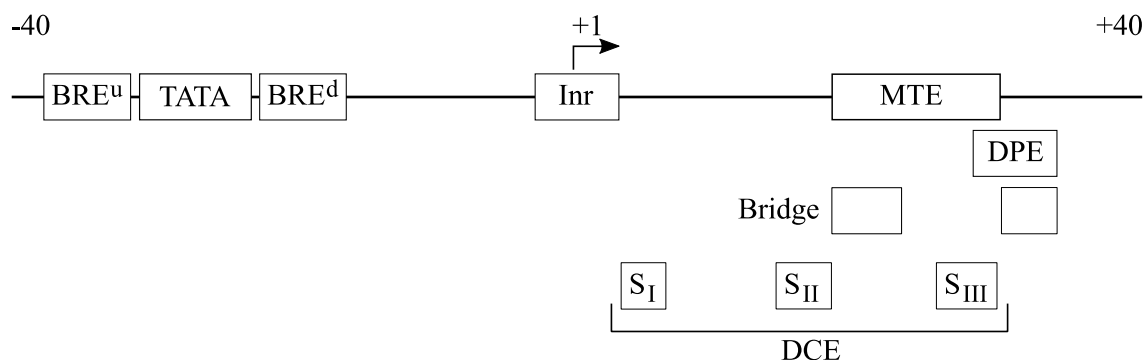


Abbildung 1: Schematische Darstellung der typischen Positionierung verschiedener Kernpromotorelemente in Relation zum Transkriptionsstart (+1).

(nach [199,202]). Es ist zu beachten, dass trotz der Vielzahl an existierenden Kernpromotorelementen ein Teil der Kernpromotoren keines der bisher bekannten Elemente enthält [203], ein Umstand der sowohl mit dem Auftreten von CpG-Inseln (siehe 1.2.3.1.1) und zerstreuten Promotoren assoziiert ist (siehe 1.2.1.1.3).

1.1.1.5.1 TATA-Box

Die TATA-Box, die nach ihren Erstbeschreibern auch Goldberg-Hogness-Box genannt wird, war das erste entdeckte Kernpromotorelement in Eukaryonten [204]. Sie zeigt große Ähnlichkeit zu der aus prokaryontischen Promotoren bekannten Pribnow-Box [205] und besitzt die Konsensussequenz TATAWAAR [199,205]. Das stromaufwärts gelegene Thymin ist dabei in über 70% der Fälle zwischen Position -33 und -28 in Relation zum Transkriptionsstart lokalisiert, am häufigsten an Position -31 oder -30 [205,206]. Entgegen früherer Prognosen nach denen eine TATA-Box in der Mehrzahl der Kernpromotoren vorhergesagt wurde [207], ist zu beachten, dass eine TATA-Box nach neueren Erkenntnissen nur in der Minderheit der

eukaryontischen Promotoren vorkommt (siehe Tabelle 1). Die TATA-Box dient als Erkennungsmotiv für TFIID, genauer der TBP-Untereinheit von TFIID [77,78] und spielt eine Rolle bei der exakten Lokalisierung des Transkriptionsstarts.

1.1.1.5.2 Initiator-Element (Inr)

1980 beschrieben Corden et al. eine um den Transkriptionsstart von Säugetiergenen gelegene Konsensussequenz YYAYYYYY [208], für die Smale und Baltimore erstmals 1989 eine regulatorische Rolle bei der Initiation postulierten [209]. Dieses, als Initiator bezeichnete, DNA-Motiv wurde in der Folge weiter spezifiziert und besitzt in Säugetieren mittlerweile die Konsensussequenz YYANWYY [207,210]. Das Initiator-Element reicht typischerweise von Position -2 - +5 und umschließt den Transkriptionsstart, so dass das zentrale Adenin häufig, aber nicht immer, mit dem Transkriptionsstart zusammenfällt und als Position +1 definiert wird. Das Initiator-Element dient als Erkennungssequenz für die beiden Untereinheiten TAF1 und TAF2 von TFIID [79].

1.1.1.5.3 Downstream Promoter Element (DPE)

Als Downstream Promoter Element wird ein DNA-Motiv mit der Konsensussequenz RGWYV bezeichnet, das erstmals 1996 von Burke et al. in TATA-losen Promotoren von *Drosophila* beschrieben wurde [211] und konserviert auch in Säugetierpromotoren vorkommt [80]. Entscheidend für die Funktion scheint neben dem Vorhandensein eines Inr-Elementes die exakte Lokalisierung des DPE von +28 bis +32 in Relation zur A+1 Position des Inr zu sein, da bereits das Verschieben der DPE um wenige Basenpaare zu einer starken Abnahme der Transkriptionsaktivität führt [80,212]. Das DPE dient wie das Inr-Element und die TATA-Box als Erkennungsmotiv für TFIID, allerdings am ehesten für die Untereinheiten TAF6 und TAF9 [80]. Während das DPE für seine Funktion auf ein Inr-Element angewiesen ist, kommt es fast ausschließlich in TATA-losen Promotoren vor und es wird postuliert, dass die TATA-Box und das DPE eine redundante Rolle ausüben, da die Mutation der TATA-Box in einem TATA-haltigen Promotor durch das Einfügen eines DPE-Elementes kompensiert werden kann [211].

1.1.1.5.4 Motif Ten Element (MTE)

2002 entdeckten Ohler et al. eine überrepräsentierte DNA-Sequenz stromabwärts des Transkriptionsstarts in TATA-losen Promotoren von *Drosophila*, die sie als Motif 10 bezeichneten [213]. In weiterführenden Experimenten konnte dieses Motiv zunächst als eigenständiges funktionales Promotorelement identifiziert werden und erhielt die Bezeichnung

Motif Ten Element (MTE), das sich an Position +18 - + 29 befindet und damit eine Überschneidung zum DPE aufweist [214]. Ebenso wie DPE vermittelt MTE eine schwache Bindung von TFIID, vermutlich ebenfalls über die Untereinheiten TAF6 und TAF9 [81]. Theisen et al. konnten zeigen, dass das DPE und MTE jeweils zwei für die Funktion essentielle DNA-Bereiche enthalten, von denen sich eine im Überlappungsbereich der beiden Elemente befindet [81,214]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Funktion des Promotors jeweils zwei dieser DNA-Bereiche ausreichend sind. Dadurch ergeben sich insgesamt drei funktionelle Elemente: das MTE bei Vorhandensein der proximalen beiden Bereiche, das DPE bei Vorhandensein der distalen Bereiche und das sogenannte Bridge-Element bei Vorhandensein des proximalen und des distalen Bereichs (vergleiche Abbildung 1) [81].

1.1.1.5.5 TFIIB Recognition Element (BRE)

Nachdem Nikolov et al. 1995 beschrieben, dass der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIIB während der Ausbildung des PIC, neben der Bindung an TBP auch Kontakt zum Phosphoribose-Gerüst der DNA stromauf- und abwärts der TATA-Box aufnimmt [59], wurde 1998 ein stromaufwärts der TATA-Box gelegenes Sequenzmotiv identifiziert, dass durch TFIIB erkannt und auch ohne die Anwesenheit von TBP gebunden wird [61]. Dieses Element mit der Konsensussequenz SSRGCC wurde zunächst als TFIIB Recognition Element bezeichnet [61]. Nach der zusätzlichen Identifizierung eines unmittelbar distal der TATA-Box gelegenen Motivs mit der Konsensussequenz RTDKKKK, dass ebenfalls durch TFIIB gebunden wird [62], erfolgte eine Anpassung der Nomenklatur: das neu identifizierte Motiv wurde downstream BRE getauft (BRE^d) während das ursprüngliche BRE-Element in upstream BRE (BRE^u) umbenannt wurde [62].

1.1.1.5.6 Downstream Core Element (DCE)

Beim erstmals 2000 beschriebenen DCE handelt es sich um ein stromabwärts des Transkriptionsstarts gelegenes Kernpromotorelement, das aus drei Unterelementen S_I, S_{II} und S_{III} besteht [215]. Diese Unterelemente besitzen die Konsensussequenzen CTTC, CTGT und AGC, die in Relation zum Transkriptionsstart von Position +6 bis +11, +16 bis +21 und +28 bis +34 lokalisiert sein können [82]. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, überschneiden sich somit S_{III} und das DPE. Gestützt durch Häufigkeitsanalysen postulieren Lee et. al. entsprechend, dass sich das Vorkommen dieser beiden Elemente gegenseitig ausschließt [82]. Funktionell scheint das DCE seine Wirkung über eine Bindung der TAF1-Untereinheit von TFIID zu entfalten und vor allem in Promotoren vorzukommen die zusätzlich eine TATA-Box und/oder ein Initiator-

Element enthalten [82].

1.1.2 Initiation

Der Vorgang der Initiation beginnt mit der Formierung des Präinitiationskomplexes (PIC), bestehend aus den basalen Transkriptionsfaktoren sowie der RNA Polymerase II, im Bereich des Kernpromotors. Der Präinitiationskomplex bezeichnet einen Zustand, in dem die basale Transkriptionsmaschinerie vollständig versammelt im Bereich des Transkriptionsstarts vorliegt, die DNA aber noch geschlossen als Doppelstrang vorliegt [9].

Die Art und Weise, in der es zur Ausbildung des Präinitiationskomplexes kommt, ist nicht abschließend geklärt, so dass aktuell zwei verschiedene Modelle über die Formierung des PIC existieren: Das Stufenmodell („sequential model“) sowie das Holoenzym-Modell [197,216]. Dabei ist zu beachten, dass die beiden Modelle sich nicht gegenseitig ausschließen und vermutlich beide Varianten nebeneinander vorkommen. Das Stufenmodell geht dabei von der schrittweisen Bildung des PIC aus und basiert auf frühen Beobachtungen, dass zur korrekten Transkriptionsinitiation in vitro die Zugabe der verschiedenen Komponenten in einer bestimmten Reihenfolge notwendig war [217]. Gestützt wird dieses Modell außerdem von aktuellen elektronenmikroskopischen Beobachtungen [111]. Die schrittweise Bildung des PIC läuft dabei wie folgt ab [111,216]: Im ersten Schritt kommt es über verschiedene Mechanismen (siehe 1.1.1.2.3) zur Rekrutierung von TFIID an den Kernpromotor. Die Bindung von TBP induziert dabei eine Krümmung der DNA im Bereich der TATA-Box um 90° [218,219], die für den weiteren Ablauf der Transkription essentiell ist. Durch die nachfolgende Anlagerung von TFIIA wird die Bindung von TBP an die DNA stabilisiert [44]. Die Bindung von TFIIB an diesen Komplex führt durch eine Interaktion mit TFIID und dem gegebenenfalls vorhandenen BRE-Motiv zu einer weiteren Stabilisierung und verleiht dem PIC erstmals eine gewisse Direktionalität [63]. Anschließend ist TFIIB durch Kontaktaufnahme sowohl mit der RNA Polymerase II als auch mit TFIIF in der Lage einen präformierten Komplex aus diesen beiden Molekülen zu rekrutieren (siehe 1.1.1.2.2). Abschließend kommt es zur Anlagerung der Faktoren TFIIIE und TFIIH und damit zur Ausbildung des vollständigen Präinitiationskomplexes.

Im Unterschied dazu liegt die RNA Polymerase II nach dem Holoenzymmodell bereits vor der Bindung an die DNA als präformierter Komplex mit den basalen Transkriptionsfaktoren als sogenanntes Holoenzym vor, das anschließend an die DNA bindet und so den Präinitiationskomplex bildet [220,221].

Dieser Zustand, in dem sämtliche zum Beginn der eigentlichen Transkription notwendigen Faktoren am Kernpromotor versammelt sind, die DNA aber noch als Doppelstrang vorliegt und sich noch nicht im katalytischen Zentrum der RNA Polymerase II befindet (vergleiche 1.1.1.1), wird auch als „geschlossener Komplex“ bezeichnet.

Obgleich der Mediator im klassischen Modell der Initiation nicht vorkommt, da er für die Transkription *in vitro* nicht notwendig ist, scheint er *in vivo* eine große Rolle zu spielen und ist vermutlich Bestandteil der meisten PICs [222]. Im nächsten Schritt erfolgt unter maßgeblicher Beteiligung der Faktoren TFIIE und TFIIH das ATP-abhängige Schmelzen, also die Trennung, des DNA-Doppelstranges (siehe 1.1.1.2.4 und 1.1.1.2.6) mit Ausbildung einer Transkriptionsblase und somit der Übergang in den „offenen Komplex“ [103,223]. Die genaue Länge dieser Transkriptionsblase in Eukaryonten ist nicht bekannt, in Prokaryonten liegt diese bei ca. 14 Basenpaaren [224]. Die einzelsträngige Template-DNA gelangt nun von oben in den Spalt der RNA Polymerase II und zum katalytischen Zentrum, wobei der PIC durch die Synthese der ersten Phosphodiesterbindung definitionsgemäß den Zustand wechselt und nun als Initially Transcribing Complex bezeichnet wird [225]. Die nun folgenden Vorgänge markieren den Übergang zur Elongation, der nicht immer einheitlich als Promotor Escape oder Promoter Clearance bezeichnet wird [226,227] und umfasst die Synthese der mRNA bis zu einer Länge von ca. 15bp [226] sowie die Loslösung der RNA Polymerase sowohl vom Kernpromotor als auch von den meisten bis hierhin assoziierten Faktoren und führt zur Ausbildung des frühen Elongationskomplexes: Zunächst kommt es zur repetitiven Bildung von kurzen, aus nur 2-4 Nukleotiden bestehenden RNA-Fragmenten [228], die aus dem aktiven Zentrum der Polymerase ausgestoßen werden. Dieser Vorgang wird als abortive Initiation bezeichnet und setzt sich zyklisch fort, bis durch die Synthetisierung eines aus 4-5 Nukleotiden bestehenden RNA-Fragmentes ein relativ stabiler DNA-RNA-Hybrid entstanden ist [229], der vermutlich durch den B-Reader von TFIIB, der durch den Austrittskanal für die mRNA zum aktiven Zentrum reicht (vergleiche 1.1.1.2.2), stabilisiert wird [64,68]. In der Folge kommt es ab einer Länge der mRNA von ca. 7bp zu einer Kollision mit TFIIB im Austrittskanal [68], welche zu einer zunehmenden Destabilisierung und bei einer mRNA-Länge von 12-13bp zu einer Trennung des TFIIB von der Polymerase führt [112]. Parallel dazu kommt es durch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II zur Dissoziation des Mediatorkomplexes (vergleiche 1.1.1.1 und 1.1.1.3) sowie vermutlich von TFIIE, der ebenfalls eine starke Präferenz für die unphosphorylierte Polymerase aufweist [100,230]. TFIID und TFIIA verbleiben vermutlich gebunden an die DNA im Bereich des Kernpromotors zurück [230], während TFIIIF, der als scheinbar einziger der basalen Transkriptionsfaktoren im weiteren

Verlauf der Transkription noch eine Rolle spielt (siehe 1.1.1.2.5), zumindest vorübergehend den Kontakt zum Elongationskomplex verliert [230]. Obgleich TFIIH für den weiteren Ablauf der Transkription ab einer RNA-Länge von ca. 15-18bp nicht mehr erforderlich zu sein scheint [231], erfolgt die Dissoziation vom Elongationskomplex erst bei einer Länge des Transkriptes zwischen 30 und 70bp [230].

1.1.3 Elongation

Zu Beginn der Elongation befindet sich die RNA Polymerase II im frühen Elongationskomplex und hat sich vermutlich bis auf TFIIH von allen weiteren Komponenten des PIC gelöst (siehe oben). Die Transkriptionsblase erstreckt sich auf eine Länge von ca. 10-15bp, in der sich ein Hybrid des kodogenen Stranges und der neusynthetisierten RNA auf einer Länge von 7-9bp ausgebildet hat [232–234]. Das 5'-Ende der RNA gelangt durch den Austrittskanal nach außen, während sich das 3'-Ende im katalytischen Zentrum befindet. Die Verlängerung der RNA am 3'-Ende läuft als zyklischer Vorgang ab, der als Nucleotide Addition Cycle (NAC) bezeichnet wird. Dieser Zyklus verläuft allerdings nicht gleichförmig, sondern wird regelmäßig durch weitere Ereignisse wie das Promotor Proximal Pausing oder das Backtracking unterbrochen.

1.1.3.1 Nucleotide Addition Cycle

Zu Beginn eines jeden Zyklus befindet sich der Elongationskomplex im aktiven vorwärts-translozierten Zustand (Abbildung 2a, nach [235]), in dem sich das freie 3'-Ende der RNA an Position -1 befindet, so dass an Position +1 ein NTP direkt im aktiven Zentrum der Polymerase binden kann. Die Bindung des korrekten NTP an Position +1 führt zu einer Stabilisierung des aktiven Zustands [235,236] und zu einer Konformationsänderung des Trigger Loops [17], der die Synthese der neuen Phosphodiesterbindung durch nukleophile Substitution erlaubt (Abbildung 2b und d) [237,238]. Die RNA Polymerase befindet sich anschließend in einem inaktiven prä-translozierten Zustand (Abbildung 2d), in dem die Position +1 durch das neusynthetisierte 3'-Ende der RNA besetzt ist, so dass vor Beginn eines neuen Zyklus eine Verschiebung der RNA Polymerase um eine Base stromabwärts erfolgen muss. Für die Bewegung der RNA Polymerase entlang des DNA-Stranges wurde dabei anhand von experimentellen Daten der bakteriellen RNA Polymerase ein Mechanismus postuliert, der als Molekulare oder Brownsche Ratsche bezeichnet wird und Bewegungen der RNA Polymerase sowohl stromab- als auch stromaufwärts zulässt [235]. Elementare Bestandteile dieses Mechanismus sind zwei Sperren: eine dynamische Sperre bestehend aus Trigger Loop und Bridge Helix der RNA Polymerase sowie eine statische Sperre, die durch das noch freie, nicht inkorporierte, NTP an Position +1 repräsentiert wird [235]. Im inaktiven prä-translozierten

Zustand kommt es durch eine Bewegung der dynamischen Sperre zu einem Verschiebung der Polymerase entlang des RNA-DNA-Hybrids um eine Stelle nach stromabwärts [239], wodurch die RNA Polymerase einen intermediären Zustand annimmt, in dem sich das freie 3'-Ende der RNA an Position -1 befindet, die Position +1 also kein RNA-DNA-Hybrid mehr enthält, aber durch die dynamische Sperre blockiert ist (Abbildung 2c) [239]. Durch Zurückbewegung der dynamischen Sperre in die

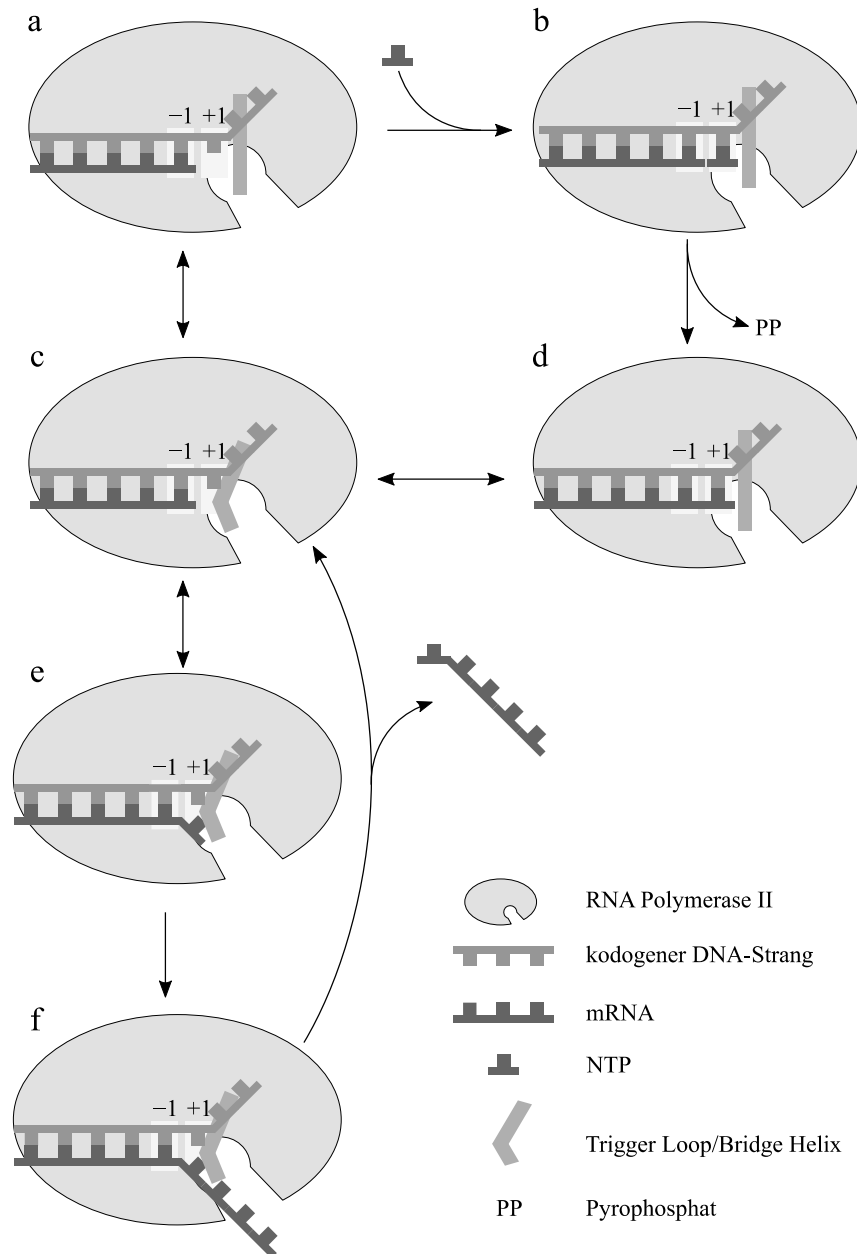


Abbildung 2: Schematische Darstellung der möglichen Zustände der RNA Polymerase II während des NAC: Der aktiv vorwärts-translozierte Zustand (a) wird entweder durch Bindung eines NTP an Position +1 stabilisiert (b) oder geht über den „ausgefranzten“ Zustand (e) durch Backtracking in einen inaktiv arretierten Zustand über (f), der nur durch Spaltung des mRNA-Stranges beendet werden kann. Nach Bindung des NTP (b) gelangt die Polymerase nach Synthese der Phosphodiesterbindung in den aktiv prätranslozierten Zustand (d). Durch Bewegung von Trigger Loop und Bridge Helix erfolgt der Vorschub entlang des kodogenen DNA-Stranges (c) und ermöglicht dadurch den Übergang in den Ausgangszustand (a).

Ausgangsposition wird der aktive vorwärts-translozierte Zustand erreicht [235,239], in dem allerdings das Zurückgleiten der Polymerase nach stromaufwärts durch die dynamische Sperre nicht verhindert wird. Es wird daher angenommen, dass die RNA Polymerase zwischen dem

prä- und posttranslozierten Zustand hin- und herwechselt [239]. Dieses Zurückwechseln in den prä-translozierten Zustand wird durch das Binden von einem freien NTP an Position +1 verhindert, das dadurch die Funktion der statischen Sperre ausübt [239].

Im Rahmen des sogenannten Backtrackings kann es dazu kommen, dass das 3'-Ende der RNA weiter zurückgleitet als nach Position +1 (siehe unten), wodurch die Polymerase in einen inaktiven arretierten Zustand übergeht (Abbildung 2f).

1.1.3.2 Promoter Proximal Pausing

Als Promoter Proximal Pausing wird das reversible Halten des Elongationskomplexes innerhalb der ersten 30-100 Nukleotide stromabwärts des Transkriptionsstarts bezeichnet [240,241], welches an einem Großteil der transkribierten Gene beobachtet wird und im Mittel knapp 7 Minuten andauert [180]. Der Eintritt in den pausierten Zustand wird durch die Faktoren NELF und DSIF vermittelt (vergleiche 1.1.1.4.2 und 1.1.1.4.3). Der genaue Ort der Pause scheint dabei durch sequenzspezifische Mechanismen des Template-Stranges im Bereich des Kernpromotors [242] sowie durch die sequenzabhängige Transkriptions- und Rekrutierungsgeschwindigkeit von NELF und DSIF [243], beeinflusst zu werden. Als Ergänzung zu diesem Modell werden sequenzunabhängige Mechanismen wie die vorübergehende Blockade der Elongation durch Nukleosomen diskutiert [244,245].

Zwar besteht hinsichtlich der Funktion der Pause noch einige Unsicherheit, es existierten jedoch mehrere verschiedene Vorstellungen: eine, von einigen Autoren als „hit and run“ bezeichnete Theorie [241], schlägt vor, dass durch den relativ langen Zeitraum der Pause, zeitlich getrennte Interaktionen verschiedener Faktoren in einer bestimmten Reihenfolge mit dem Elongationskomplex koordiniert werden können und wie eine Art molekulares Passwort für den Übergang zur weiteren Elongation funktionieren [246]. Weitere Theorien beinhalten eine über Cohesin und den Mediatorkomplex vermittelte Interaktion des pausierten Elongationskomplexes mit weiter entfernt gelegenen regulatorischen Elementen wie Enhancern oder Silencern [241,247,248] sowie die Rekrutierung weiterer Polymerase-Moleküle an den Promotor [249]. Andererseits könnte die Pause auch essentiell für parallel zur eigentlichen Transkription ablaufende Vorgänge wie das pre-mRNA-Processing sein [245].

Die Beendigung des pausierten Zustandes kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen: unter Einfluss von P-TEFb kommt es durch Phosphorylierung sowohl von NELF und DSIF als auch der Polymerase zur Dissoziation von NELF und Fortsetzung der produktiven Elongation unter nun stimulatorischem Einfluss von DSIF (siehe 1.1.1.4.4). Alternativ kann der pausierte Zustand auch über einen als vorzeitige Termination („premature termination“) genannten

Vorgang beendet werden. Die diesen Mechanismus induzierenden Faktoren sind noch nicht genau bekannt, es mehren sich aber Hinweise, dass sowohl NELF als auch Faktoren wie TTF2 und Xrn2, die an der regulären Termination beteiligt sind, eine Rolle spielen könnten [173,250].

1.1.3.3 Backtracking

Bereits früh wurde beobachtet, dass sich die RNA Polymerase II während der Elongation nicht nur vorwärts sondern auch rückwärts entlang der DNA bewegen kann und dass die Rückwärtsbewegung mit einem inaktiven Zustand der Polymerase assoziiert ist [251]. Diese Rückwärtsbewegung, die als Backtracking bezeichnet wird, beinhaltet die Dehybridisierung der RNA vom kodogenen DNA-Strang am 3'-Ende der RNA und das Austreten dieser durch den NTP-Eintrittskanal der RNA Polymerase [163]. Im ersten Schritt kommt es dabei durch eine Konformationsänderung des Trigger Loops, die diesen in einen pausierten Zustand versetzt, der während des regulären NAC nicht beobachtet wird, zunächst lediglich zur Dehybridisierung des an Position -1 befindlichen 3'-Nukleotids der RNA vom kodogenen Strang der DNA, was als Ausfransen („fraying“) bezeichnet wird (Abbildung 2e) [252]. Dieses Ausfransen wird erleichtert durch die Inkorporation eines falschen Nukleotids während des NAC [253]. Das ausgefranste Nukleotid blockiert dann die Bindestelle für das nachfolgende NTP an Position +1 [253] und würde somit nach dem oben vorgestellten Modell das weitere Zurückgleiten der Polymerase erleichtern. Cheung und Cramer postulieren allerdings, dass dies nur bis zu einer Positionierung des 3'-Endes der RNA an Position +2 der Fall ist, weil es dann zu einer Behinderung des weiteren Zurückgleitens durch einen Tyrosinrest der Polymerase kommt [163]. Dieses wird hier als limitiertes Backtracking bezeichnet und stimmt mit der Beobachtung überein, dass es während der Fehlerkorrektur nach Misinkorporation eines Nukleotids während der Elongation bevorzugt zu einer Freisetzung von Dinukleotiden kommt [254]. Kommt es dennoch zum weiteren Zurückgleiten der Polymerase, was beispielsweise durch einen schwachen RNA-DNA-Hybriden [255] oder durch stromabwärts gelegene Nukleosomen [256,257] gefördert wird, kommt es zur Dehybridisierung von ca. 9 Nukleotiden am 3'-Ende der RNA, die dann durch den NTP-Eintrittskanal gelangen und dort stabil an Backtrack-Bindestellen („backtrack sites“) der Polymerase binden (Abbildung 2f), was den Elongationsarrest zur Folge hat [163].

Während der Elongationskomplex nach limitiertem Backtracking und solange keine Misinkorporation vorliegt durch Vorwärtsgleiten spontan wieder in den aktiven vorwärts-translozierten Zustand übergehen kann, ist in den anderen Fällen die Abtrennung des überstehenden 3'-RNA-Restes notwendig: dies geschieht über die intrinsische

Endonukleaseaktivität der RNA Polymerase II (vergleiche 1.1.1.1), die den in Synthese befindlichen RNA-Strang zwischen Position -1 und +1 schneidet, den 3'-RNA-Rest freisetzt und somit direkt in den aktiven vorwärts-translozierten Zustand übergeht [163]. Dieser Vorgang wird sowohl nach limitiertem wie auch nach vollständigem Backtracking massiv durch TFIIIS stimuliert (siehe 1.1.1.4.1), wobei im Rahmen der Fehlerkorrektur in vivo Rpb9 ebenfalls eine bedeutende Rolle zu spielen scheint [19].

1.1.4 Termination

Bei der Termination handelt es sich um den abschließenden Schritt der Transkription, der zur Freisetzung der neusynthetisierten mRNA führt. Ebenso wie die Initiation und die Elongation ist dies ein hochkomplexer Vorgang, der allerdings im Vergleich zu den anderen beiden Abschnitten noch am wenigsten untersucht ist. Zwar existieren einige Modelle über den mechanistischen Ablauf der Termination [258,259], Proteine, die auch schon während Initiation und Elongation eine Rolle spielten, sind darin allerdings (von Ausnahmen abgesehen [159]) bisher kaum involviert. Eine funktionelle Relevanz des Promotors für die Regulation der Termination scheint daher nach bisherigem Kenntnisstand zwar möglich ist aber kaum untersucht. Eine detaillierte Beschreibung dieser Vorgänge besitzt folglich nur eine geringe Relevanz für das Verständnis der vorliegenden Arbeit und bleibt deshalb an dieser Stelle aus.

1.1.5 Anmerkungen zum klassischen Transkriptionsmodell

Wie bereits angesprochen, handelt es sich bei dem bis hierher beschriebenen Modell der Transkription nicht um einen statischen stets gleichförmig ablaufenden Vorgang. Im Gegenteil hat sich gezeigt, dass der Ablauf der Transkription ebenso wie die jeweils beteiligten Faktoren stark kontextabhängig ist. Dies spiegelt sich im oben beschriebenen Modell so bisher nicht wieder und liegt zum einen an einer notwendigen Vereinfachung der komplexen Abläufe zum anderen aber auch in der Forschungsgeschichte begründet: mit Identifizierung der TATA-Box wurde dieser eine deutlich größere Bedeutung für die Transkription zugemessen als heutzutage angemessen erscheint. Dies hat dazu geführt, dass Forschungsanstrengungen über einen langen Zeitraum unter der Prämisse unternommen wurden, dass die TATA-Box praktisch in fast allen funktionellen Promotoren vorkommt [205] mit der Folge, dass vor allem diese Promotoren erforscht wurden und TATA-lose Promotoren vernachlässigt bzw. gar nicht erst entdeckt wurden.

Zusätzlich wurden viele Experimente ausschließlich in vitro mit den initial entdeckten basalen Transkriptionsfaktoren in aufgereinigter Form durchgeführt, deren Notwendigkeit dadurch

eventuell ebenfalls überschätzt wurde. Beispielsweise finden Erkenntnisse, wonach TFIID durch den SAGA-Komplex (siehe 1.1.1.2.3) und TFIIF in einigen Fällen möglicherweise durch den Mediator ersetzt werden kann [118], im klassischen Modell der Transkription kaum Beachtung.

Diese einschränkenden Anmerkungen sollten beim weiteren Lesen dieser Arbeit bedacht werden, um die Ergebnisse mit der nötigen Vorsicht zu interpretieren und vorschnelle Schlussfolgerungen zu vermeiden.

1.2 Regulation der Transkription

1.2.1 Regulatorische Elemente auf Ebene der DNA

In diesem Abschnitt sollen die verschiedenen sequenzabhängigen regulatorischen Elemente der Transkription, also solche Elemente, die ihre Regulation über die Bindung von Faktoren an Sequenzmotive der DNA entfalten, vorgestellt werden. Diese werden auch als cis-regulatorische Elemente bezeichnet und bestehen jeweils aus einer Ansammlung mehrerer Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die analog als trans-regulatorische Elemente bezeichnet werden [260]. Die Unterscheidung dieser Elemente wird zum einen durch die Art der Wirkung auf die Transkription (stimulatorisch oder hemmend) und zum anderen anhand der Entfernung des Elementes in Bezug auf das regulierte Gen vorgenommen (nah oder fern). Während früher davon ausgegangen wurde, dass sich diese Elemente auch im Hinblick auf vorkommende Sequenzmotive, ihre transkriptionsinitiiierenden sowie epigenetischen Eigenschaften unterscheiden, deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass die nachfolgend besprochenen Elemente in dieser Hinsicht große Ähnlichkeit aufweisen [261].

Mehrere cis-regulatorische Elemente sind wiederum in sogenannten topologisch assoziierenden Domänen (TADs) organisiert, die sich über eine Länge von mehreren Kilo- bis zu einigen Megabasen erstrecken können und unter anderem durch Insulatoren (siehe 1.2.1.3) und Housekeeping-Gene voneinander getrennt werden [262]. TADs enthalten meist mehrere Gene (mit entsprechenden Promotoren) sowie eine Vielzahl an Enhancern und es wurde gezeigt, dass cis-regulatorische Elemente vor allem innerhalb ihrer eigenen TAD miteinander interagieren [262].

1.2.1.1 Promotor

Der Begriff Promotor wird in der Literatur nicht immer einheitlich verwendet, meint aber im Allgemeinen die Kombination aus einem Kernpromotor und einem direkt stromaufwärts davon gelegenen proximalen Promotor (manchmal auch als proximaler Enhancer bezeichnet [263])

und wird so auch in dieser Arbeit verwendet [261]. Aus epigenetischer Perspektive zeichnen sich Promotoren durch eine häufigere Trimethylierung von Lysin 4 an Histon 3 (H3K4me3) aus [264], welche durch TFIID erkannt und gebunden werden kann [85] und sind in Bereichen mit geringerer Nukleosomendichte (Nucleosome Depleted Region, NDR) im Vergleich zum restlichen Genom lokalisiert [265]. Weiteres epigenetisches Merkmal, das vor allem mit aktiven Promotoren assoziiert ist, ist eine Acetylierung von Lysin 27 an Histon 3 (H3K27ac) [266].

1.2.1.1.1 Kernpromotor

Die basalste regulatorische Einheit auf Ebene der DNA ist der Kernpromotor. Wie bereits in Abschnitt 1.1.1.5 ausgeführt, bezeichnet der Kernpromotor den unmittelbar um den Transkriptionsstart gelegenen DNA-Bereich, der zur Erzeugung einer minimalen Transkriptionsrate notwendig ist, und umfasst nicht mehr als 30-40 Nukleotide stromauf- und abwärts des Transkriptionsstarts [198]. Der Kernpromotor ist der Bereich, in dem die Kernpromotorelemente lokalisiert sind und es über die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie zur Ausbildung des Präinitiationskomplexes kommt. Er ist daher zum einen der Ort an dem sämtliche regulatorischen Einflüsse, die die Initiation betreffen zusammenlaufen und zum anderen über die variable Kombination der verschiedenen Kernpromotorelemente selbst Regulator der Transkription: so führt zum Beispiel die künstliche Kombination der Kernpromotorelemente TATA-Box, Inr, MTE und DPE zu einem als „Super Core Promotor 1“ bezeichneten Konstrukt, der durch gesteigerte Affinität zu den basalen Transkriptionsfaktoren und einen beschleunigten PIC-Aufbau zu einer Steigerung der Genexpression führt [267]. Allerdings ist eine Regulation nicht nur über die variable Zusammensetzung verschiedener Kernpromotorelemente, sondern auch über die Sequenz ihrer DNA-Motive selbst möglich: so zeigt zum Beispiel TBP unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Varianten der TATA-Konsensussequenz [268,269] und verdeutlicht, dass, obgleich die allein durch den Kernpromotor induzierte basale Transkriptionsrate niedrig ist, bereits nur durch die Sequenz des Kernpromotors fein nuancierte Unterschiede der Transkriptionsaktivität zwischen verschiedenen Genen realisiert werden können.

1.2.1.1.2 Proximaler Promotor

Der proximale Promotor ist unmittelbar stromaufwärts, teilweise auch stromabwärts, des Kernpromotors lokalisiert und erstreckt sich üblicherweise über einige Hundert bis wenige Tausend Nukleotide [270]. Es handelt sich dabei um den Bereich, in dem diejenigen

Transkriptionsfaktoren, die nicht zu den basalen Transkriptionsfaktoren gehören, binden und ihre Wirkung entfalten. Zusammen mit dem Kernpromotor vermittelt er üblicherweise eine basale Promotoraktivität, die deutlich über der des isolierten Kernpromotors liegt. Ähnlich wie dieser ist die Struktur verschiedener proximaler Promotoren hoch variabel, beispielsweise bezüglich der vorhandenen Bindemotive für Transkriptionsfaktoren, dem GC-Gehalt und dem Methylierungsmuster, mit entsprechenden Auswirkungen auf die Funktion (siehe folgende Abschnitte).

1.2.1.1.3 Fokussierte versus zerstreute Promotoren

Die ursprüngliche Vorstellung, dass die Transkription durch die RNA Polymerase II stets an der gleichen Position initiiert wird, ist in den letzten Jahren zunehmend in Frage gestellt worden: es hat sich gezeigt, dass auch in Bezug auf die Eindeutigkeit des Transkriptionsstarts Unterschiede zwischen verschiedenen Promotoren existieren [206,271,272]. Dies hat zu einer Unterscheidung von sogenannten fokussierten („focussed“ oder „sharp“) und zerstreuten („dispersed“ oder „broad“) Promotoren geführt [206,273]: Während der Transkriptionsstart bei fokussierten Promotoren auf eine einzelne Base, bzw. auf wenige nur einige Nukleotide auseinanderliegende Basen, beschränkt ist, weist der Transkriptionsstart von zerstreuten Promotoren eine große Variabilität über einen Bereich von 50 bis 200 Nukleotiden auf. Es hat sich gezeigt, dass TATA-Boxen und Initiator-Elemente vermehrt in fokussierten Promotoren vorkommen, während CpG-Inseln mit zerstreuten Promotoren assoziiert sind [274,275]. Dies in Zusammenschau mit den relativ strikten Positionsanforderungen der klassischen Kernpromotorelemente in Relation zum Transkriptionsstart hat zu der Theorie geführt, dass diese Elemente allgemein eher in fokussierten Promotoren vorkommen und die Koordination des PIC an zerstreuten Promotoren neben epigenetischen Einflüssen eher durch weiter proximal bindende Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und NF-Y reguliert wird [202]. Anzumerken ist, dass der Startpunkt der Transkription auch in zerstreuten Promotoren nicht zufällig ist, sondern eine Präferenz für die Sequenz YR an Position -1/+1 zeigt [206].

1.2.1.2 Enhancer

Als Enhancer werden cis-regulatorische Elemente bezeichnet, die nicht in unmittelbarer Nähe des regulierten Gens lokalisiert sind und einen stimulierenden Einfluss auf die Transkription ausüben [276]. Neben der Entfernung vom Zielgen unterscheiden sich Enhancer von Promotoren auch aus epigenetischer Sicht: im Gegensatz zu Promotoren weisen die benachbarten Nukleosomen an Enhancern vor allem eine Monomethylierung von H3K4 (H3K4me1) auf [264], wohingegen die Modifikation H3K27ac analog zu Promotoren aktive

von inaktiven Enhancern zu unterscheiden scheint [277]. Das Vorkommen von Enhancern korreliert ebenfalls mit der Bindung des transkriptionalen Koaktivators p300 [278], bei dem es sich um eine Histonacetyltransferase (HAT) handelt [279], die unter anderem in der Lage ist H3K27 zu acetylieren [280].

Für die Art und Weise in der Enhancer ihren stimulierenden Einfluss auf die Transkription ausüben existieren zwar mehrere Theorien [281], am besten etabliert und untersucht ist aber die Vorstellung nach der der Enhancer durch Schlingenbildung („looping“) in räumliche Nähe zum regulierten Gen gelangt. Die Schlingenbildung kann zum Beispiel über den Mediator in Kombination mit Cohesin [248] und möglicherweise eRNA (enhancer-templated noncoding RNA, siehe unten) oder die Interaktion zwischen mehreren Sp1- [281] oder CTCF-Molekülen (vergleiche 1.2.1.3) vermittelt werden. Durch die daraus resultierende Nähe weiterer mit dem Enhancer assoziierter Koaktivatoren kommt es dann zur Interaktion mit Elementen des Promotors bzw. der basalen Transkriptionsmaschinerie. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Enhancer-abhängige Freisetzung von P-TEFb aus dem 7SK/HEXIM1-Komplex zur Beendigung des pausierten Zustands der Polymerase im Bereich des proximalen Promotors führt [282] (vergleiche 1.1.3.2).

Die Mechanismen, die festlegen, welche Gene durch einen bestimmten Enhancer beeinflusst werden und welche nicht, sind unzureichend untersucht, scheinen aber zumindest teilweise über die Organisation in topologisch assoziierenden Domänen stattzufinden, da entsprechende Interaktionen hauptsächlich innerhalb dieser beobachtet werden (siehe oben). Zusätzlich scheint die Affinität von Enhancern zu verschiedenen Promotoren von der Zusammensetzung der Elemente des Kernpromotors und damit dessen Sequenz abhängig zu sein [283,284].

Weiterhin hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass es an einem Teil der identifizierten Enhancer ebenfalls zur Transkription durch die RNA Polymerase II kommen kann und es auf diese Weise zur Produktion von eRNA kommt [285]. Die Funktion dieser eRNAs ist nicht zufriedenstellend geklärt, allerdings existiert ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Bildung von eRNAs und der Transkriptionsaktivität an Zielgenen [286,287], der außerdem kausal zu sein scheint [288]. Einige Autoren haben für die eRNAs in Kombination mit Mediator und Cohesin eine Rolle beim „Looping“ beschrieben [289], die von anderen Autoren aber nicht gefunden wurde [287].

Gehen von einem Enhancer hauptsächlich inhibierende Einflüsse auf die Transkription eines bestimmten Gens aus, wird er als Silencer bezeichnet.

1.2.1.3 Insulator

Als Insulator (Isolator) werden cis-regulatorische Elemente bezeichnet, die benachbarte DNA-Abschnitte von regulatorischen Einflüssen anderer DNA-Bereiche abschirmen und je nach ihrer Funktionsweise in zwei Typen unterschieden werden: Enhancer-blockierende Isolatoren tragen zur Unterteilung der DNA in topologisch assoziierende Domänen bei (vergleiche 1.2.1) und hemmen dadurch den stimulierenden Einfluss von Enhancern auf Promotoren, wenn sie zwischen diesen lokalisiert sind, während Barrier-Isolatoren die Ausbreitung von Heterochromatin in Bereiche mit Euchromatin verhindern [290].

Insbesondere für die Enhancer-blockierende Form spielt CTCF eine wichtige Rolle, der an entsprechende Bindestellen des Insulators bindet [291,292]: Nach der aktuellen Vorstellung vermittelt CTCF über die Dimerisierung mit einem weiteren CTCF Molekül eine Schlingenbildung der DNA [293,294] und führt so zu einer Hemmung der Interaktion zwischen Elementen unterschiedlicher Schlingen und einer Stimulierung der Interaktion innerhalb der Schlinge [262]. Daher wird postuliert, dass die Funktion dieser Insulator-Elemente eventuell nicht primär in der Blockade von Enhancer-Promotor-Interaktionen verschiedener Schlingen, sondern vielmehr in der Erleichterung solcher innerhalb einer solchen, dient [291]. Dazu würde auch die Beobachtung passen, dass 85% aller CTCF-Bindestellen innerhalb von TADs lokalisiert sind [262], die dort weitere Promotor-Enhancer-Interaktionen vermitteln könnten.

1.2.2 Transkriptionsfaktoren

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Transkriptionsfaktoren um Proteine, die an spezifische, als Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) bezeichnete, DNA-Motive binden. Im Anschluss an ihre DNA-Bindung spielen sie über eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, wie beispielsweise die Rekrutierung von Koaktivatoren und Korepressoren oder die Regulation des Methylierungsmusters von DNA und Histonen (siehe unten), eine zentrale Rolle bei der Regulation der Transkription.

Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten Transkriptionsfaktoren näher eingegangen. Dabei soll bereits hier darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den besprochenen Faktoren lediglich um durch Computeranalysen (vergleiche 3.5.2) vorhergesagte Interaktionspartner mit den in dieser Arbeit untersuchten TFBS handelt, die bisher nicht durch weitere Experimente bestätigt wurden. Es ist daher gut möglich, dass eine oder mehrere der untersuchten TFBS ihre Wirkung durch Bindung gänzlich anderer Faktoren vermitteln. Erschwerend kommt hinzu, dass von den meisten der hier besprochenen Faktoren eine unübersichtliche Anzahl an Homologen und Splicevarianten existiert, die sich meist kaum im

Bindungsverhalten wohl aber in ihrer Funktionsweise unterscheiden. Obgleich also Aussagen über die Rolle dieser Faktoren an der Transkriptionsregulation von *Lmcd1* mit einiger Unsicherheit behaftet sind, wird davon ausgegangen, dass ein Überblick über deren Funktionsweise für das weitere Verständnis dieser Arbeit nützlich ist.

1.2.2.1 CREB-Familie

Die zu dieser Gruppe gehörenden Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch die Bindung eines gemeinsamen DNA-Motivs aus, das als cAMP-response Element (CRE) bezeichnet wird und die palindromische Konsensussequenz TGACGTCA besitzt [295], die als Homo- oder Heterodimer gebunden wird. Mitglieder dieser Gruppe sind das cAMP-response Element Binding Protein (CREB), der cAMP-response Element Modulator (CREM) und der Activating Transcription Factor 1 (ATF-1) [296]. Gemeinsame strukturelle Merkmale sind die C-terminal gelegene Basic Leucine Zipper (bZIP) Domäne, über die sowohl die DNA-Bindung als auch die Dimerisierung vermittelt wird [297] sowie eine N-terminale Aktivierungsdomäne, die wiederum aus einer Kinase-induzierbaren Domäne (KID) und ein bis zwei flankierenden Glutamin-reichen-Domänen (Q1 und Q2) besteht [296].

Obwohl zumindest von CREB [298] und CREM [299] Varianten bzw. Isoformen existieren, die eine hemmende Wirkung auf die Transkription entfalten, steht im Allgemeinen die Aktivierung der Genexpression im Vordergrund. Dabei scheint CREB der dominierende Faktor zu sein: während ATF-1-defiziente Mäuse keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigen [300] und CREM vor allem während der Spermatogenese eine Rolle zu spielen scheint [301], versterben Mäuse, denen jegliche aktivierende CREB-Isoform fehlt, perinatal [302].

Im Folgenden soll daher nur auf CREB näher eingegangen werden.

1.2.2.1.1 CREB

CREB ist ein ubiquitär exprimiertes Protein [303], von dem durch Splicevariation hauptsächlich die drei Isoformen α , β und δ gebildet werden [304,305].

Genomweite Untersuchungen haben gezeigt, dass im menschlichen Genom ca. 750.000 CREs existieren, von denen allerdings nur ein kleiner Teil durch CREB gebunden wird und ein noch kleinerer Teil tatsächlich zu einer Steigerung der Genexpression führt [303]. Dies wird darauf zurückgeführt, dass ein Großteil der nicht in Promotornähe befindlichen DNA-Regionen methyliert vorliegt und die Methylierung des im CRE enthaltenen CG-Dinukleotids die Bindung von CREB verhindert [306]. Weiterhin scheint nach der Aktivierung des gebundenen CREB für eine Genaktivierung das Vorhandensein einer TATA-Box im Bereich des Kernpromotors notwendig zu sein [307].

Die Aktivierung von DNA-gebundenem CREB erfolgt durch Phosphorylierung an Ser-133 innerhalb der KID und führt zu einer Rekrutierung des Koaktivators CBP [308]. CBP fungiert einerseits als Histonacetyltransferase (vergleiche 1.2.3.2) und ist andererseits in der Lage direkt mit TFIIB zu interagieren und führt so zu einer Steigerung der Genexpression [70].

Ob mit der Phosphorylierung an Ser-133 auch eine gesteigerte Affinität zum CRE-Konsensusmotiv einhergeht wird von verschiedenen Quellen unterschiedlich berichtet [309,310], es wird aber davon ausgegangen, dass CREB bereits vor der Aktivierung gebunden an die DNA vorliegt.

Unabhängig vom Phosphorylierungsstatus interagiert CREB über die Q2-Domäne zusätzlich konstitutiv mit TFIID und fördert so die Ausbildung des PIC [87,311].

Die Beendigung des aktivierenden Signals erfolgt entsprechend durch die Dephosphorylierung von Ser-133 durch die Proteinphosphatasen 1 (PP1) [312] und 2A (PP2A) [313]. Für die effektive Wirkung von PP1 scheint diese auf die Histondeacetylase 1 (HDAC1) angewiesen zu sein, die im Komplex mit PP1 über die Q1- und Q2-Domäne an CREB bindet, PP1 so in Substratnähe bringt und möglicherweise ebenfalls an der Deacetylierung der durch p300/CBP modifizierten Histone beteiligt ist [314].

Die aktivierende Phosphorylierung an Ser-133 kann über verschiedene Signalwege realisiert werden: am besten untersucht und wahrscheinlich von der größten Bedeutung ist die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) infolge einer intrazellulären cAMP-Erhöhung [315], die unter anderem nach hormoneller Stimulierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, beispielsweise durch Katecholamine [316] auftritt oder in vitro durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase mittels Forskolin [317] hervorgerufen werden kann.

Weitere Signalwege, die zu einer Phosphorylierung von Ser-133 führen, laufen zum Beispiel getriggert durch Wachstumsfaktoren über Ras und p38 [318] oder infolge einer intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung über die Calmodulin-abhängigen Kinasen I, II und IV ab [319,320].

Es muss allerdings angemerkt werden, dass funktionelle posttranslationale Modifikationen von CREB noch an einer Vielzahl weiterer Aminosäurereste beobachtet werden, die zu einer zusätzlichen Modulation der CREB-Aktivität führen können: so ist zumindest in einigen Zellen für eine Aktivierung durch CREB zusätzlich zur Phosphorylierung von Ser-133 noch jene von Ser-129 notwendig [321], während die Phosphorylierung von Ser-142 zu einer verringerten Aktivität führt [320].

Eine weitere Modulation der CREB-Aktivität erfolgt über die Proteinfamilie der CREB-regulated Transcription Coactivators (CRTC), deren Mitglieder CRTC 1-3 die Aktivität von CREB durch Assoziation mit der bZIP-Domäne und Verstärkung der Interaktion mit CBP

steigern [322]. Dafür ist allerdings die vorherige Dephosphorylierung der sonst im Zytoplasma lokalisierten Proteine zum Beispiel durch Calcineurin notwendig, welche ebenfalls durch intrazelluläre cAMP- und Ca^{2+} -Erhöhung stimuliert wird und die nachfolgende Translokation in den Nukleus ermöglicht [323].

1.2.2.2 MEF2-Familie

Die Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)-Familie besteht aus den vier Mitgliedern MEF2A-D und wird ihrerseits zur Familie der MADS-Box-Transkriptionsfaktoren gezählt [324]. Entsprechend besitzen alle vier MEF2 Proteine eine konservierte N-terminale MADS-Domäne und eine direkt daran angrenzende MEF2-Domäne, die gemeinsam sowohl der Homo- bzw. Heterodimerisierung innerhalb der MEF2-Familie als auch der Erkennung und Bindung (als Dimer) des Konsensusmotivs YTAWWATAR [325] dienen [326]. Zusätzlich werden über die MADS- und MEF2-Domänen ein Großteil der Interaktionen mit Koaktivatoren bzw. Korepressoren vermittelt.

C-terminal davon liegen zwei sogenannte Transcription Activation Domains, die zwar nicht an der Bindung der DNA bzw. der Dimerisierung beteiligt, aber für die Regulation der Transkription ebenso notwendig sind [326], einerseits über die Interaktion mit anderen Proteinen und andererseits als Ziel für posttranslationale Modifikationen (siehe unten).

Die Beeinflussung der MEF2-Aktivität durch stromaufwärts gelegene Signalwege scheint vor allem durch Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaMK) sowie verschiedene MAP-Kinasen wie p38 und ERK-5 zu erfolgen: im inaktiven Zustand bindet MEF2 zwar an die DNA, rekrutiert aber über die MADS-Domäne zusätzlich Repressoren wie die Klasse II Histondeacetylasen 4 (HDAC4) und 5 (HDAC5) [327], die ihrerseits weitere Repressoren wie CtBP und Histondeacetylasen der Klasse I rekrutieren [328] oder zu einer Sumoylierung von MEF2 mit ebenfalls inhibierender Wirkung führen [329]. Infolge einer Aktivierung des CaMK-Signalweges kommt es zu einer Phosphorylierung von HDAC4 und 5 durch CaMK I, II und IV mit nachfolgender Dissoziation von MEF2 [330,331]. Neben der Assoziation mit Koaktivatoren der Transkription (siehe unten) erlaubt dies die vollständige Aktivierung von MEF2 durch p38-vermittelte Phosphorylierung der Transcription Activation Domains [327,332]. Dies ermöglicht die nachfolgende Rekrutierung des Methyltransferasekomplexes Ash2L und führt so zur Ausbildung der Histonmodifikation H3K4me3 [333], die mit einer Aktivierung der Genexpression assoziiert ist (vergleiche 1.2.3.2).

Zusätzlich spielt bei der Transkriptionsaktivierung über MEF2 auch der Signalweg über Calcineurin eine Rolle: sowohl indirekt über die Dephosphorylierung von NFAT, der nach

Translokation in den Nukleus und Assoziation mit MEF2 zu einer vereinfachten Rekrutierung von p300 (siehe unten) führt [334], als auch direkt über die Dephosphorylierung von MEF2 [335,336]. Der Mechanismus, über den die direkte Calcineurin-Wirkung zu einer Transkriptionsaktivierung führt, ist ebenso wie der genaue Ort der Dephosphorylierung noch unklar: so wird von einer gesteigerten DNA-Affinität berichtet [335], die Wu et al. allerdings nicht bestätigen konnten und stattdessen eine Modulation über die Transcription Activation Domains postulieren [336], die dann aber andere Aminosäurereste als Ziel haben müsste als p38 (siehe oben).

Stromabwärts vermittelt MEF2 seine regulierenden Einflüsse über die Interaktion mit einer Vielzahl weiterer Proteine [337]: Neben den oben bereits angesprochenen Repressoren, die beispielsweise über eine Behinderung der Interaktion mit Koaktivatoren oder eine Deacetylierung von Histonen wirksam werden, interagiert MEF2 mit einer Reihe stimulatorisch wirkender Proteine: so zum Beispiel mit P-TEFb mit anschließender Transkriptionsaktivierung [338] vermutlich über eine Aufhebung des pausierten Zustandes während der Elongation (vergleiche 1.1.3.2). Weiterhin führt die direkte Interaktion mit p300 [339] über eine Acetylierung von MEF2 zu einer gesteigerten Affinität zur DNA [340], an der zusätzlich die Acetylierung von Histonen durch p300 (vergleiche 1.2.3.2) oder die Interaktion von p300 mit dem PIC [70] beteiligt sein könnten. Ebenso konnte eine direkte Interaktion mit synergistischer Aktivierung der Transkription für Sp1 gezeigt werden [341].

Weitere prominente Interaktionspartner, mit denen MEF2 bei der Transkriptionsaktivierung zusammenwirkt, umfassen MyoD und Myogenin [342].

1.2.2.3 Nuclear Factor 1-Familie

Zur Familie der Nuclear Factor 1-Transkriptionsfaktoren (NF1) in Wirbeltieren zählen vier Mitglieder, die als NF1-A, NF1-B, NF1-C und NF1-X bezeichnet werden [343,344] und als Homo- oder Heterodimer die palindromische Konsensussequenz TTGGCN₅GCCAA binden [345]. Mit etwas geringerer Affinität werden auch die Halbmotive TTGGC bzw. GCCAA erkannt [345]. Strukturell zeichnet sich NF1 durch eine N-terminal gelegene DNA-Bindungs- und Dimerisierungs- sowie eine C-terminal gelegene Prolin-reiche Aktivierungsdomäne aus [346]. Teile dieser Aktivierungsdomäne, vor allem diejenige von NF1-C, zeigen Ähnlichkeit zur CTD der RNA Polymerase II und es wurde gezeigt, dass NF1 in analoger Weise in der Lage ist Kontakt zu TBP aufzunehmen (vergleiche 1.1.1.1) [347]. Interessanterweise konnte eine andere Arbeitsgruppe zwar eine Rekrutierung von TFIIB durch NF1 mit konsekutiver Transkriptionsaktivierung nachweisen, aber keine Interaktion mit TBP finden [348].

Als weiterer Mechanismus wird eine Rolle beim Remodelling der Chromatinstruktur diskutiert: so wurde gezeigt, dass NF1 einerseits direkt mit Histon H3 interagiert [349] und andererseits an der Rekrutierung des Chromatin-modifizierenden BRG1-Komplexes beteiligt ist, der eine Öffnung der Chromatinstruktur ohne Veränderung der Nukleosomenpositionierung bewirkt [350]. Zusätzlich wird postuliert, dass die DNA-Bindung von NF1 zu einer Verdrängung von Nukleosomen mit Erzeugung von Nucleosome Depleted Regions führt [351].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von NF1 vom Grad seiner Phosphorylierung abhängt, wobei eine durch Calcineurin hervorgerufene Dephosphorylierung mit einer erhöhten Transkriptionsaktivierung einhergeht [352,353]. Die gleiche Arbeit zeigte außerdem eine Steigerung der NF1-Aktivität durch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Kinase IV [352], wobei der genaue Mechanismus unklar bleibt, NF1 als direktes Ziel aber unwahrscheinlich ist.

1.2.2.4 Nuclear Factor Y

Nuclear Factor Y (NF-Y) ist ein Trimer bestehend aus den drei Untereinheiten NF-YA, NF-YB und NF-YC [354–356], die ein als CCAAT-Box bezeichnetes DNA-Motiv mit der Konsensussequenz RRCCAATSRC binden [357]. Dabei ist zu beachten, dass einige weitere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel das CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP), einen Hinweis auf das CCAAT-Motiv im Namen tragen, aber typischerweise andere Sequenzen binden und daher hier nicht besprochen werden [355].

Wenngleich für die Funktion von NF-Y das intakte Pentanukleotid CCAAT fast immer notwendig zu sein scheint [357], existieren Ausnahmen, bei denen die Funktion von NF-Y im Zusammenspiel mit einem imperfekten CCAAT-Motiv durch Interaktion mit benachbart gebundenen Transkriptionsfaktoren wie Sp1 aufrechterhalten wird [358].

Das CCAAT-Motiv befindet sich typischerweise in einem Bereich von -50 bis -100bp in Relation zum Transkriptionsstart [359] und kommt in ca. 30% aller eukaryontischen Promotoren in ein- oder mehrfacher Ausführung vor [207]. Dabei korreliert das Vorkommen eines CCAAT-Motivs positiv mit dem Auftreten von CpG-Inseln und negativ mit dem Vorhandensein einer TATA-Box [359].

Sowohl NF-YA als auch NF-YC enthalten eine Glutamin-reiche Aktivierungsdomäne [360], die vor allem an der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt zu sein scheinen [361].

Über posttranslationale Modifikationen von NF-Y ist insgesamt wenig bekannt, von Bedeutung ist aber die Acetylierung bestimmter Lysinreste von NF-YA durch p300, wodurch dessen

Ubiquitinylierung und somit der Abbau verhindert wird, so dass trotz relativ konstanter mRNA Spiegel eine Regulation von NF-Y über dessen Proteinmenge ermöglicht wird [362].

Weiterer Interaktionspartner von NF-Y ist der Transkriptionsfaktor Sp1 (siehe auch 1.2.2.5) [363], deren kostimulatorische Wirkung unter anderem auf die gegenseitige Stabilisierung der DNA-Bindung zurückgeführt wird [358]. Zusätzlich ist NF-Y in der Lage direkten Kontakt mit TBP [364] und weiteren Untereinheiten von TFIID aufzunehmen [365].

Neben diesen „gewöhnlichen“ Funktionsmechanismen wird für NF-Y noch eine weitere Art der Transkriptionsregulation diskutiert, die sich funktionell von der anderer Transkriptionsfaktoren unterscheidet. So weisen NF-YB und NF-YC als weiteres Strukturmerkmal jeweils eine Histone Fold Domäne auf, die einerseits der Interaktion untereinander dient und andererseits die Interaktion mit einem Tetramer der Histone H3 und H4 $(H3/H4)_2$ ermöglicht [366]. Normalerweise verbindet sich dieses Heterotetramer mit zwei Dimeren aus H2A und H2B zu einem vollständigen Histonoktamer mit dichter Verpackung der DNA und konsekutiver Behinderung der Transkription (vergleiche 1.2.3.2). Diese Beobachtung hat zu der Theorie geführt, dass NF-Y über die Bindung an $(H3/H4)_2$ in der Lage sein könnte, die Ausbildung des Histonoktamers zu verhindern und auf diesem Wege zur Ausbildung von Nucleosome Depleted Regions beizutragen [366,367] wie sie in Promotorregionen üblich sind (siehe 1.2.1.1).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass NF-Y an der Rekrutierung von Histon-Methyltransferasen und darüber an der Ausbildung der mit aktiven Promotoren assoziierten Histonmodifikation H3K4me3 beteiligt ist [368].

Obwohl auch bei NF-Y die transkriptionsfördernde Wirkung im Vordergrund steht, ist ebenfalls eine inhibierende Modulation beschrieben, beispielsweise über die Rekrutierung von Histondeacetylasen [369]. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Vorgängen, scheint NF-Y an negativ regulierten Promotoren außerdem an der Ausbildung von mit Inaktivität assoziierten Histonmodifikationen und einer Reduzierung an H3K4me3 beteiligt zu sein [368].

1.2.2.5 Sp/KLF-Familie

Zu dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren zählen insgesamt 26 Proteine (Sp1-9 und KLF1-17) [370], die sich durch eine konservierte DNA-Bindungs-Domäne bestehend aus drei benachbarten Zinkfinger-Motiven auszeichnen [371] und daher mit leicht unterschiedlicher Affinität ähnliche DNA-Sequenzen binden. Obwohl Mitglieder der Sp-Familie scheinbar eine Bevorzugung des Bindungsmotivs GGGCGGG zeigen, während die Faktoren der KLF-Gruppe bevorzugt an die Sequenz CACCC binden [372,373], ist diese Unterscheidung keinesfalls

absolut, so dass das tatsächliche Bindungsverhalten an spezifischen DNA-Sequenzen vermutlich stark vom Kontext, also beispielsweise vom Mengenverhältnis der einzelnen Faktoren, abhängig ist.

Mit geringerer Affinität werden außerdem Variationen der bevorzugten Motive, wie beispielsweise die für diese Arbeit relevante Sequenz GGGAGGG gebunden [374].

Da eine einzelne Besprechung sämtlicher Faktoren an dieser Stelle nicht möglich ist, soll im Folgenden lediglich auf das prominenteste Mitglied der Familie, nämlich Sp1, näher eingegangen werden, für welches, neben KLF4 und KLF5, in der Computer-gestützten Analyse (siehe 3.5.2) außerdem die höchste Affinität zu der in dieser Arbeit untersuchten Bindestelle vorhergesagt wurde.

1.2.2.5.1 Sp1

Neben der oben bereits erwähnten N-terminal gelegenen DNA-Bindungs-Domäne besitzt Sp1 vier weitere funktionell relevante Bereiche [373]: zwei Glutamin-reiche Transaktivierungsdomänen, eine sogenannte Buttonhead-Box und eine inhibitorische Domäne. Die Transaktivierungsdomänen vermitteln unter anderem die direkte Interaktion mit TBP [375] und weiteren Untereinheiten von TFIID [86] und sind zusätzlich zusammen mit der Buttonhead-Box an der Interaktion mit p300 beteiligt [376]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass p300 vor allem mit der deacetylierten Form von Sp1 interagiert und dann, möglicherweise über eine Acetylierung von Histonen, zu einer Stimulation der Transkription führt. Parallel dazu acetyliert p300 aber auch Sp1 und führt so zu einer Selbstlimitierung der Interaktion [377]. Acetyliertes Sp1 interagiert wiederum bevorzugt mit der Histondeacetylase HDAC1 mit konsekutiver Hemmung der Transkription (vergleiche 1.2.3.2) sowie Deacetylierung von Sp1, so dass eine potentiell zyklische Regulation von Sp1 resultiert [377]. Weiterhin interagiert Sp1 direkt mit BRG1 [378] und kann auf diese Weise ähnlich wie NF1 (vergleiche 1.2.2.3) zu einer Aktivierung der Transkription beitragen [379].

Zusätzlich ist eine Vielzahl von synergistischen Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF-Y [380] beschrieben. Außerdem scheint der Mediator-Komplex eine elementare Rolle bei der Transkriptionsaktivierung durch Sp1 zu spielen, die aber vermutlich indirekter Natur ist, da eine direkte Interaktion nicht gezeigt werden konnte [381].

Neben der oben angesprochenen Acetylierung ist Sp1 Ziel einer Reihe weiterer posttranslationaler Modifikationen [382]: so geht die Sumoylierung mit einem vermehrten Abbau von Sp1 einher [383], während die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen wie

ERK-1 und ERK-2 [384] oder p38 [385], sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Effekte entfalten kann. Ebenso kann eine Aktivierung der Proteinkinase A zumindest indirekt zu einer Zunahme der Sp1-vermittelten Transkriptionsaktivität führen [386].

Weiterhin scheint Sp1 einerseits an der Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung von CpG-Inseln beteiligt zu sein [387], während eine DNA-Methylierung andererseits zumindest indirekt mit einer verringerten Bindung von Sp1 einhergeht [388,389].

1.2.2.6 Virusprotein 16

Beim Virusprotein 16 (VP16) handelt es sich um einen starken transkriptionalen Koaktivator, der von der Gruppe der Herpesviren gebildet wird [390]. Funktionell besteht es aus einer Core-Domäne, die die Bindung an DNA vermittelt [391] sowie einer Transaktivierungsdomäne, die eine Vielzahl von an der Transkription beteiligten Proteinen rekrutiert, darunter einen Großteil der basalen Transkriptionsfaktoren [390], den Mediator-Komplex [157] sowie mehrere Histonacetylasen wie p300 [392] und den SAGA-Komplex [393].

Diese Transaktivierungsdomäne ist für diese Arbeit von Relevanz, da sie Teil des verwendeten Fusionsproteins MEF2C-VP16 ist. Dieses besteht aus der DNA-Bindedomäne von MEF2C und der Transaktivierungsdomäne von VP16 und zeigt in in vitro Experimenten eine um knapp 60% gesteigerte Transkriptionsaktivierung im Vergleich zum MEF2C-Wildtyp [326].

1.2.3 Epigenetische Regulationsmechanismen

Als epigenetisch werden Einflüsse auf den Phänotyp bezeichnet, die nicht auf der Basenabfolge der DNA, also dem Genotyp, beruhen. Für die Transkription sind vor allem die DNA-Methylierung sowie die posttranslationale Modifikation von Histonen von Relevanz.

1.2.3.1 DNA Methylierung

Unter DNA-Methylierung wird die, reversible und durch Methyltransferasen vermittelte, epigenetische Modifikation eines Nukleotids durch Methylierung verstanden, die bei Säugetieren fast ausschließlich Cytosin betrifft [394] und zur Bildung von 5-Methylcytosin (5mC) führt [395]. Im menschlichen Genom liegen etwa 5% aller Cytosinnukleotide in methyliertem Zustand vor und zwar zum Großteil an Positionen an denen Cytosin gefolgt von Guanin lokalisiert ist (CpG bzw. mCpG) [396]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mutationen der DNA gehäuft methylierte Cytosinreste betreffen, was auf die spontane Deamination von 5mC zu Thymin zurückgeführt wird [397]. Da Thymin ein regulärer Baustein der DNA ist, werden solche Mutationen mit geringerer Wahrscheinlichkeit korrigiert als die spontane Deamination von nicht-methyliertem Cytosin, die zur Bildung von Uracil führt. Die

beobachtete Unterrepräsentation von CpG-Dinukleotiden im Genom stützt diese These [398]. Allerdings existieren genomische Bereiche in denen CpG-Dinukleotide zum Großteil unmethyliert vorliegen, daher einer geringeren Mutationsrate unterliegen und so zu einer relativen Überrepräsentation an CpG im Vergleich zum übrigen Genom führen [398]. Solche Bereiche werden als CpG-Inseln bezeichnet und spielen eine bedeutende Rolle bei der Transkription (siehe unten).

Zunächst ging man davon aus, dass die DNA-Methylierung generell zu einer Stilllegung der im entsprechenden Bereich lokalisierten Gene führt. Als mögliche Mechanismen kommen dabei zum Beispiel die durch Methylierung induzierte Destabilisierung der Nukleosomen [399] oder eine verringerte Bindung vieler Transkriptionsfaktoren wie Sp1 [400] oder CREB [306] in Frage. Entgegen den ursprünglichen Annahmen hat sich aber gezeigt, dass die Stilllegung der Gene der Methylierung vorausgeht [401] und die DNA-Methylierung in einigen Fällen auch zu einer gesteigerten Transkription führen kann: so führt beispielsweise die Methylierung des CRE-Motivs zwar zu einer reduzierten Bindung von CREB dafür aber zu einer gesteigerten Affinität für C/EBP mit potentiell stimulierender Wirkung auf die Transkription [402].

1.2.3.1.1 CpG-Inseln

Als CpG-Inseln (CGI) werden DNA-Abschnitte definiert, die einen GC-Gehalt von über 50% aufweisen und mindestens 200bp lang sind [403]. Es wurde gezeigt, dass 60-70% der humanen Promotoren mit CGI überlappen [404,405] und dass sich diese Promotoren durch einen Mangel an herkömmlichen Kernpromotorelementen sowie eine zerstreute Transkriptionsinitiation auszeichnen (vergleiche 1.2.1.1.3). Die Art und Weise, in der es an solchen Promotoren zur Transkriptionsinitiation kommt, ist nicht abschließend geklärt, folgende Mechanismen scheinen aber eine Rolle zu spielen: CGI beinhalten vermehrt Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und CREB, deren Erkennungssequenzen CpG-Dinukleotide enthalten [406]. Desweiteren weisen CGI von sich aus eine geringere Dichte an Nukleosomen auf, wofür ebenfalls der hohe GC-Gehalt verantwortlich zu sein scheint [399]. Zwar weisen CGI-ähnlich wie nicht-CGI-Promotoren häufig die Histonmodifikation H3K4me3 auf, unterscheiden sich aber von nicht-CGI-Promotoren durch einen Mangel der Modifikation H3K36me2, die mit einer Hemmung der Transkriptionsinitiation assoziiert ist [407].

Zusammengenommen deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass CpG-Inseln einen für die Initiation permissivem Zustand herbeiführen bzw. aufrechterhalten, der eine hohe basale Initiationsrate erlaubt und die Transkriptionsrate eher in nachfolgenden Abschnitten, zum Beispiel via P-TEFb während der Elongation, reguliert wird [408].

Passend dazu finden sich unter den Genen, deren Promotoren CGIs aufweisen, ein Großteil der Housekeeping-Gene [409].

Parallel dazu häufen sich Hinweise darauf, dass es häufig auch an CpG-Inseln, die nicht mit dem Transkriptionsstart eines kodierenden Gens überlappen (ca. 50% aller CGI [405]) zur Transkriptionsinitiation durch die RNA Polymerase II mit konsekutiver Synthese von ncRNA kommt [405]. Interessanterweise sind auch diese als Orphan-CGIs bezeichneten Bereiche ähnlich wie herkömmliche Promotoren mit der Histonmodifikation H3K4me3 assoziiert [405].

1.2.3.2 Histonmodifikationen

Die DNA im Zellkern einer jeden Zelle ist in Chromosomen organisiert, die wiederum aus Chromatin, also einem linearen DNA-Strang im Komplex mit assoziierten Proteinen, bestehen. Etwa die Hälfte dieser Proteine sind Histone, die sich in 5 Klassen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) unterscheiden lassen, wobei sich jeweils zwei Moleküle der Klassen H2A, H2B, H3 und H4 zu einem Oktamer zusammenlagern, dass von 146bp linearer DNA umwickelt wird [410]. Diese Einheit aus DNA und Histonen wird als Nukleosom bezeichnet und wiederholt sich in relativ dichter Abfolge, so dass im Schnitt etwa ein Nukleosom pro 200bp resultiert [411] und dient unter anderem der kompakten Verpackung der DNA. Nukleosomen stellen ein Hindernis der Transkription dar, dessen Ausmaß mit zunehmendem Grad der Kompaktierung zunimmt [257].

Einen wesentlichen Regulationsmechanismus der Transkription auf Ebene der Nukleosomen stellt die posttranslationale Modifikation der Histone dar: So führt die Acetylierung positiv geladener Lysinreste, beispielsweise durch p300 [279] oder TFIID [84], vermutlich über eine Neutralisierung der Ladung zu einer weniger engen Verpackung der DNA [412] und darüber zu einer Steigerung der Transkriptionsrate [257].

Eine weitere häufige Modifikation stellt die Methylierung von Lysin- oder seltener Argininresten dar. Diese sind in Bezug auf die Ladung neutral, dafür aber in der Lage Effektorproteine, die die entsprechenden Modifikationen erkennen, zu rekrutieren. So führt die Rekrutierung von Histondeacetylasen durch die Methylierung von H3K36 zu einer Inhibition der Transkription [413] während die Trimethylierung von Histon 3 an Lysin 4 (H3K4me3), die vor allem mit aktiven Promotoren assoziiert ist [264], durch TFIID [85] und andere Aktivatoren der Transkription erkannt wird [414].

Es bleibt aber festzuhalten, dass die Auswirkungen einzelner Modifikationen kontextabhängig zu sein scheinen: so kann beispielsweise das Merkmal H3K4me3 über eine Rekrutierung von

Histondeacetylasen auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Genexpression ausüben [415].

1.3 LIM and cysteine-rich domains 1 (Lmcd1)

Bei Lmcd1 handelt es sich um ein erstmals im Jahr 2000 beschriebenes Protein [416], das auch als Dyxin bezeichnet wird. Strukturell zeichnet es sich neben einer N-terminalen Cysteinreichen Domäne durch zwei C-terminale LIM-Domänen sowie eine dazwischen gelegene PET-Domäne aus und wird daher zur Gruppe der LIM-Proteine gezählt [416,417]. LIM-Domänen weisen Ähnlichkeiten zu Zinkfinger-Domänen auf, weshalb zunächst über eine mögliche Funktion als DNA-Bindungsdomäne spekuliert wurde [418]. Es hat sich allerdings gezeigt, dass Lmcd1, ähnlich wie andere LIM-Proteine [419,420], vor allem an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist [421,422].

Lmcd1 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, die höchsten Expressionslevel zeigen sich allerdings in Herzmuskel und quergestreifter Muskulatur [416]. Entsprechend erfolgte die funktionelle Charakterisierung von Lmcd1 vor allem im kardialen Kontext wobei eine zentrale Rolle bei der Regulation der pathologischen Herzhypertrophie herausgearbeitet wurde, die im Folgenden genauer beleuchtet werden soll.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Behandlung mit prohypertrophen Stimuli zu einer kardialen Hypertrophie führt, die mit einer Überexpression von Lmcd1 einhergeht [421,423]. Diese Überexpression ließ sich sowohl in vitro, bei Stimulation von neonatalen ventrikulären Rattenherzmuskelzellen (NRVCM) durch dynamischen Stretch oder Phenylephrin (PE) [421] als auch in vivo an Mäusen durch Aortic Banding [421,423] sowie an Calcineurin-Transgenen Tieren [421] demonstrieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Lmcd1 in vitro zu einem kompletten Verlust der hypertrophen Antwort als Folge einer Stimulierung von NRVCM mit PE oder Stretch führt [421].

Weiterhin ist die alleinige Überexpression von Lmcd1 sowohl in vitro als auch in vivo ausreichend, um eine kardiale Hypertrophie hervorzurufen [421].

Obwohl der genaue Mechanismus über den Lmcd1 seine prohypertrophen Wirkungen entfaltet nicht geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass der Calcineurin-Signalweg entscheidend beteiligt ist: einerseits führt die Überexpression von Lmcd1 direkt zu einer Aktivierung dieses Signalweges [421,423] und andererseits führte die Behandlung mit Ciclosporin A, einem Hemmer von Calcineurin, zu einer Reduzierung der Hypertrophie in Lmcd1-Transgenen Mäusen [423].

Bei Calcineurin handelt es sich um eine im Zytosol lokalisierte Serin-Threonin-Phosphatase,

die infolge erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel Calmodulin-abhängig aktiviert wird [424] und über die folgende Dephosphorylierung von NFAT zu einer Aktivierung des hypertrophen Genprogrammes führt [425]. Zwar konnte keine direkte Interaktion zwischen Lmcd1 und Calcineurin nachgewiesen werden [421], allerdings wurde mittels Ko-Immunpräzipitation eine gemeinsame Lokalisierung der beiden Proteine gezeigt [423]. Da in NRVCM sowohl Lmcd1 als auch Calcineurin an der kardialen Z-Scheibe vorkommen [421], postulierten Frank et al. einen indirekten Einfluss auf die Calcineurin-Aktivität [421].

Im Gegensatz zu der rein zytosolischen Lokalisierung in NRVCM scheint Lmcd1 in anderen Zellreihen wie HEK-Zellen zusätzlich im Zellkern vorzukommen und über die Interaktion mit GATA-6 einen direkten Einfluss auf die Genexpression auszuüben [422].

Andere prohypertrophe Signalwege beispielsweise über Akt/PKB, ERK-1 und ERK-2, p38 oder die Glykogensynthase-Kinase β werden durch Lmcd1 nicht beeinflusst [421]. Umgekehrt scheint p38 allerdings an der nach Behandlung mit prohypertrophen Stimuli beobachteten Überexpression von Lmcd1 beteiligt zu sein [426].

Außerhalb des kardialen Kontextes wurden Mutationen von Lmcd1 zuletzt auch mit einer vermehrten Neigung zur Metastasenbildung beim hepatozellulären Karzinom in Verbindung gebracht [427].

1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Im Rahmen einer Expressionsanalyse von Kardiomyozyten in vitro identifizierten Frank et al. Lmcd1 erstmals als ein Protein, das sowohl durch biomechanische Dehnung als auch durch Stimulation mit Phenylephrin vermehrt exprimiert wird [428]. Die nachfolgende Charakterisierung von Lmcd1 in kardialen Hypertrophie modellen sowohl in vivo als auch in vitro führte zur Identifizierung der bereits in Abschnitt 1.3 geschilderten essentiellen Funktion bei der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie als Reaktion auf verschiedene Stimuli. Zwar konnten die Signalwege und Interaktionspartner, über die Lmcd1 seine Wirkung entfaltet noch nicht in allen Details identifiziert werden, die gewonnenen Erkenntnisse erlauben aber dennoch einen guten Einblick in die von Lmcd1 stromabwärts hervorgerufenen Veränderungen bei der Hypertrophieentstehung.

Im Gegensatz dazu ist über die Regulation der Genexpression von Lmcd1 selbst, insbesondere über die Transkriptionsfaktoren, die stromabwärts der entsprechenden stimulierenden Signale wie PE oder Aortic Banding, an der Steigerung der beobachteten Genexpression von Lmcd1 beteiligt sein könnten, kaum etwas bekannt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Expressionsregulation von Lmcd1 auf Ebene der Transkription. Dazu wurde die Promotorregion (Definition siehe 1.2.1.1) von Lmcd1 systematisch untersucht und funktionell relevante DNA-Abschnitte identifiziert, um auf dieser Basis Rückschlüsse auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren ziehen zu können und somit eine erste Theorie zur Regulation der basalen und durch prohypertrophe Stimuli getriggerten Expression von Lmcd1 aufstellen zu können. Dabei wurde besonderer Fokus auf die Analyse des proximalen Promotors gelegt, während die Analyse des Kernpromotors nur oberflächlich erfolgte und als solche verstanden werden sollte.

2 Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Autoklav DB-23	Systec
Autoklav VX-65	Systec
Bioflex Kulturplatte, Kollagen-I-beschichtet, 6-Well	Bioflex
Bunsenbrenner Fireboy	Integra Biosciences
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	Thermo Fisher Scientific
CO ₂ -Inkubator Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific
Elektrophoresekammern Sub-Cell	Bio-Rad
Elektrophorese-Spannungsquelle Power Pack p25	Biometra
Elektropipette pipetus	Hirschmann
Elektroporationsküvette	Cell Projects
Falcon Cell Strainer 100µm	Corning
Feinwaage TE124S	Sartorius
Feinwaage TE1502S	Sartorius
Flexcell FX-5000 Tension System	Flexcell
Gefrierschrank -80°C Revco Value Plus	Thermo Fisher Scientific
Inkubator Heraeus B6060	Thermo Fisher Scientific
Klari-Flex Bottle Top Filtrationssystem	GE Healthcare
Lichtmikroskop Axiovert 40 C	Zeiss
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
MicroPulser Elektroporator	Bio-Rad
Mikrotiterplatten Cellstar, transparent, 6-, 12-, 24-Well	Greiner Bio One
Mikrotiterplatten Cellstar, weiß, 96-Well	Greiner Bio One
Mikrotiterplatten transparent 96-Well	Sarstedt
Mikrowelle Sharp R-340F	Sharp

Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Mikrozentrifuge Heraeus Pico 21	Thermo Fisher Scientific
Mikrozentrifuge MiniStar	VWR
Monochromator Infinite m200 Pro	Tecan
Pasteurpipetten Assistant 230mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt
Pipettenspitzen gestopft 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt
Probenröhrchen 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Röhrchen mit Belüftungsstopfen 13ml	Sarstedt
Schraubröhrchen 2ml	Sarstedt
Schraubröhrchen 50ml ohne/mit Fuß	Sarstedt
Seven Easy pH-Meter	Mettler-Toledo
Sicherheitswerkbank SterilGARD Hood	The Baker Company
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific
Spektrophotometer Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler MyCycler	Bio-Rad
Thermocycler T100	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferpipette 3,5ml	Sarstedt
Vakuumsauger VACUSAFE Comfort	Integra Biosciences
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific
Vortexmischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad SW22	Julabo
Wasserbäder, diverse	Gesellschaft für Labortechnik
Zellkulturflasche 75cm ²	Sarstedt
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific

2.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific
dNTPs	Thermo Fisher Scientific

DreamTaq Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific
EDTA $\geq 99\%$, p.a.	Carl Roth
Ethanol Rotipuran $\geq 99,8\%$, p.a.	Carl Roth
Ethidiumbromid 10mg/ml	Bio-Rad
Fötales Kälberserum	Biochrom
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Gibco Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Glycerin Rotipuran $\geq 99,5\%$, p.a., wassserfrei	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kollagen Typ 1-Lösung, bovin	BD Biosciences
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
L-Glutamin 200mM	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Lipofectamine 3000 Reagent	Invitrogen
Lipofectamine P3000 Reagent	Invitrogen
Magnesiumsulfat	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydroxid	AppliChem
Newborn Calf Serum	Thermo Fisher Scientific
Pancreatin	Sigma-Aldrich
PEG 4000 Solution 50%	Thermo Fisher Scientific
Percoll	Corning
Pfu-Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth
Puffer O 10x	Thermo Fisher Scientific
Salzsäure	Carl Roth
SDS	Serva Electrophoresis
T4 DNA Ligase Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific
TRIS Pufferan $\geq 99,9\%$, p.a.	Carl Roth
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich

2.3 Puffer

ADS Puffer 10x, pH 7,4, steril filtriert

Glukose	55,5 mM
HEPES	197,2 mM
KCl	53,6 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	8,3 mM
NaCl	1163,6 mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	94,2 mM

SNET Puffer

TRIS	20 mM, pH 8,0
EDTA	5 mM
NaCl	400 mM
SDS	1% (w/v)

TAE-Puffer 50x, pH 8,3

TRIS-Acetat	3 M
EDTA	50 mM

2.4 Medien

2.4.1 C2C12-Zellen

Vollmedium

DMEM mit 3,5 g/l NaHCO₃ und 4,5g/l Glukose (Biochrom)

FCS 10% (w/v)

Penicillin 100 u/l

Streptomycin 100 µg/ml

L-Glutamin 2 mM

Transfektionsmedium

DMEM mit 3,5 g/l NaHCO₃ und 4,5g/l Glukose (Biochrom)

L-Glutamin 2 mM

2.4.2 NRVC

Vollmedium

Advanced DMEM mit 4,5g/l Glukose und 110mg/l Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific)

FCS 10% (w/v)

Penicillin 100 u/l

Streptomycin 100 µg/ml

L-Glutamin 2 mM

Serumfreies Medium

Advanced DMEM mit 4,5g/l Glukose und 110mg/l Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific)

Penicillin 100 u/l

Streptomycin 100 µg/ml

L-Glutamin 2 mM

Transfektionsmedium 1

Advanced DMEM mit 4,5g/l Glukose und 110mg/l Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific)

L-Glutamin 2 mM

Transfektionsmedium 2

Advanced DMEM mit 4,5g/l Glukose und 110mg/l Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific)

FCS 10% (w/v)

L-Glutamin 2 mM

2.5 Kits

Dual Glo Luciferase Assay Kit

Promega

NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit

Macherey-Nagel

Pierce BCA Assay Kit

Thermo Fisher Scientific

QIAGEN Plasmid Maxi Kit

Qiagen

QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit

Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen

QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit

Agilent

2.6 Enzyme

Acc65I

Thermo Fisher Scientific

DreamTaq DNA Polymerase

Thermo Fisher Scientific

EcoRV

Thermo Fisher Scientific

Pfu DNA Polymerase

Thermo Fisher Scientific

Proteinase K

Thermo Fisher Scientific

T4 DNA Ligase

Thermo Fisher Scientific

2.7 Vektoren

pcDNA3.1	Invitrogen
pGL4.15	Promega
pGL4.27	Promega
pRL-TK	Promega

2.8 Primer

Sämtliche Primer wurden bei Eurofins MWG bestellt. Durch Zugabe der auf dem Synthesereport angegebenen Menge ddH₂O wurden die Primer über Nacht bei 4°C gelöst und so eine Stock-Lösung mit einer Konzentration von 100µM hergestellt. Vor der Verwendung erfolgte anschließend das Anlegen einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10µM. Die Primer wurden bei -20°C gelagert.

2.8.1 Primer zur Amplifizierung der Lmcd1-Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA

Für die Erzeugung der Promotorfragmente wurde ein gemeinsamer Reverse-Primer für alle Konstrukte gewählt, damit die verschiedenen Fragmente sich am 3'-Ende nicht unterscheiden. Entsprechend wurde der Forward-Primer für alle Konstrukte unterschiedlich gewählt. Um die spätere Klonierung zu erleichtern, wurden an den 5'-Enden der Primer jeweils zehn Basen angehängt, die nicht an die Ratten-DNA binden, aber jeweils eine Restriktionsenzymbindestelle auf beiden Seiten des PCR-Produktes einfügen. Sämtliche Forward-Primer enthalten daher am 5'-Ende die Erkennungssequenz für Acc65I (5'- GGTACC -3'). Der gemeinsame Reverse-Primer enthält eine Erkennungssequenz für EcoRV (5'- GATATC -3'). Um eine Erkennung dieser Schnittstellen zu garantieren, wurden weitere 4 Basen (GAGA) angehängt.

Lmcd1_Prom_R:	5'- GAGAGATATCCCTGGGGGTGCAGAACTAGCACC -3'
Lmcd1_Prom_41bp:	5'- GAGAGGTACCTAAAGCAGACCGCAGCGCGG -3'
Lmcd1_Prom_87bp:	5'- GAGAGGTACCACAGGCATTGGCTGGCCACG -3'
Lmcd1_Prom_208bp:	5'- GAGAGGTACCGGGCAGCCGGCTAAACTGACG -3'
Lmcd1_Prom_418bp:	5'- GAGAGGTACCGGACGAGGTGGTCAGAGAGCAC -3'
Lmcd1_Prom_478bp:	5'- GAGAGGTACCCTTACCCAGGTCAGCCGGGC -3'
Lmcd1_Prom_922bp:	5'- GAGAGGTACCGTCCTGTTGCACAGCACAACCTTTGA - 3'

Lmcd1_Prom_981bp: 5'- GAGAGGTACCCCGTCTCAAGCTCCTTCCCCTGG -3'

Lmcd1_Prom_1655bp: 5'- GAGAGGTACCCCAATTAATGTGCCCTGAGCTTCCC -3'

2.8.2 Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung in pGL4.15

Als Forward-Primer wurde der offiziell zur Sequenzierung von Konstrukten, die in den pGL4.15-Vektor kloniert wurden, empfohlene RvPrimer3 verwendet, der kurz vor Beginn der Multiple Cloning Site bindet. Der ausgewählte Reverse-Primer bindet am Beginn des Luciferase-Gens von pGL4.15, das direkt hinter der Multiple Cloning Site des Vektors liegt. Mit diesen beiden Primern war eine komplette Sequenzierung der eingefügten Promotorfragmente möglich, mit Ausnahme des 1655bp-Konstruktes, für das aufgrund seiner Länge ein zusätzlicher Sequenzierprimer notwendig wurde.

RvPrimer3: 5'- CTAGCAAAATAGGCTGTCCC -3'

pGL4_SeqR: 5'- GCATCTTCCATGGTGGCTTT -3'

Lmcd1_Prom_1655bp_SeqF: 5'- GGGCCAATTCTGATCTCACCT -3'

2.8.3 Primer für die Mutagenese der Transkriptionsfaktorbindestellen

Die Primer für die Mutagenese der putativen Transkriptionsfaktorbindestellen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers entworfen. Bei der Auswahl der zu mutierenden Basen erfolgte eine Orientierung an in der Literatur bereits beschriebenen Mutationen, in den meisten Fällen wurden diese aber angepasst, beispielsweise um im Rahmen der Mutation die Entstehung eines neuen Bindemotivs für einen anderen Transkriptionsfaktor zu verhindern. Die genutzten Quellen sind unten nach dem Namen des entsprechenden Forward-Primers angegeben. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die nach untenstehender Formel berechnete Schmelztemperatur T_m der Primer bei $\geq 78^\circ\text{C}$ lag.

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%_{GC}) - \left(\frac{675}{N}\right) - (\%_{mismatch})$$

Dabei beschreibt N die Basenanzahl des Primers und $\%_{GC}$ und $\%_{mismatch}$ den Anteil der Basen Guanin und Cytosin bzw. den Anteil der mutierten Basen im Primer.

Die Nomenklatur der verwendeten Primer wurde wie folgt festgelegt: Zu Beginn steht die Bezeichnung der zu mutierenden Bindestelle, gefolgt von der, relativ zum Transkriptionsstart, distalsten und proximalsten mutierten Base. Für den Fall, dass zwei Transkriptionsfaktorbindestellen so nah beieinanderliegen, dass die Mutageneseprimer für die eine Bindestelle die benachbarte Bindestelle überlappen und deswegen zur kombinierten

Mutation beider Bindestellen zusätzliche Primer notwendig waren, steht die bereits mutierte Bindestelle zuerst, gefolgt von der mit diesem Primer noch zu mutierenden Bindestelle. Für den Fall, dass der genannte Primer nur in einem bestimmten Promotorkonstrukt benutzt werden kann, weil die Bindestelle in diesem so dicht am Rand liegt, dass Teile des pGl4.15-Vektors im Primer enthalten sind, ist die Bezeichnung dieses Promotorkonstrukts nach der Lokalisation der Mutationsstellen angegeben.

CREB_191_186_208bp_F:

5'- CTGGCCGTACCGGGCAGCCGGCTAAACTAGTACTAGGGTAGAGTTT
AGCCAAG -3'

CREB_191_186_208bp_R:

5'- CTTGGCTAAACTCTACCCTAGTACTAGTTTAGCCGGCTGCCCCGGTAC
GGCCAG -3'

MEF2_362_359_F: [429]

5'- GCAAAGAGGAGAGCCAAGGTCGGGTTAGAGAGCTGGCTCC -3'

MEF2_362_359_R:

5'- GGAGCCAGCTCTCTAACCCGACCTTGGCTCTCCTCTTTGC -3'

MEF2_384_381_F: [429]

5'- GAGAGCTGGCTCCAACCCGAAATGCTGAGCAGTGCTCTC -3'

MEF2_384_381_R:

5'- GAGAGCACTGCTCAGCATTTTCGGGTTGGAGCCAGCTCTC -3'

NF1_105_103_F: [430]

5'- CTGTGGGCGTCCACTCGAGTAAAGCGAATCAGAGCAAAGAC -3'

NF1_105_103_R:

5'- GTCTTTGCTCTGATTCGCTTTACTCGAGTGGACGCCCACAG -3'

NF-Y _111_110_F: [431,432]

5'- CGAGGCCAGCGGGTCAGAGCAAAGACTGCACCCC -3'

NF-Y_111_110_R:

5'- GGGGTGCAGTCTTTGCTCTGACCCGCTGGCCTCG -3'

Sp1_NF-Y_111_110_F:

5'- CGAGGCCAGCGGGTCAGAGCAAAGACTGCACCTT -3'

Sp1_NF-Y_111_110_R:

5'- AAGGTGCAGTCTTTGCTCTGACCCGCTGGCCTCG -3'

Sp1_135_131_F: [433]

5'- ATCAGAGCAAAGACTGCACCTTTAACTTAGGGTGGCCTCTGCAGG -3'

Sp1_135_131_R:

5'- CCTGCAGAGGCCACCCTAAGTTAAAGGTGCAGTCTTTGCTCTGAT -3'

TBP _41_39_F:

5'- CGCTGCGGTCTGCTCGCATTGGAGAGCGGGACTCCC -3'

TBP_41_39_R:

5'- GGGAGTCCCGCTCTCCAATGCGAGCAGACCGCAGCG -3'

2.9 Zelllinien

DH10B E. coli, elektrokompetent	Life Technologies
XL1-Blue E. coli	Agilent
C2C12, Linie C3H	ATCC
NRVCM, Wistar Stamm	Charles River Laboratories, Verpaarung in der zentralen Tierhaltung UKSH Kiel

2.10 Software

Clustal Omega Online Tool [434]	The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, United Kingdom
---------------------------------	--

Element Online Tool [435]	The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, Israel
Graphpad Prism (Version 6)	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Inkscape (Version 0.92)	www.inkscape.org
JASPAR Online Tool [436]	www.jaspar.genereg.net
Primer-Blast [437]	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Word (Version 2016)	Microsoft, Redmond, WA, USA
Zotero (Version 4.0)	George Mason University, Fairfax, VA, USA

3 Methoden

3.1 Überblick über die Methodik zur Klonierung der Lmcd1-Promotorfragmente in den pGL4.15-Reportervektor

Dieser Abschnitt soll einen zusammenhängenden Überblick über die Herstellung der Lmcd1-Promotor-Reporterkonstrukte aus genomischer Ratten-DNA bis zum gereinigten Reporterplasmid liefern, während die Einzelheiten der jeweiligen Methoden in den entsprechenden Abschnitten erläutert werden.

Nach der Gewinnung von genomischer Ratten-DNA (3.4.1) erfolgte zunächst die Amplifizierung der acht verschiedenen Abschnitte des Lmcd1-Promotors mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (3.4.4.1, Abbildung 3).

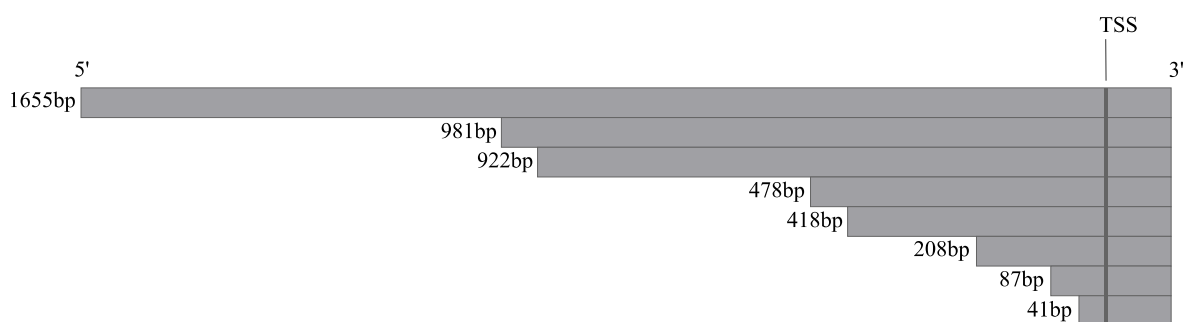


Abbildung 3: Maßstabsgetreue Darstellung der verwendeten Lmcd1-Promotorfragmente. Die Bezeichnung richtet sich nach der Anzahl der Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts (TSS). Alle Konstrukte sind am 3'-Ende identisch und enthalten stromabwärts des TSS zusätzlich 108bp der 5'-UTR des Lmcd1-Gens.

Die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass am 5'- und 3'-Ende der PCR-Produkte jeweils eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme Acc65I bzw. EcoRV eingefügt wurde (2.8.1), so dass nach erfolgter Aufreinigung der PCR-Produkte (3.4.5), der restriktionsenzymatische Verdau der PCR-Produkte sowie des pGL4.15-Vektors, der in der Multiple Cloning Site ebenfalls Schnittstellen für diese Enzyme enthält, erfolgen konnte (3.4.6). Vor der weiteren Verarbeitung wurden die verdauten DNA-Fragmente (sowohl die Promotorkonstrukte als auch der pGL4.15-Vektor) mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese (3.4.7) von den, durch die Restriktionsenzyme abgespaltenen, DNA-Resten getrennt, um bei der Ligation die Re-Ligation dieser Schnittreste mit den PCR-Produkten bzw. dem pGL4.15-Vektor zu vermeiden. Anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert (3.4.8). Danach erfolgte die Ligation der Promotorfragmente in die Multiple Cloning Site des pGL4.15-Vektors (3.4.9, Abbildung 4), gefolgt von einer Aufreinigung des Ligationsansatzes (3.4.5). Nach der Transformation von DH10B E. coli mit den so erzeugten Reporterkonstrukten (3.3.1), wurden diese auf Selektivnährböden angezüchtet (3.3.3) und schließlich nach Bestätigung der Aufnahme des gewünschten Reporterplasmids durch Kolonie-PCR (3.4.4.2) und Sequenzierung (3.4.10) als Glycerol-Stock eingelagert (3.3.4). Im Anschluss an die Herstellung größerer Mengen der so erzeugten Reporterplasmide mittels Bakterienkultur (3.3.2) und anschließender Plasmidextraktion (3.4.2) wurden diese entweder direkt für die experimentelle Untersuchung der Lmcd1-Promotor-Aktivität oder für die Mutagenese putativer Transkriptionsfaktorbindestellen verwendet (3.4.14). Bei experimentellem Einsatz erfolgte als

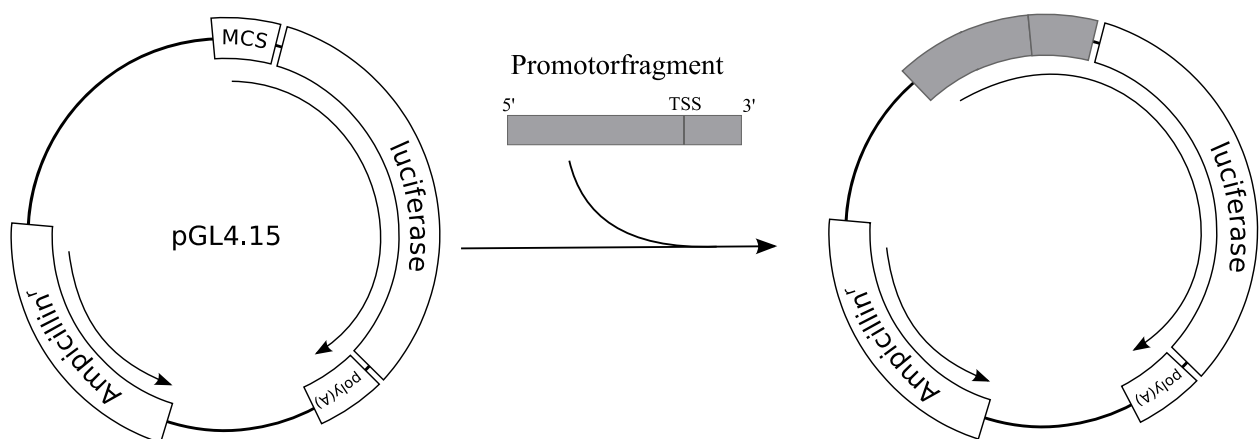


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klonierung der Lmcd1-Promotorkonstrukte in den pGL4.15-Vektor. Dargestellt sind der pGL4.15-Vektor mit Multiple Cloning Site (MCS), Firefly-Luciferasegen (luciferase), dessen Polyadenylierungsmuster (poly(A)) das Ampicillin-Resistenzgen (Ampicillin^r) sowie ein Promotorfragment mit Orientierung und gekennzeichnetem Transkriptionsstart (TSS).

nächster Schritt die Kotransfektion der Lmcd1-Promotor-Plasmide (3.4.11), die in

Abhängigkeit von ihrer Promotoraktivität das Firefly-Luciferase-Protein exprimieren, mit dem pRL-TK Kontrollvektor, der für eine stabile Expression des Renilla-Luciferase-Proteins sorgt und zur Normalisierung verwendet wurde, so dass nach der Ernte der Zellen über die Analyse der Luciferase-Aktivitäten (3.4.12) die Promotoraktivität bestimmt werden konnte. In einigen Fällen wurde für die Normalisierung zusätzlich eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt (3.4.13).

3.2 Zellkultur

Kultivierte C2C12-Zellen sowie neonatale Rattenherzmuskelzellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und einem Kohlendioxidanteil der Luft von 5% gelagert. Sämtliche Arbeiten bis zur Ernte der Zellen wurden ausschließlich unter Sicherheitswerkbänken durchgeführt.

3.2.1 Kultivierung von C2C12-Zellen

Bei C2C12 handelt es sich um eine immortalisierte murine Myoblastenzelllinie, die in Zellkultur bei zunehmender Konfluenz zu quergestreiften Muskelzellen ausdifferenziert und Myotuben ausbildet. In unserem Labor wurde ein „Grundstock“ an C2C12-Zellen vorgehalten, die in 75cm² Plastikflaschen in Vollmedium kultiviert wurden. Um eine Ausdifferenzierung zu verhindern, wurden diese Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% passagiert. Ein Teil der Zellen wurde zum Ansetzen eines neuen Grundstocks verwendet, der andere Teil wurde im Rahmen der durchzuführenden Versuche in Zellkulturplatten ausgesät. In dieser Arbeit wurden sämtliche Versuche mit C2C12-Zellen im 24-Well Format durchgeführt. Dazu wurden an Tag 1 pro Well 30.000 C2C12-Zellen in 500µl Vollmedium ausgesät und dann im weiteren Verlauf transfiziert (siehe 3.4.11.1).

3.2.2 Isolation und Kultivierung von ventrikulären Rattenherzmuskelzellen aus neonatalen Ratten

Die Gewinnung von neonatalen ventrikulären Rattenherzmuskelzellen erfolgte in einer wöchentlich durchgeführten Präparation.

Am Tag vor der Präparation erfolgte die Kollagenisierung der Zellkulturplatten, mit Ausnahme der Stretch-Platten, die bereits kollagenisiert erworben wurden: Für 50ml einer Kollagenlösung in einer Konzentration von 50µg/ml wurden 50ml 0,01 M HCl mit 835µl Kollagenlösung (3mg/ml) versetzt. Von dieser Lösung wurden anschließend 500µl (12-Well) bzw. 300µl (24-Well) zu jedem Well hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Morgen erfolgte die Abnahme des Überstandes und das einmalige Waschen mit Aqua ad iniectabilia. Anschließend wurden die Platten luftgetrocknet und bis zur Aussäung der Zellen

gelagert.

Unmittelbar vor Beginn der Präparation erfolgte das Anlegen einer Verdaulösung (ADS Puffer mit 0,6 mg/ml Pankreatin und 0,5mg/ml Kollagenase Typ 2) sowie mehrerer Percoll-Gradienten (alle Chemikalien bei 4°C): Die Zahl der benötigten Gradienten wurde anhand der erwarteten Anzahl Herzen berechnet (1 Gradient pro 7 Herzen). Die folgenden Angaben reichen zur Herstellung von 8 Gradienten und wurden entsprechend skaliert: Zunächst erfolgte das Anlegen einer Basislösung durch Zugabe von 5ml 10x ADS Puffer zu 45ml Percoll. Aus dieser wurde eine Lösung für die obere Schicht (18ml Basislösung + 22ml 1x ADS + Phenolrot) und eine für die untere Schicht (26ml Basislösung + 14ml 1x ADS) hergestellt. Von der oberen Schicht wurden 4ml in ein 15ml Röhrchen vorgelegt und anschließend 3ml der unteren Schicht mit Hilfe einer 5ml Pipette vorsichtig auf den Boden des Röhrchens unter die obere Schicht pipettiert. Bis zur Verwendung wurden die Gradienten nun bei 4°C gelagert.

Anschließend wurde die eigentliche Präparation begonnen: Die 1 bis 3 Tage alten Tiere wurden zur Reinigung zunächst in 80%-ige Ethanollösung getaucht und unmittelbar danach mit einer Schere dekapitiert. Es folgte die Freilegung und Entnahme des Herzens durch einen Parasternalschnitt links woraufhin dieses unmittelbar in eine Petrischale mit eisgekühltem ADS Puffer überführt wurde. Anschließend erfolgte die sorgfältige Entfernung von Vorhöfen, Gefäßansätzen und etwaiger Lungenreste mit anschließender Überführung der Ventrikel in frischen ADS Puffer, so dass diese gerade so bedeckt waren. Es folgte die gründliche Zerkleinerung der Herzen mit einer Schere. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zunächst wurden die Herzen in 75cm² Zellkulturflaschen (25-30 Herzen pro Flasche) überführt und pro Herz mit 1ml Verdaulösung versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 20min im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach der Desinfektion der Flaschen erfolgte dann Abnahme und Verwerfen der Verdaulösung und Zugabe von 1ml frischer Verdaulösung pro Herz, sowie die erneute Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C über 20min. Nach der Desinfektion der Flaschen wurde die Verdaulösung mit einer 25ml Pipette 40x Auf- und Abpipettiert um angedaute Gewebestücke von einzelnen Kardiomyozyten zu trennen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch einen Sterilfilter in ein 50ml Röhrchen überführt dem unmittelbar 10ml Newborn Calf Serum zugefügt wurden. Nachfolgend wurden die 50ml Röhrchen für 5min bei 1.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Es folgte das Verwerfen des Überstandes und die Resuspension des Pellets in 10ml Newborn Calf Serum. Die Zellen aus mehreren Röhrchen wurden dann in 1-2 50ml Röhrchen gepoolt. Mit den verbliebenen Gewebefragmenten wurden

die vorgenannten Schritte des Verdaus mit nachfolgender Isolation des Überstandes solange wiederholt bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hat. Die 50ml Röhren mit den gesammelten Kardiomyozyten wurden während der weiteren Verdauschritte mit leicht geöffnetem Deckel bei 37°C im CO₂-Inkubator gelagert. Nach dem letzten Verdauungsschritt wurde die gepoolte Zellsuspension erneut zentrifugiert (5min, 1.000rpm, RT) und das Pellet in ADS Puffer gelöst. Von dieser Zellsuspension wurden zur Trennung der Kardiomyozyten von Erythrozyten und Fibroblasten jeweils 2ml auf die vorbereiteten Percoll-Gradienten gegeben und direkt für 30min bei 4°C und 2.400rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation sammeln sich die Kardiomyozyten an der Grenze zwischen oberer und unterer Schicht. Diese wurden mit Hilfe einer Transferpipette abgenommen und die Zellen aus 5-6 Gradienten in einem 50ml Röhren gepoolt. Nach Auffüllen der Röhren mit gekühltem 1x ADS Puffer (4°C) auf 50ml erfolgte die Zentrifugation bei 1.000rpm und Raumtemperatur über 5min. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets gepoolt und nochmals mit 1x ADS gewaschen. Abschließend erfolgte die Resuspension des Pellets in 10ml vorgewärmtem Vollmedium (37°C).

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 150µl der Suspension abgenommen, zur Anfärbung von bereits toten Zellen, die nicht mitgezählt werden sollten, mit 150µl Trypanblau versetzt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Anschließend erfolgte das Aussäen der Zellen in den vorbereiteten Zellkulturplatten in einer Zahl von 250.000 (24-Well) bzw. 1.500.000 (6-Well Stretch) pro Well.

3.3 Mikrobiologie

3.3.1 Transformation elektrokompetenter DH10B E. coli durch Elektroporation

Die elektrokompetenten DH10B E. coli wurden bei -80°C verwahrt und erst direkt vor der Transformation auf Eis liegend aufgetaut. Zu 50µl Bakteriensuspension wurden direkt 1,5 - 4µl (\pm 10 - 30 ng Plasmid-DNA) des gereinigten Ligationsansatzes gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die gesamte Probe wurde im nächsten Schritt in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und nach sorgfältigem Trockenwischen der Kontakte zur Vermeidung von Kurzschlüssen mit einem Einzelpuls von 1,8kV elektroporiert. Anschließend wurde 1ml LB-Medium hinzugegeben und die gesamte Bakteriensuspension in ein 1,5ml Röhren überführt. Es folgte die Inkubation in einem Schüttler für 60 Minuten bei 37°C und 300 rpm, bevor das Ausbringen auf einem Selektivnährboden zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterienklone erfolgte (3.3.3).

3.3.2 Bakterienanzucht in Flüssigkulturen

Die Bakterienanzucht in Flüssigkulturen diente der Vermehrung von Plasmid-haltigen Bakterien. Dazu wurden, je nach Dimension der nachfolgenden Plasmid-Extraktion, 5 – 250ml LB-Medium mit einem Antibiotikum, entsprechend der Resistenzkassette des Plasmids, versetzt. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthielten ein Resistenzgen für Ampicillin, das ebenfalls eine Resistenz gegen Carbenicillin vermittelt. Carbenicillin (100µg/ml) wurde in dieser Arbeit statt Ampicillin verwendet und den Flüssigkulturen im Verhältnis von 0,1% (v/v) zugesetzt. Die Beimpfung der Kulturen erfolgte entweder mit 10µl eines Glycerol-Stocks oder mit einer einzelnen Kolonie von einem Selektivnährboden. Nach der Inkubation für 8-16h bei 37°C und 225 rpm schloss sich am nächsten Tag eine Mini-, Midi- oder Maxi-Präparation der Plasmid-DNA an (3.4.2).

3.3.3 Bakterienanzucht auf Selektivnährböden

Selektivnährböden dienen der selektiven Anzucht von Bakterien, die gegen das dem Nährboden zugesetzte Antibiotikum resistent sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets Bakterien selektiert, die die Antibiotikaresistenz durch die Aufnahme eines bestimmten Plasmids erlangt hatten. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit dem pGL4.15-Vektor gearbeitet wurde, der ein Resistenzgen für Ampicillin enthält, welches außerdem eine Resistenz gegen Carbenicillin vermittelt, konnten nach Ausbringen der Bakterien auf Agarplatten, denen Carbenicillin zugesetzt war, nur diejenigen Bakterien wachsen, die das Plasmid auch tatsächlich aufgenommen hatten.

Als Ausgangsmaterial wurde stets der bereits für eine Stunde bei 37°C vorinkubierte Transformationsansatz genutzt, von dem unter einer Sterilwerkbank je nach erwartetem Bakterienwachstum 10 – 500µl auf den Selektivnährboden pipettiert wurden. Die Verteilung der Bakteriensuspension erfolgte anschließend durch sterile Glaskügelchen, die durch Schwenken der Agarplatten auf dem Nährboden hin- und hergerollt, und danach abgekippt wurden. Nach der folgenden Inkubation (kopfüber, 37°C, 12-16h) erfolgte die Inspektion auf gewachsene Bakterienkolonien. Waren geeignete Kolonien vorhanden, wurden diese mit einer sterilen µl-Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und dann für eine Kolonie-PCR (3.4.4.2) oder eine Bakterienflüssigkultur (3.3.2) verwendet. Geeignete Kolonien waren kreisrund, scharf begrenzt und ohne Satellitenkolonien. Die endgültige Überprüfung des Transformationserfolgs wurde stets durch eine Sequenzierung (3.4.10) sichergestellt.

3.3.3.1 Herstellung von Selektivnährböden

Zur Herstellung von Selektivnährboden wurde zuvor autoklavierter LB-Agar bei 95°C im Wasserbad bis zur vollständigen Verflüssigung erwärmt. Anschließend erfolgte das Abkühlen bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren auf etwa 50 - 60°C. Anschließend erfolgte die Zugabe von Carbenicillin in einer Konzentration von 100µg/µl. Anschließend wurde der Agar unter einer Sterilwerkbank in vorbereitete Platten gegossen, so dass eine Agarschicht von etwa 0,5cm Dicke entstand. Nach dem vollständigen Abkühlen und Verfestigen des Agars erfolgte die weitere Lagerung der hergestellten Platten bis zur Nutzung bei 4°C.

3.3.4 Anlage von Glycerolstocks

Die Anlage von Glycerolstocks dient der Konservierung und Lagerung transformierter, also gentechnisch veränderter, Bakterien, um so bei Bedarf das transformierte Plasmid schnell frisch herstellen zu können. Nach der vorläufigen Bestätigung über die erfolgreiche Transformation der verwendeten E. coli mit Hilfe einer Kolonie-PCR (3.4.4.2) erfolgte noch vor der Sequenzierung die Herstellung eines Glycerol-Stocks. Dazu wurde zunächst eine Flüssigkultur mit 5ml LB-Medium angelegt (3.3.2) und von dieser 2ml in ein 2ml Schraubröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für eine Minute mit 11.000 g bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgegossen. Unter einer sterilen Werkbank erfolgte parallel die Herstellung einer 30%-igen Glycerollösung durch Mischen von Glycerol 60% mit LB-Medium im Verhältnis 1:1. Anschließend wurde das Bakterienpellet, ebenfalls unter der sterilen Werkbank, in 1ml dieser 30%-igen Glycerollösung resuspendiert und schließlich zur weiteren Lagerung in einen Gefrierschrank bei -20°C verbracht.

Die so konservierten gentechnisch veränderten Bakterienklone wurden umgehend in eine Liste für gentechnisch veränderte Organismen eingetragen. Bakterienklone, die nicht länger benötigt wurden, zum Beispiel bei unerwünschtem Ergebnis der endgültigen Sequenzierung oder bei Vorliegen mehrerer identischer Klonen, wurden durch Autoklavieren vernichtet.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 Extraktion genomischer DNA aus Rattengewebe

Die Extraktion von genomischer Ratten-DNA erfolgte aus Leber- und Lungengewebe neugeborener Ratten. Diese wurden dazu jeweils in 500µl SNET Puffer gegeben und 100µg Proteinase K hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 55°C im Thermomixer bei 700rpm über 2h. Danach wurden 500µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt und die Probe kräftig mit dem Vortexer geschüttelt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation

für 5min bei 14.000rpm und die Überführung des Überstandes in ein frisches 1,5ml Reaktionsröhrchen. In dieses wurden sodann 500µl Isopropanol hinzugefügt und die Probe erneut gründlich geschüttelt. Nach der erneuten Zentrifugation über 5min bei 14.000rpm wurde der Überstand abgegossen und das verbliebene Pellet durch Zugabe von 500µl Ethanol (75%) und Zentrifugation über 3min bei 14.000rpm gewaschen. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet für 5min an der Luft getrocknet. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 500µl ddH₂O und die Lösung des Pellets über Nacht bei 4°C. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung wurde die so gewonnene DNA zur Amplifizierung der verschiedenen Lmcd1-Promotorfragmente mittels PCR verwendet (siehe 3.4.4.1).

3.4.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Je nach benötigter Menge der herzustellenden Plasmid-DNA wurden verschiedene Protokolle verwendet. Die geerntete Plasmid-Menge lag bei der Extraktion in geringem Umfang bei 5 – 30µg aufgereinigter Plasmid-DNA, bei der in mittlerem Umfang bei 100 – 500µg und bei der Extraktion in großem Umfang etwa bei 300 – 1000µg.

3.4.2.1 Extraktion von Plasmid-DNA in geringem Umfang (Mini-Präparation)

Die Plasmid-Extraktion in geringem Umfang erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit von Macherey-Nagel. Es wurde zunächst eine Flüssigkultur mit 5ml LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum angelegt, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Nach der Inkubation wurden 2ml der hergestellten Bakterienkultur in ein 2ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Wo nicht anders angegeben, wurde die Zentrifugation für eine Minute bei 37°C und 11.000 g durchgeführt. Der Überstand wurde abgegossen und die Zentrifugation mit weiteren 2ml der Flüssigkultur wiederholt. Nach erneutem Abgießen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 300µl des auf 4°C gekühlten Puffers A1 sorgfältig resuspendiert. Nachfolgend wurden 300µl Puffer A2 hinzugegeben und das Röhrchen zum Mischen mehrfach vorsichtig gewendet. Nach der Inkubation über 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 400µl Puffer A3 zugesetzt und die Probe erneut mehrmals gewendet. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in eine Zentrifugationssäule überführt und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Säule zunächst durch Hinzufügen von 500µl des vorgewärmten Puffers AW (50°C) und anschließend mit 600µl Puffer A4 und jeweils nachfolgender Zentrifugation. Zur möglichst vollständigen Entfernung des überschüssigen Puffers erfolgte danach eine Leerzentrifugation über 2 Minuten. Im letzten Schritt wurden 50µl Puffer AE direkt auf die Membran der Säule gegeben. Durch die

abschließende Zentrifugation wurde die gereinigte DNA aus der Membran gelöst, in einem 1,5ml-Röhrchen aufgefangen und der Konzentrationsbestimmung zugeführt (3.4.3).

3.4.2.2 Extraktion von Plasmid-DNA in mittlerem Umfang (Midi-Präparation)

Für die Midi-Präparation wurde das Vakuum-System QIAvac24 in Kombination mit dem Plasmid Plus Midi Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden zunächst 50ml einer entsprechenden Bakterienflüssigkultur angelegt (3.3.2). Zur Plasmidextraktion wurde diese nach erfolgter Inkubation in ein 50ml Falcon überführt und zentrifugiert (4°C, 20min, 4.700g). Nach Abgießen des Überstandes erfolgte die vollständige Resuspendierung des Bakterienpelletes mit 4ml Puffer P1 (4°C). Dann wurden 4ml Puffer P2 hinzugefügt, die Probe durch mehrfaches Invertieren gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 4ml Puffer S3 und nach mehrmaligem Wenden das Überführen der Probe auf eine QIAfilter Säule und die erneute Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Probe mit einem Stempel durch die Säule gepresst und das klare Lysat aufgefangen. Nach Zugabe von 2ml Puffer BB wurde die Probe über den Tube Extender in ein QIAGEN Plasmid Plus Zentrifugationsröhrchen überführt und durch Anlegen eines Unterdrucks von ca. 300mbar über die Vakuumpumpe durch die Membran des Röhrchens gesaugt. Zum Waschen der nun in der Membran gebundenen DNA erfolgte das Zugeben und Durchsaugen von zunächst 700µl Puffer ETR und anschließend 700µl Puffer PE. Zur kompletten Entfernung des Puffers PE erfolgte nachfolgend noch die Zentrifugation für 1 Minute bei Raumtemperatur und 11.000g. Anschließend wurde das Zentrifugationsröhrchen in ein frisches 1,5ml Röhrchen überführt und die DNA durch Zugabe von 200µl Puffer BE und anschließende Zentrifugation (RT, 1min, 11.000g) gelöst.

3.4.2.3 Extraktion von Plasmid-DNA in großem Umfang (Maxi-Präparation)

Für die Maxi-Präparation wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Zunächst wurde eine Bakterienflüssigkultur mit 5ml LB-Medium angesetzt (3.3.2). Von dieser wurden nach der Inkubation über 8 Stunden 2ml zur Animpfung einer weiteren Flüssigkultur mit 250ml LB-Medium verwendet, die erneut für 12-16h inkubiert wurde. Die eigentliche Plasmid-Ernte begann mit dem Umkippen der Flüssigkultur in einen Zentrifugationszylinder und der nachfolgenden Zentrifugation (4°C, 15min, 6.000g). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Bakterienpellet in 10ml Puffer P1 durch Auf- und Abpipettieren sorgfältig resuspendiert. An die Zugabe von 10ml Puffer P2 und Mischen durch mehrmaliges Schwenken schloss sich die Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur an. Danach wurden 10ml gekühlter (4°C) Puffer P3 hinzugefügt und die gesamte Probe für 20 Minuten auf Eis

liegend inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation (4°C, 30min, 20.000 g). Im Anschluss wurde der Überstand sofort in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (4°C, 15min, 20.000g). In der Zwischenzeit wurde die QIAGEN-tip 500 Säule durch Hinzufügen und Durchlaufenlassen von 10ml Puffer QBT vorbereitet. Im Anschluss wurde der Überstand aus der letzten Zentrifugation auf die vorbereitete Säule gegeben und zwei Mal durch die Zugabe von jeweils 30ml Puffer QC gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA mit 15ml Puffer QF (vorgewärmt auf 65°C) aus der Säule gelöst und in einem frischen Röhrchen aufgefangen. Durch das Hinzufügen von 10,5ml Isopropanol wurde die DNA ausgefällt und für 30 Minuten bei 4°C und 15.000 g abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet durch Zugabe von 5ml Ethanol 70% gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C, 10min, 15.000 g). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet für 5 – 10 Minuten an der Luft getrocknet und schließlich durch sorgfältiges Überspülen in 100 – 200µl Puffer AE eluiert und nachfolgend bis zur Konzentrationsbestimmung auf Eis gelagert.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von gelösten DNA-Molekülen erfolgte photospektrometrisch mit dem Nanodrop 2000. Vor jeder Messung erfolgte zur Eichung die Leermessung der jeweiligen Trägerlösung. Für die eigentliche Messung wurde 1µl der entsprechenden Lösung auf die Messvorrichtung pipettiert und zur Verringerung von Messungenauigkeiten zwei Mal gemessen. Zur Verringerung des Messfehlers wurde dieser Schritt für jede Probe mit einem weiteren Mikroliter wiederholt, so dass insgesamt vier Werte pro Probe gemessen wurden, aus denen dann der Mittelwert gebildet wurde. Zur Sicherung der Reinheit der entsprechenden Proben wurde stets das Absorptionsverhältnis von 280nm/260nm und 260nm/230nm kontrolliert, das meist zwischen 1,8 und 2,0 (280nm/260nm) bzw. 2,0 und 2,4 (260nm/230nm) lag, und die Proben somit durchweg als rein zu bezeichnen waren. Einzige Ausnahme waren die Proben direkt nach Gelextraktion (3.4.8) was einerseits an möglichen Rückständen aus der Extraktion andererseits an der oft sehr geringen DNA-Konzentration dieser Proben von unter 20 ng/µl gelegen haben könnte. Die weitere Verarbeitung dieser Proben, insbesondere der Ligationserfolg wurde dadurch aber nicht negativ beeinflusst.

3.4.4 PCR

3.4.4.1 Amplifizierung der Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA

Für die Amplifizierung der verschiedenen Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA

wurde die Polymerase-Ketten-

Reaktion verwendet. Dabei wurde für

jedes Fragment der gleiche Reverse-

Primer (Lmcd1_Prom_R) in

Kombination mit einem für jedes

Konstrukt spezifischen Forward-

Primer kombiniert (siehe 2.8.1). Zur

Verringerung des Risikos von

Ablesefehlern wurde die DNA-

Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*

(Pfu-Polymerase) verwendet, da diese

über eine 3'-Exonukleaseaktivität verfügt, so dass bei der Strangverlängerung fehlerhaft

eingebaute Basen direkt wieder entfernt werden. Die Reaktionsansätze wurden stets als

Mastermix vorbereitet, so dass den einzelnen Ansätzen zum Schluss nur noch der spezifische

Primer hinzugefügt werden musste. Die verwendeten Reaktionsansätze sind in Tabelle 2, die

Einstellungen für die PCR in Tabelle 3 wiedergegeben.

		41bp - 981bp	1655bp
10x Pfu-Buffer	µl	5	5
dNTP-Mix 10mM	µl	1	1
Forward-Primer 10µM	µl	2,5	2,5
Reverse-Primer 10µM	µl	2,5	2,5
Genomische DNA	ng	200	200
Pfu-Polymerase	u	2	1,5
ddH ₂ O	µl	ad 50	ad 50

Tabelle 2: Reaktionsansätze für die Amplifizierung der verschiedenen Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA.

		41bp - 478bp	922 & 981bp	1655bp
Initiale Denaturierung (95°C)	min	05:00	05:00	05:00
35 Zyklen				
Denaturierung (95°C)	min	00:30	00:30	00:30
Annealing	°C	60	60	65
	min	00:30	00:30	00:30
Elongation (72°C)	min	01:20	03:00	05:00
Finale Elongation (72°C)	min	07:00	07:00	07:00
Kühlung (4°C)	min	∞	∞	∞

Tabelle 3: PCR-Parameter für die Amplifizierung der unterschiedlichen Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA.

3.4.4.2 PCR zur Selektion klonierter oder mutierter Bakterienklone (Kolonie-PCR)

Nach jedem Schritt der Klonierung bzw. Mutagenese wurden die gepickten Bakterienkolonien mittels einer PCR selektiert. Durch diese Kolonie-PCR konnte bereits vor der Sequenzierung überprüft werden, ob die jeweilige Bakterienkolonie einen DNA-Abschnitt enthält, der in der PCR zu einem Produkt erwarteter Länge führt. Da hierbei eine fehlerfreie Replikation des DNA-Abschnittes nicht unbedingt notwendig war, wurde die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, die über keine Fehlerkorrektur verfügt, dafür aber schneller und preisgünstiger als die Pfu-Polymerase ist. Als Template-DNA diente jeweils eine Bakterienkolonie, die mit

10x DreamTaq Green Buffer	μl	5
dNTP-Mix 10mM	μl	1
RvPrimer3 10μM	μl	2,5
pGL4_SeqR 10μM	μl	2,5
DNA		in Spuren
Dream-Taq DNA Polymerase	u	1,25
ddH ₂ O	μl	ad 50

Tabelle 5: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR.

Initiale Denaturierung (95°C)	min	02:00
35 Zyklen		
Denaturierung (95°C)	min	00:30
Annealing	°C	60
	min	00:30
Elongation (72°C)	min	02:10
Finale Elongation (72°C)	min	07:00
Kühlung (4°C)	min	∞

Tabelle 4: PCR-Parameter der Kolonie-PCR.

einer sterilen Pipette vom Nährboden gepickt und anschließend in den Reaktionsansatz der PCR getaucht wurde. Anschließend wurde die Pipettenspitze in einem sterilen 2ml-Eppendorf-Tube bei 4°C aufbewahrt und bei positivem Ergebnis der PCR zur Beimpfung einer Flüssigkultur verwendet (siehe 3.3.2).

Da es sich bei der Template-DNA stets um Konstrukte im pGL4.15-Vektor handelte, wurden für die Kolonie-PCRs ausnahmslos die Primer RvPrimer3 und pGL4_SeqR verwendet. Die genauen Angaben zum Reaktionsansatz und den Einstellungen der PCR sind in Tabelle 5 und Tabelle 4 dargestellt. Zu beachten ist, dass im Gegensatz zur Amplifizierung der Promotorfragmente aus genomischer Ratten-DNA (siehe vorheriger Abschnitt) für alle Promotorfragmente die gleiche Elongationsdauer gewählt wurde.

3.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit von Macherey-Nagel. Das gleiche Verfahren wurde außerdem angewendet, um eine Aufreinigung der Plasmide nach erfolgter Ligation (3.4.9) zu erreichen. Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur und 11.000g durchgeführt.

Zur aufzureinigenden Probe wurde dazu zunächst das doppelte Volumen Puffer A3 gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die gesamte Probe auf eine Säule überführt, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurden 500µl des vorgewärmten Puffers AW (50°C) auf die Säule gegeben, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde der gleiche Vorgang mit 600µl Puffer A4 wiederholt. Danach erfolgte die erneute Zentrifugation der leeren Säulen für 3 Minuten zur kompletten Entfernung etwaiger Pufferreste und nachfolgend die Zugabe von 30µl vorgewärmtem Puffer AE (70°C) direkt auf die Membran der Säule. Nach Inkubation der Probe für eine Minute erfolgte die Lösung der DNA durch Zentrifugation mit Auffangen des Eluats in einem 1,5ml Eppendorf-Röhrchen.

3.4.6 Restriktionsverdau der Promotorkonstrukte und von pGL4.15

Der Restriktionsverdau der Lmcd1-Promotorkonstrukte nach erfolgter Amplifizierung mittels PCR (siehe 3.4.4.1) erfolgte mit den Restriktionsenzymen Acc65I und EcoRV, die die jeweils palindromischen Sequenzen 5'-GGTACC-3' bzw. 5'-GATATC-3' erkennen und schneiden. Acc65I erzeugt dabei ein sogenanntes sticky end (klebriges Ende) mit 5'-Überhang während EcoRV ein blunt end, also ein glattes Ende erzeugt (Abbildung 5). Durch die Kombination

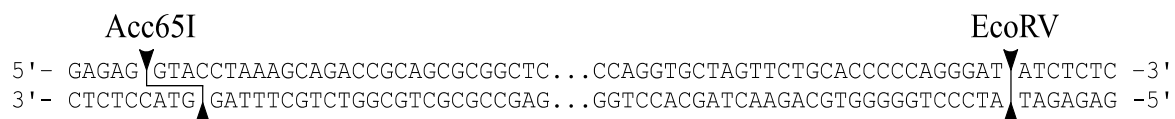


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Restriktionsverdaus durch Acc65I und EcoRV am PCR-Produkt des 41bp-Promotors.

dieser Restriktionsenzyme, die in analoger Weise auch die Multiple Cloning Site von pGL4.15 schneiden, kann bei der nachfolgenden Ligation die richtige Orientierung des eingefügten DNA-Abschnitts sichergestellt werden, da klebrige Enden nur mit passenden klebrigen Enden und glatte Enden nur mit glatten Enden ligiert werden können. Der Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau ist in Tabelle 6 dargestellt

und erfolgte mit beiden Enzymen simultan im DoubleDigest-Verfahren. Gemäß den Herstellerempfehlungen für diese Kombination an Restriktionsenzymen wurde als Puffer der Puffer O gewählt, sowie die doppelte Menge EcoRV verwendet. Nach

10x Buffer O	µl	2
DNA	ng	1500
Acc65I	u	10
EcoRV	u	20
Nukleasefreies H ₂ O	µl	ad 20

Tabelle 6: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau.

Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgte die Inkubation bei 37°C für 2h, an die sich direkt eine Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung der gewünschten Verdauprodukte von den abgeschnittenen DNA-Schnipseln anschloss.

3.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Länge. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zum einen zur groben Überprüfung der Größe von PCR-Produkten und zum anderen als Reinigungsschritt nach dem restriktionsenzymatischen Verdau von DNA-Molekülen verwendet. Die Vorgehensweise war dabei stets die gleiche: In Abhängigkeit von der erwarteten Länge der DNA-Moleküle wurde ein Agarosegel entsprechender Konzentration vorbereitet. Dazu wurde Agarose, 2% (w/v) für DNA-Stränge von weniger und 1,2% (w/v) für solche von mehr als 1000 Basenpaaren Länge, in 1x TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle unter regelmäßigem Schwenken so lange erhitzt bis sich die Agarose komplett aufgelöst hatte. Nach kurzem Abkühlen erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml und das blasenfreie Gießen des Gels in eine Gelkammer. Nach dem vollständigen Aushärten wurde das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer verbracht und die Taschen des Gels jeweils mit 12-20µl der entsprechenden DNA-Proben befüllt. Diese waren zuvor zur Beschwerung noch mit einem Ladepuffer versetzt worden. Danach wurde eine Spannung von 90-100V angelegt und das Gel nach einer Laufzeit von 45 bis 90min unter UV-Licht digital fotografiert. Waren die so aufgetrennten DNA-Moleküle für die weitere Verarbeitung vorgesehen, wurden sie im nächsten Schritt aus dem Gel extrahiert (3.4.8), andernfalls wurde das Gel verworfen.

3.4.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Mit einem Skalpell wurde dazu die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5ml Eppendorf-Tube überführt und gewogen. Dann erfolgte die Zugabe von 3 Teilen Puffer QG zu einem Teil Gel (1mg ~ 1µl) und die anschließende Inkubation auf einem Schüttler bei 50°C für mindestens 10 Minuten bis zur vollständigen Auflösung der Gelprobe. Die Probe wurde dann auf eine QIAquick-Säule gegeben und zentrifugiert (RT, 1min, 17.900 g). Dabei wird die DNA in der Membran der Säule gebunden, während die Trägerlösung abzentrifugiert wird. Im nächsten Schritt wurden nochmals 500µl Puffer QG auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (RT, 1min, 17.900g). Anschließend folgte die zweimalige Waschung mit Puffer PE: nach Zugabe von 750µl Puffer PE auf die Säule erfolgte zunächst die Inkubation für 2-5 Minuten und dann die Zentrifugation (RT, 1min, 17.900g). Nachfolgend wurde die Säule zur möglichst vollständigen Entfernung des Puffer PE nochmals ohne Zugabe von Reagenzien zentrifugiert (RT, 1min, 17.900g). Abschließend wurde die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf-Tube überführt und nach Zugabe von 22µl Puffer BE und der Inkubation für

eine Minute ein letztes Mal zentrifugiert (RT, 1min, 17.900g) und somit die DNA aus der Membran gelöst. Vor der weiteren Verwendung der so gereinigten DNA erfolgte stets die Konzentrationsbestimmung (3.4.3).

3.4.9 Ligation

Die Ligation der Lmcd1-Promotorfragmente mit dem durch Restriktionsverdau linearisierten pGL4.15-Vektor erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase nach vorangegangener Gelextraktion. Die Promotor-DNA wurde dabei in einem molekularen Verhältnis von 5 zu 1 im Vergleich zur Vektor-DNA eingesetzt. Die Berechnung der notwendigen Menge Promotor-DNA erfolgte nach folgender Formel:

10x T4 Ligase Buffer	μl	2
Linearer pGL4.15-Vektor	ng	100
Lineare Promotor-DNA	ng	variabel
50% PEG 5000 Solution	μl	2
T4 DNA Ligase	u	5
Nukleasefreies H ₂ O	μl	ad 20

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Ligation.

$$DNA_{Promotor} [ng] = \frac{pGL4.15 [ng] \cdot DNA_{Promotor} [bp]}{pGL4.15 [bp]} \cdot \frac{DNA_{Promotor} [mol]}{pGL4.15 [mol]}$$

Durch Einsetzen der Länge (5910 Basenpaare) und der gewünschten Menge (100 ng) des pGL4.15-Vektors sowie dem molekularen Verhältnis von 5 zu 1 vereinfacht sich die Formel zu:

$$DNA_{Promotor} [ng] = \frac{50}{591} \cdot DNA_{Promotor} [bp]$$

Die Länge der Promotorfragmente ergibt sich durch Addition der stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthaltenen Basenpaare, der 108 enthaltenen Basenpaare der 5'-UTR sowie jeweils 3 zusätzlicher Basenpaare am 5'- und 3'-Ende eines jeden Fragments als Reste der Restriktionsenzymkennungssequenzen (vergleiche Abbildung 3 und Abbildung 5 sowie Abschnitt 2.8.1). Für das 41bp-Fragment ergibt sich so beispielsweise eine Länge von 155bp. Nach dem Herstellen der Reaktionsansätze erfolgte die Inkubation bei 22°C für eine Stunde mit anschließender Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 Minuten. Vor der weiteren Verwendung zur Elektrottransformation erfolgte eine Aufreinigung nach dem Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten (3.4.5)

3.4.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben erfolgte zur Sicherstellung der korrekten Basenabfolge und Orientierung der Lmcd1-Promotorfragmente nach Klonierung in den pGL4.15-Vektor sowie

zur Sicherstellung des Mutationserfolgs nach Mutagenese. Die Sequenzierung wurde im Sanger-Verfahren durchgeführt und erfolgte stets extern, bis August 2013 durch MWG-Eurofins, Ebersberg, Deutschland, ab September 2013 durch GATC Biotech, Konstanz, Deutschland.

3.4.11 Transfektion von Plasmid-DNA mit Lipofectamine

3.4.11.1 C2C12-Zellen

Die Transfektion von C2C12-Zellen wurde mit Lipofectamine 2000 nach einem in unserem Labor etablierten Protokoll durchgeführt. Das Aussäen der C2C12 Zellen erfolgte an Tag 1 auf 24-well Mikrotiterplatten mit 30.000 Zellen pro Well in Vollmedium. Die eigentliche Transfektion erfolgte an Tag 2 ca. 24h nach dem Aussäen der Zellen, ohne vorherigen Wechsel des bereits auf den Zellen befindlichen Vollmediums: Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Transfektionsansätze. Dabei wurden wann immer möglich Master-Ansätze hergestellt, um die durch Pipettierungenauigkeiten entstehenden Unterschiede in den Reaktionsansätzen so gering wie möglich zu halten. So wurde immer ein Mastermix Lipofectamine 2000, bestehend aus Transfektionsmedium und Lipofectamine 2000 in einer Konzentration von 4% (v/v), gebildet,

der vor der Zugabe weiterer Reagenzien für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Zugabe der benötigten Plasmid-DNA erfolgte die erneute Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und schließlich das tropfenweise Zugeben von 100µl des entsprechenden Transfektionsansatzes zu jedem Well.

		- MEF2	+ MEF2
pRL-TK	ng	10	10
Lipofectamine 2000	µl	2	2
MEF2-VP16	ng	-	100
Lmcd1-Promotor-DNA	ng	400	400

Tabelle 8: Menge der einzelnen Reagenzien pro Well bei Versuchen mit Überexpression von MEF2-VP16 im 24-Well-Format (500µl Medium pro Well). Versuchsansätze zur Bestimmung der basalen Promotoraktivität wurden ohne den Zusatz von MEF2-VP16 bei ansonsten unveränderten Bedingungen zubereitet.

Die finale Konzentration der verschiedenen Reagenzien in jedem Well ist aus Tabelle 8 ersichtlich. Jede Versuchsbedingung wurde stets mindestens in Replikaten von vier durchgeführt.

An Tag 3 erfolgte 24h nach der Transfektion ein Mediumwechsel (Vollmedium, 500µl pro Well). Die Ernte der Zellen erfolgte 48h nach der Transfektion. Dazu wurde das Medium zunächst vorsichtig abgesaugt und die Zellen einmalig mit 500µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse durch Zugabe von 100µl 1x Passive Lysis Puffer aus dem Dual Glo Luciferase Assay Kit pro Well. Zur Steigerung des Lyseerfolgs wurden die Platten vor der

Probenanalyse mittels des Dual Luciferase Assays (siehe 3.4.12) für 30 Minuten bei -80°C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur auf einem Schüttler aufgetaut.

3.4.11.2 Neonatale ventrikuläre Rattenherzmuskelzellen

3.4.11.2.1 Etablierung

Da die Transfektion von neonatalen Rattenherzmuskelzellen (NRVCM) in unserem Labor nicht etabliert war, musste dies zunächst erfolgen. Dafür wurden Versuchsreihen sowohl mit Lipofectamine 2000 als auch mit Lipofectamine 3000 durchgeführt, jeweils im 12-well Format mit 400.000 NRVCM pro Well. Es stellte sich heraus, dass ein analoges Vorgehen zur Transfektion von C2C12-Zellen mit Belassen des Lipofectamine-haltigen Transfektionsansatzes auf den Zellen für 24h deutliche zytotoxische Effekte entfaltete, wobei Lipofectamine 3000 eine deutlich geringere toxische Wirkung zeigte als Lipofectamine 2000. Zur Verringerung der Toxizität wurde in der Folge zum einen die Dauer bis zum ersten Mediumwechsel nach der Transfektion, und damit die Expositionsdauer gegenüber dem Transfektionsansatz, verkürzt und zum anderen die Transfektion in serumhaltigem Medium versucht. Die besten Ergebnisse konnten schließlich mit einer Transfektion in L-Glutamin- und Serum-haltigem Medium (Transfektionsmedium 2, siehe 2.4.2), mit Ersetzen des Transfektionsmediums nach 4-5h durch serumfreies aber antibiotikahaltiges Medium erreicht werden. Zu beachten ist, dass der Lipofectamine-DNA-Ansatz gemäß den Herstellerempfehlungen stets in serumfreiem Medium (Transfektionsmedium 1) angesetzt

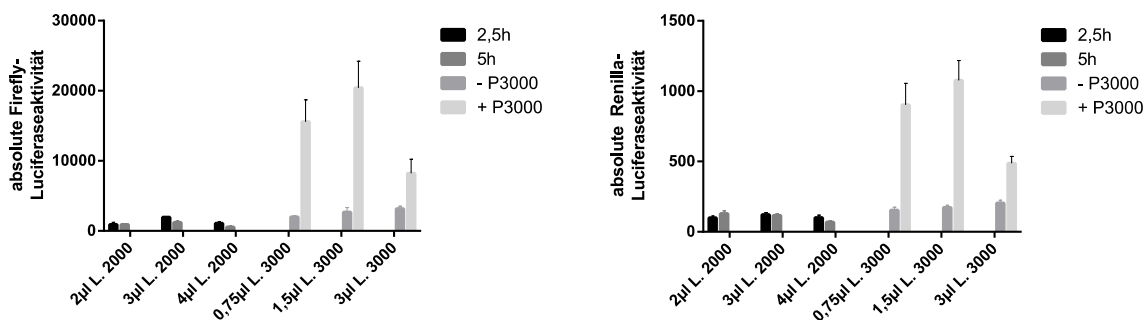


Abbildung 6: Absolute Aktivitäten der Firefly-Luciferase (links) und der Renilla-Luciferase (rechts) nach Transfektion von 800ng des 418bp-Promotors plus 200ng des Kontrollvektors pRL-TK in NRVCM im 12-Well Format. In sämtlichen Versuchsansätzen mit Lipofectamine 2000 (2, 3, oder 4 µl Lipofectamine 2000 pro Well und Mediumwechsel nach 2,5 oder 5 Stunden) zeigt sich ein dürftiger Transfektionserfolg. Unter Verwendung von Lipofectamine 3000 kommt es, allerdings nur bei Zusatz von 2 µl P3000-Reagenz pro Well zu einem deutlichen Anstieg der messbaren Luciferaseaktivitäten, der allerdings aufgrund der eintretenden Zytotoxizität bei Zugabe von 3 µl Lipofectamine 3000 wieder abfällt. Der Mediumwechsel bei den Versuchsreihen mit Lipofectamine 3000 erfolgte stets nach 5 Stunden.

wurde (siehe unten). In Abbildung 6 sind jeweils die absolute Firefly-Luciferase- und die

absolute Renilla-Luciferaseaktivität nach Transfektion von 800ng des 418bp-Konstruktes plus 200ng pRL-TK pro Well mit 2, 3 oder 4µl Lipofectamine 2000 und Abnahme des Transfektionsmediums nach 2,5 bzw. 5h sowie nach Transfektion mit 0,75µl, 1,5µl oder 3µl Lipofectamine 3000 jeweils mit und ohne Zusatz von 2µl P3000 Reagenz abgebildet. Bei den Ansätzen mit Lipofectamine 3000 erfolgte der Mediumswechsel stets 5h nach der Transfektion. Es ist erkennbar, dass die absoluten Luciferase-Aktivitäten mit Lipofectamine 3000 deutlich über jenen mit Lipofectamine 2000 lagen, jedoch nur bei gleichzeitigem Zusatz von P3000-Reagenz. Unter 3µl Lipofectamine 3000 + P3000-Reagenz nahm die Luciferase-Aktivität vermutlich durch den zunehmenden zytotoxischen Effekt wieder ab.

In weiteren Versuchen im 6-Well Format, bei denen 1600ng des 1655bp-Promotors und 400ng pRL-TK unter Einsatz von 0,75µl Lipofectamine 3000 und variabler Menge des P3000-Reagenz (0,75µl vs. 2µl) transfiziert wurden, zeigte sich außerdem, dass eine Reduktion des P3000-Reagenz auf die Menge des eingesetzten Lipofectamine 3000 ohne Einbußen bei der Transfektionseffektivität möglich ist (Abbildung 7). Die jeweils absolut erreichten Luciferaseaktivitäten entsprechen denen der Etablierungsversuche im 12-Well-Format (vergleiche Abbildung 6).

Aufgrund dieser Daten wurde für die Versuche zur basalen und PE-abhängigen

Promotoraktivität ein Aufbau im 24-Well-Format und für die Stretch-Versuche im 6-Well-Format gewählt und die Reaktionsansätze entsprechend den Angaben in Tabelle 9 zubereitet.

3.4.11.2.2 Durchführung

Das Aussäen der Zellen erfolgte an Tag 1 in Vollmedium mit 250.000 Zellen pro Well bei den Versuchen im 24-Well-Format und mit 1.500.000 Zellen pro Well bei den Stretchversuchen im 6-Well-Format (vergleiche 3.2.2). 24 Stunden später erfolgte die Transfektion. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen ein Mal mit vorgewärmtem

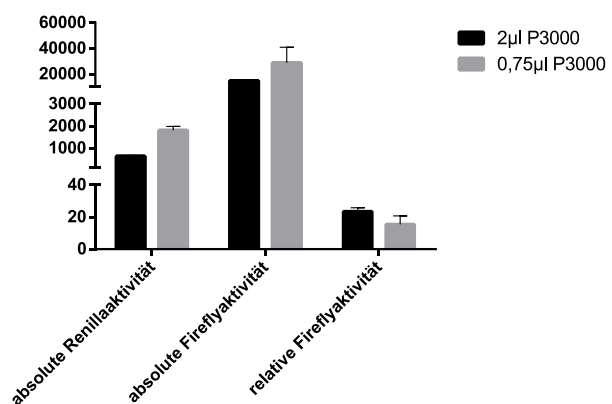


Abbildung 7: Vergleichende Darstellung der absoluten Aktivität der Renilla- und Firefly-Luciferase nach Transfektion von NRVCN im 6-Well-Format mit 1600ng des 1655bp-Promotors, 400ng pRL-TK, 0,75µl Lipofectamine 3000 und entweder 2µl oder 0,75µl P3000-Reagenz. Die absoluten Aktivitäten unterscheiden sich nur geringfügig und sind bei Verwendung der reduzierten Menge P3000 sogar tendenziell höher. Der resultierende Quotient aus Firefly- und Renillaaktivität ist zwischen den Bedingungen ebenfalls vergleichbar.

PBS (37°C) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400µl (24-Well) bzw. 1900µl (6-Well) serumhaltigem aber antibiotikafreiem Medium zu den Zellen (Transfektionsmedium 2, siehe 2.4.2).

Die eigentlichen Transfektionsansätze wurden in serum- und antibiotikafreiem Medium (Transfektionsmedium 1) angesetzt. Dazu wurden stets zwei Master-Ansätze wie folgt hergestellt: ein Ansatz mit Lipofectamine 3000 und ein Ansatz mit der zu transfizierenden DNA plus dem P3000 Reagenz. Diese wurden anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt und nach der

Inkubation für 10-15 Minuten bei

Raumtemperatur tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Menge der resultierenden Reagenzien pro Well ist Tabelle 9 zu entnehmen.

			24-well	Stretch (6-well)
	pRL-TK	ng	100	400
	Lmcd1-Promotor-DNA	ng	400	1600
	Lipofectamine 3000	µl	0,4	0,75
	P3000 Reagenz	µl	0,4	0,75

Tabelle 9: Finale Mengen der einzelnen Komponenten pro Well bei der Transfektion von NRVCN.

5 Stunden später wurde das Transfektionsmedium abgenommen und nach einmaligem Waschen mit PBS gegen serumfreies (aber antibiotikahaltiges) Medium getauscht. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte an Tag 3 erneut ein Mediumwechsel (serumfrei). Bei den Versuchen mit Phenylephrin wurde hierbei Phenylephrin in einer finalen Well-Konzentration von 5µM zugesetzt bei Stretch-Versuchen wurde direkt im Anschluss an den Mediumwechsel mit dem Stretch-Programm gestartet. Die Dehnung erfolgte mit dem Flexcell FX-5000 Tension System um 16% bei einer Frequenz von 1Hz. Kontrollen wurden innerhalb der Stretch-Kammer mitgeführt um Unterschiede in der Atmosphärenzusammensetzung auszuschließen.

Die Ernte der Zellen bei den Standard- und PE-Versuchen erfolgte an Tag 5, bei den Stretch-Versuchen unmittelbar nach Beendigung des Stretchs, also in der Regel an Tag 4. Dazu wurden die Zellen stets ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 80µl (24-Well) bzw. 300µl (6-Well) 1x Passive Lysis Puffer pro Well aus dem Dual Glo Luciferase Assay Kit versetzt (vergleiche 3.4.12).

3.4.12 Luciferase-Assay

Die Messung der Firefly- und Renillaluciferase erfolgte mithilfe des DualGlo Luciferase Assay Kits von Promega 48h – 72h nach der Transfektion von C2C12-Zellen oder NRVCN. Dazu wurden die Zellen stets einmalig mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1x Passive Lysis Puffer lysiert. Die Lyse wurde gesteigert durch Inkubation der Zellen bei -80°C

für 30 Minuten direkt nach Zugabe des Lysepuffers. Anschließend erfolgte vor der Messung das Auftauen bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf einem Schüttler.

Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden zunächst Arbeitsansätze der benötigten Reagenzien hergestellt: Für die Messung der Firefly-Aktivität wurden 100ml des Dual-Glo Luciferase Puffers mit einem Fläschchen des Dual-Glo Luciferase Substrates, für die Bestimmung der Renilla-Aktivität 100ml Dual-Glo Stop & Glo Puffer mit 1ml des entsprechenden Substrates gemischt.

Anschließend wurden in eine intransparente 96-well Mikrotiterplatte 20µl der zu messenden Proben pro well in Triplikaten vorgelegt. Dann wurde die Platte in den Monochromator Infinite m200 Pro verbracht. Dort erfolgte die Aktivitätsmessung der beiden Luciferasen in jedem Well jeweils unmittelbar nacheinander wie folgt: Zunächst erfolgte das automatisierte Zugeben von 50µl Dual-Glo Luciferase Reagenz zum Well und damit die Aktivierung der Firefly-Luciferase. Nach der Aktivitätsbestimmung durch Messung der Lumineszenz bei 560nm erfolgte im zweiten Schritt die Beendigung der Firefly-Luciferase-Reaktion und der simultane Start der Renilla-Luciferase-Reaktion durch Autoinjektion von 50µl Dual-Glo Stop & Glo Reagenz sowie die Messung der Renilla-Aktivität durch Lumineszenzbestimmung bei 480nm. Schließlich erfolgte die Normierung der Firefly- durch die entsprechende Renillaaktivität und die statistische Auswertung der gewonnenen Daten (siehe 3.6).

3.4.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei Versuchen, bei denen festgestellt wurde, dass es zu einer Beeinflussung der Renilla-Luciferase-Aktivität durch zugesetzte Reagenzien kommt, wurde zusätzlich versucht zur Normalisierung auf die Renilla-Aktivität eine Normalisierung auf die Proteinkonzentration des Wells durchzuführen. Dies war bei allen Versuchen mit MEF2-VP16 (Induktion um den Faktor 6) und PE (Induktion um den Faktor 4) der Fall (siehe Abbildung 9), konnte allerdings bei den Versuchen mit PE schließlich nicht erfolgreich durchgeführt werden, da die messbare Proteinkonzentration bei den Versuchen mit NRVCN im 24-Well-Format unterhalb der minimalen Standardkonzentration von 0,0625mg/dl lag. Die Normalisierung der PE-behandelten Proben musste daher trotzdem über die Renilla-Luciferase erfolgen, mit der Folge, dass die PE-induzierte Aktivitätssteigerung der Firefly-Luciferase unterschätzt wird (vergleiche 5.4.3).

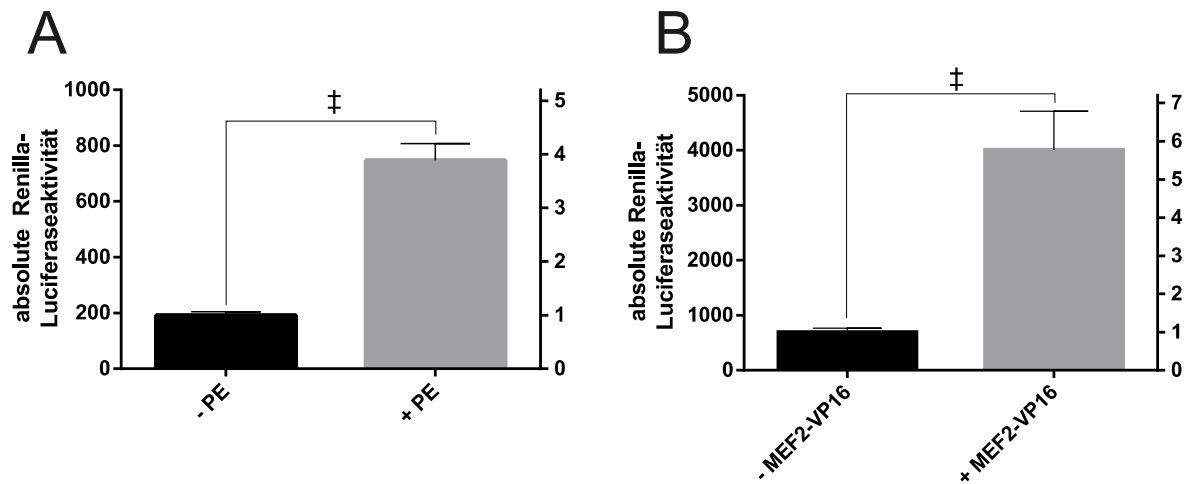


Abbildung 9: Renilla-Luciferaseaktivität in NRVCM in Abhängigkeit einer Behandlung mit 5µM Phenylephrin (A) und in C2C12-Zellen bei Kotransfektion von 100ng MEF2-VP16 (B). Die linke Skala zeigt jeweils die Absolutwerte der Renillaaktivität an, die rechte die Normierung auf die unbehandelte Kontrolle. Die Behandlung von NRVCM mit PE führte zu einer Induktion der Renilla-Luciferase um den Faktor 4 ($p < 0,0001$, A) während die Überexpression von MEF2-VP16 in C2C12-Zellen zu einer gesteigerten Aktivität um den Faktor 6 führte ($p < 0,0001$, B).

Die Behandlung der NRVCM mit Stretch führte nicht zu einer Induktion der Renilla-Luciferase-Aktivität (Abbildung 8).

Für die Messung der Proteinkonzentration musste ein Verfahren verwendet werden, dass mit dem Passive Lysis Puffer aus dem Luciferase Kit kompatibel ist. Es wurde daher das BCA (Bicinchoninic acid) Verfahren verwendet, das nicht so sensibel auf Lösungsmittel reagiert wie zum Beispiel das Verfahren nach Bradford.

Das Verfahren wurde in 96-Well Mikrotiterplatten mit dem Pierce BCA Assay

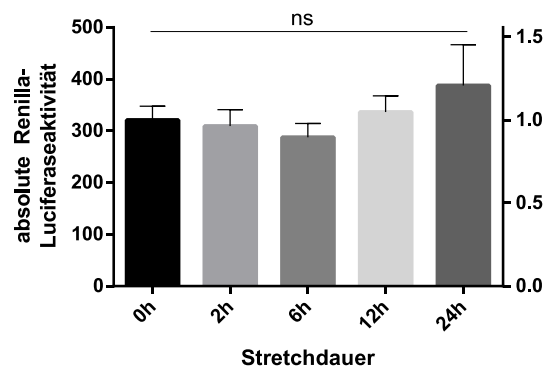


Abbildung 8: Absolute Renilla-Luciferaseaktivität in NRVCM abhängig von der Stretchdauer (linke Skala) und nach Normierung auf die ungestreckte Kontrolle (rechte Skala). Es zeigt sich keine signifikante Induktion der Renillaaktivität.

Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Dazu wurden zunächst Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1 gemischt. Von diesem Gemisch wurden anschließend 200µl in jedes Well vorgelegt und dann 25µl der zu messenden Probe hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der Proteinkonzentration über die Absorptionsbestimmung im Spektrometer bei 562nm. Zur Eichung der Messung wurden Proteinstandards aus bovinem Serumalbumin in Konzentrationen von 2mg/ml – 0,0625mg/ml

verwendet, die jeweils in 1x Passive Lysis Puffer angesetzt wurden. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen.

3.4.14 Mutagenese möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen

Die Mutagenese möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen in den Promotorkonstrukten erfolgte mit Hilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent. Als

Template-DNA dienten die im Vorfeld hergestellten Lmcd1-Promotorfragmente im pGL4.15-Vektor (siehe 3.1). Der erste Schritt der Mutagenese bestand in der Durchführung einer PCR zur Erzeugung und Amplifikation eines mutierten Plasmids. Die dafür hergestellten Primer (2.8.3) enthalten die veränderte Basensequenz und binden an jeweils

10x Reaktionspuffer	µl	5
Plasmid-DNA	ng	25
dNTP-Mix	µl	1
Primer 1	ng	125 - 250
Primer 2	ng	125 - 250
PfuUltra HF	u	2,5
ddH ₂ O	µl	ad 50

Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Mutagenese möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen.

komplementäre Regionen des Plus- bzw. des Minusstranges der Template-DNA (vergleiche Abbildung 10). Die Reaktionsansätze und PCR-Einstellungen sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

Im nächsten Schritt erfolgte der Verdau der (unmutierten) Template-DNA durch Restriktionsverdau mit DpnI.

Hintergrund dieses Vorgehens ist die Tatsache, dass das durch Plasmidextraktion aus E. coli gewonnene Ausgangsplasmid methyliert ist, während die mittels PCR synthetisierten DNA-Tochterstränge unmethyliert vorliegen. Da DpnI nur methylierte bzw. hemimethylierte DNA-Stränge schneiden kann, erfolgt so die selektive

Initiale Denaturierung (95°C)	min	00:30
18 Zyklen		
Denaturierung (95°C)	min	00:30
Annealing	°C	53 - 55
	min	01:00
Elongation (68°C)	min	08:00
Kühlung (4°C)	min	∞

Tabelle 11: PCR-Einstellungen für die Mutagenese möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen.

Degradation der Template-DNA, was die Erfolgchance auf tatsächlich mutierte Bakterienklone nach der Transformation deutlich erhöht. Für den enzymatischen Verdau wurde dem PCR-Ansatz direkt 10u DpnI zugesetzt und die Probe für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Schließlich erfolgte die Transformation von XL1-Blue-Zellen mittels Hitzeschock. Dazu wurden die Zellen langsam auf Eis liegend aufgetaut und dann in 50µl Aliquots in auf Eis vorgekühlte 14ml Röhrchen überführt. Zu diesen Röhrchen wurde dann jeweils 1µl Dpn1-behandelter PCR-Ansatz gegeben, durch Schwenken gemischt und für 30 Minuten auf Eis

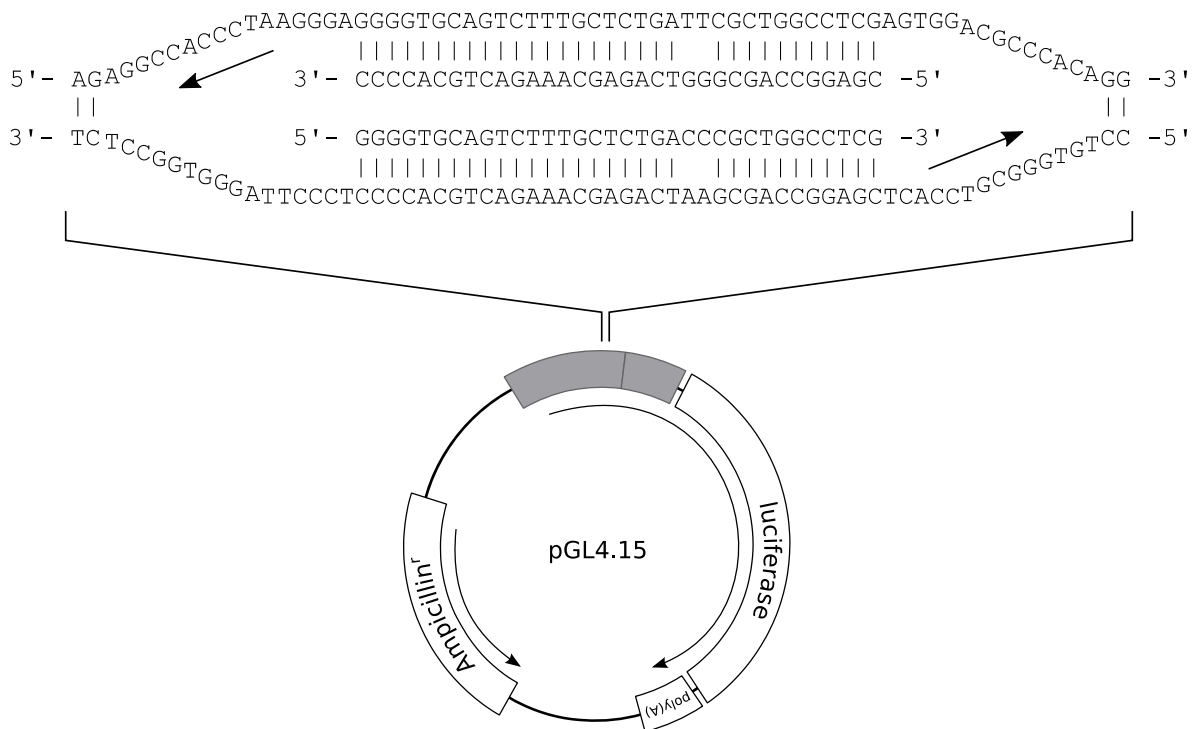


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Primerbindung bei der Mutagenese am Beispiel der NF-Y-Bindestelle im 208bp-Konstrukt. Die Pfeile zeigen die Richtung der DNA-Synthese an.

inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch Inkubation der 14ml-Röhrchen in einem Wasserbad bei 42°C für exakt 45 Sekunden und anschließender Kühlung auf Eis für 2 Minuten. Danach wurden zunächst 500µl auf 42°C gewärmtes LB-Medium zu den Röhrchen gegeben und dann die gesamte Probe in ein 1,5ml-Röhrchen überführt und für eine Stunde bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Abschließend erfolgte das Ausbringen der gesamten Probe auf einem Selektivnährboden (3.3.3)

3.5 Computergestützte Promotoranalyse

3.5.1 Extraktion der Promotorsequenz

Für die weitere Analyse möglicher cis-regulatorischer Elemente war zunächst die Extraktion der genomischen DNA-Sequenz des Promotors notwendig. Dazu wurde der UCSC Genome Browser in der Version von 2014 verwendet [438] mit dessen Hilfe jeweils die Sequenz der 5'-UTR sowie 1700bp (das längste erzeugte Promotorfragment enthält 1655bp zusätzlich zur 5'-

UTR) stromaufwärts des annotierten Transkriptionsstarts der Spezies *Rattus norvegicus* (Wanderratte) extrahiert wurde. Analog wurden für die phylogenetische Analyse die entsprechenden Sequenzen der Spezies *Homo sapiens* (Mensch), *Mus musculus* (Hausmaus), *Sus scrofa* (Hausschwein) und *Bos taurus* (Hausrind) ausgelesen und für die spätere Verwendung gespeichert.

3.5.2 Identifikation von cis-regulatorischen Elementen im proximalen Promotor

Unter der Annahme, dass funktionell relevante DNA-Bereiche einer geringeren Mutationsrate unterliegen als DNA-Bereiche ohne spezifische Funktion, ein Ansatz, der als Phylogenetic Footprinting bezeichnet wird [439], wurde zunächst ein Multi Sequence Alignment der extrahierten Promotorsequenzen (siehe 3.5.1) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Online-Version von Clustal Omega benutzt [434].

Die ersten experimentellen Ergebnisse zur basalen Promotoraktivität in C2C12-Zellen legten einen bedeutsamen Einfluss des Promotorbereichs von *Rattus norvegicus* von 88 bis 208 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts nahe (siehe 4.2). Für die computergestützte Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen wurde daher ausschließlich dieser Bereich des Promotors aus *Rattus norvegicus* sowie die mittels Multiple Sequence Alignment identifizierten homologen Sequenzen der vier weiteren Spezies verwendet (vergleiche Abbildung 16, S. 76). Diese wurden im nächsten Schritt jeweils einzeln mit Hilfe der JASPAR-Core-Datenbank in der Version von 2014 [436] auf mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Um die hohe Anzahl (> 100) der so identifizierten potentiellen Bindestellen weiter einzugrenzen, erfolgte anschließend die manuelle Überprüfung auf Bindestellen, die in allen untersuchten homologen Sequenzen vorhergesagt wurden. Nur diese wurden für die nachfolgende experimentelle Mutationsanalyse ausgewählt.

3.5.3 Identifikation von Kernpromotorelementen

Die Suche nach Kernpromotorelementen erfolgte zum einen analog zur der vorbeschriebenen Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen mit der JASPAR-PolIII-Datenbank und ergänzend mit dem ElemeNT-Online-Tool [435]. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Multiple Sequence Alignment des Bereiches von 50 Basen stromauf- bis 50 Basen stromabwärts bezogen auf den Transkriptionsstart von *Rattus norvegicus* verwendet um konservierte DNA-Bereiche innerhalb des Kernpromotors von *Rattus norvegicus* ausfindig zu machen, analog dem Vorgehen im Bereich des proximalen Promotors. Dieses Vorgehen erwies sich allerdings als wenig sinnvoll, da es dabei nicht zu einem Alignment der Transkriptionsstarts der

verschiedenen Spezies kommt (siehe Abbildung 11, S. 73). Da Kernpromotorelemente allerdings in der Regel sehr strikte Positionsanforderungen bezüglich ihrer Lokalisation in Relation zum Transkriptionsstart erfüllen müssen, dafür aber eher flexibel in Bezug auf die Bindemotive sind, also nicht unbedingt eine strenge Konservierung einzelner Basen notwendig ist, erfolgte für die in Abschnitt 3.5.1 genannten Spezies zusätzlich die isolierte Analyse des Bereiches von ± 50 Basen um den Transkriptionsstart mittels der JASPAR-PolII-Datenbank. Anschließend erfolgte zunächst die Eingrenzung der vorhergesagten Elemente durch Begrenzung auf diejenigen, die in allen Spezies an ähnlicher Position mit einer Abweichung von nicht mehr als 10 Basen vorhergesagt wurden. Aus den so ermittelten Elementen wurden schließlich noch diejenigen ausgeschlossen, die nicht die jeweiligen Positionsanforderungen in Bezug zum Transkriptionsstart erfüllten (vergleiche 1.1.1.5 sowie Abbildung 1, S. 12).

3.5.4 Identifikation von CpG-Inseln

Ob die Promotoren der untersuchten Spezies mit CpG-Inseln überlappen, wurde mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (siehe oben) untersucht, der zur Identifikation, die bereits in Abschnitt 1.2.3.1.1 angesprochenen Kriterien heranzieht [403] und das Vorkommen einer CpG-Insel unmittelbar als zusätzlichen Track grafisch darstellt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism in Version 6. Mittelwert, Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes wurden erhoben. Die Testung auf statistische Signifikanz erfolgte entweder mit dem Zweistichproben-t-Test oder beim Vergleich von mehr als zwei Bedingungen mittels ANOVA in Kombination mit der Newman-Keuls-Methode zur Korrektur für multiples Testen. Unterschiede ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. In sämtlichen in dieser Arbeit dargestellten Graphen zeigt der Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwertes an.

davon lokalisiert ist. Die in Abbildung 11 dunkelgrau hinterlegte Sequenz wurde außerdem als TATA-Box identifiziert und ist in *Rattus norvegicus* von -44 bis -38 und damit zumindest grob positionsgerecht lokalisiert (siehe 1.1.1.5.1). Die Sequenz ist zwar zwischen den Spezies konserviert, erfüllt aber in keiner anderen untersuchten Spezies die Positionsanforderungen. Dennoch erfolgte eine Mutationsanalyse dieses Bereiches, deren Ergebnisse im nächsten Abschnitt wiedergegeben sind.

Vergleicht man die verschiedenen Sequenzen stattdessen unter Ausrichtung am jeweiligen Transkriptionsstart, zeigen diese keinerlei Konservierung auf Ebene der Basensequenz

Rn	-50	ctctccaattaaagcagaccgcagcgcggtctctgagcacagagctgcccg	-1
Mm	-50	gattggctggcctggagtgggtgtccacgcgcattggctggtcacttttt	-1
Hs	-50	gtggctggcgaggttttagagggagtcctcgctctccaattaaagcgccc	-1
Bt	-50	cgccgcacccggctgctcacagagctctccctgggccagcgatcttagcc	-1
Ss	-50	gcccgcgatcctggccattcagccaccgctgcccccgctgcgcgcctcgc	-1
Rn	1	CTGGAAGCAGGCAAGGGAATCTGAACTTGGCCCATCAGCAGCGCTGTCCA	50
Mm	1	AGAGGGAGTCCCGCTCTCCAATTAAAGCGGGCAGCGGCGCGGCTCTGAGC	50
Hs	1	AGCTGCGCCTGGCTGCGCACAGAGCTCCCTCCCAGGCCCCGCGAACTTGGC	50
Bt	1	ATTCAAGCACAGCTGTCCCCACTGCACGCCCTCGCGCCTAAGCCTGAGCA	50
Ss	1	AGCCTCTGTCTAAGAAGCAAAGCTCTGTTTCTCCAGCCCAGAACAAG	47

*Abbildung 12: DNA-Bereich von 50 Basen stromauf- (Kleinbuchstaben) und 50 Basen stromabwärts (Großbuchstaben) des Transkriptionsstarts der Spezies *Rattus norvegicus* (Rn), *Mus musculus* (Mm), *Homo sapiens* (Hs), *Bos taurus* (Bt) und *Sus scrofa* (Ss) mit Ausrichtung am Transkriptionsstart. Grau hinterlegt ist das für alle Spezies vorhergesagte Initiator-Element.*

(Abbildung 12). Mit Hilfe der JASPAR-PolII-Datenbank wurde das in Abbildung 12 grau hinterlegte Initiator-Element als einziges in allen untersuchten Spezies in etwa positionsgerecht vorhergesagte Element identifiziert. Mit Ausnahme von *Mus musculus* ist es dabei der Anforderung entsprechend direkt um den Transkriptionsstart lokalisiert (vergleiche 1.1.1.5.2), zeigt allerdings in allen anderen Spezies eine relativ starke Abweichung vom Konsensusmotiv YYANWYY, die in *Rattus norvegicus* am deutlichsten ausgeprägt ist und eine prominente Rolle für die Transkriptionsinitiation unwahrscheinlich erscheinen lässt (siehe 5.2). Eine Mutation dieser Bindestelle erfolgte daher nicht. Die geringe Konservierung sowohl der Basensequenz als auch der Kernpromotorelemente lässt auf eine geringe funktionelle Relevanz des Kernpromotors für die Transkriptionsaktivität des *Lmcd1*-Promotors schließen.

4.1.1 Mutation einer putativen TATA-Box

Diese in *Rattus norvegicus* identifizierte mögliche Bindestelle für TBP ist zwar bereits im 87bp-Konstrukt vollständig enthalten, wurde aber im 208bp-Promotor untersucht, da erst dieser die

komplette basale Aktivität zeigt (vergleiche 4.2) und so die Beurteilung einer funktionellen Relevanz dieser DNA-Sequenz ermöglicht. Die Mutation der TBP-Bindestelle wurde ausschließlich in C2C12-Zellen analysiert und führte zu keiner signifikanten Reduktion der Promotoraktivität (siehe Abbildung 13). Eine kombinierte Mutation mit anderen der in Abschnitt 4.2.1 besprochenen Bindestellen erfolgte nicht.

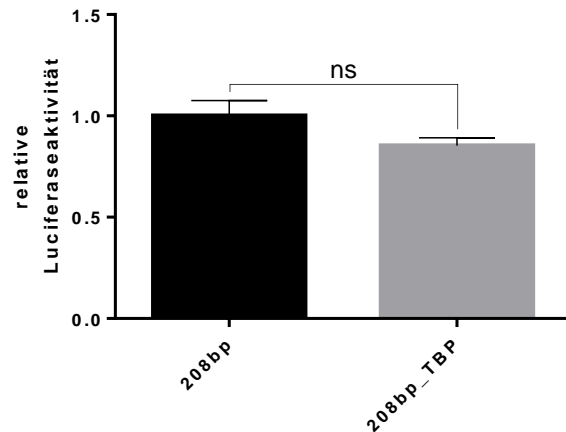


Abbildung 13: Die Aktivität des 208bp-Promotors zeigte nach Mutation der putativen TATA-Box keine signifikante Reduktion in C2C12-Zellen.

4.2 Basale Aktivität des Lmcd1-Promotors

Als basale Aktivität wird die Grundaktivität eines Promotors ohne weitere experimentelle Modulation bezeichnet, also ohne Zugabe transkriptionsfördernder oder -hemmender Substanzen. In C2C12-Zellen zeigte sich das in Abbildung 14 dargestellte Bild: das 87bp-Konstrukt liegt in seiner Aktivität zwar bereits um den Faktor 3 höher als die des minimalen 41bp-Konstrukts, der Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Ab dem 208bp-Promotor ist die Grundaktivität voll ausgeprägt und liegt ungefähr 20-fach über der minimalen Aktivität des 41bp-Promotors ($p < 0,0001$). Auf diesem Niveau bleibt die Baseline-Aktivität bis zum längsten Konstrukt konstant, mit Ausnahme des 478bp-Konstruktes: dieses zeigt, allerdings ausschließlich in C2C12-Zellen, nochmals eine signifikante Zunahme der Aktivität auf das 1,45-fache im Vergleich zum 208bp-Konstrukt ($p < 0,0001$). Im 922bp-Konstrukt fällt die Aktivität aber wieder auf das Level des 208bp-Promotors ab und verändert sich bis zum 1655bp-Konstrukt nicht mehr signifikant. Wie in Abbildung 15 dargestellt, liefern

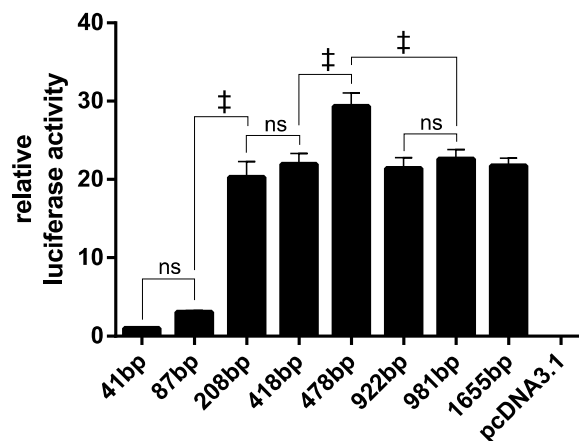


Abbildung 14: Basale Aktivität der Promotorkonstrukte in C2C12-Zellen. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA3.1.

die Untersuchungen in NRVCM ähnliche Ergebnisse, wobei das 208bp-Fragment eine im Vergleich zum 87bp-Konstrukt um den Faktor 11 gesteigerte Aktivität zeigt ($p < 0,001$), die sich dann in allen längeren Fragmenten nicht mehr signifikant ändert.

Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass die wesentlichen cis-regulatorischen Elemente, die essentiell für die Grundaktivität des Lmcd1-Promotors

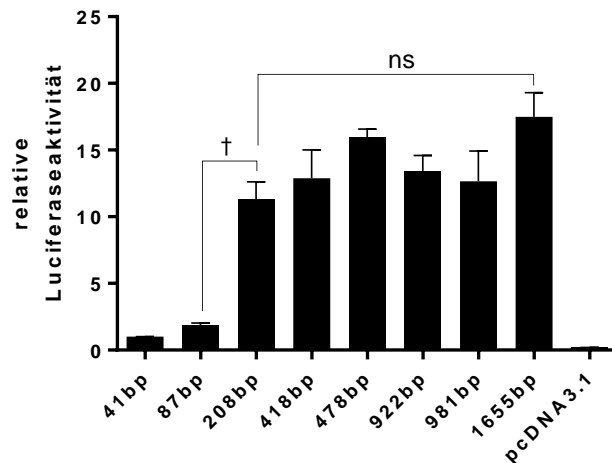


Abbildung 15: Basale Aktivität der Promotorkonstrukte in NRVCM. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA3.1.

von *Rattus norvegicus* sind, im Bereich von 88bp bis 208bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegen. Im nächsten Abschnitt werden daher die Ergebnisse der genaueren Analyse dieses Promotorabschnittes vorgestellt.

4.2.1 Bindestellen für CREB, NF-Y und Sp1 sind essentiell für die basale Aktivität des Lmcd1-Promotors

Zunächst erfolgte die computergestützte Analyse des Promotorbereichs von 88bp bis 208bp wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben. Abbildung 16 zeigt den Teil des Multiple Sequence Alignments zwischen Basenpaar 208 und 88 stromaufwärts des Transkriptionsstarts von *Rattus norvegicus*,

Rn	-208	gggcagccgggctaactgacgtcagggtagagttaa----gccaaagttctcagcctccctgca	-150
Mm		gggcagccgggctaagctgacgtcagggtagagttaa----gccaaagttctcagcctccctgca	
Hs		ggggccgcggccatgctgacgtcagggcagccggcgctcagctccgctcgctgccacagtgc	
Bt		ggggccgcggcctcactgacgtcaggggaagcgctcaatcagccgcagcctcccgccggggccc	
Ss		ggggccgcggcccgactgacgtcaggggaagcgcacactcggcagtagtctcccggtgggtcc	
		*** **** ***** ** * *	
		CREB	
Rn	-149	gagggcaccctaaggagggggtgcagt-ctttgctctgattcgctggcctcgagtggagcgccc	-88
Mm		gagggcaccctaaggaggggatgcagctttttgctctgattggctggcctggagtgggtgtcc	
Hs		gagacctccctgaggagggggacagcctcgcgctgggattggctggcctcgcgagcgccg	
Bt		gaacaccggaaggggtgggggggtaccgcgcagctgggattggctggcgaagtgcgaagcgccc	
Ss		aggccaccg----aaggaggggggagcgcgcgctgggattggctgaccaagagcgagcgccc	
		* * * * *** ***** ***** * *	
		Sp1 NF-Y NF1	

Abbildung 16: Multiple Sequence Alignment des Promotorabschnittes von 208bp bis 88bp von *Rattus norvegicus* (Rn) mit den korrespondierenden DNA-Abschnitten von *Mus musculus* (Mm), *Homo sapiens* (Hs), *Bos taurus* (Bt) und *Sus scrofa* (Ss). Die Zahlen bezeichnen jeweils die Position der ersten und letzten Base einer Zeile in Bezug auf den Transkriptionsstart des Lmcd1-Promotors von *Rattus norvegicus*.

also den DNA-Abschnitt, der im 208bp-Promotor zusätzlich zum 87bp-Konstrukt enthalten ist und in dem der größte Aktivitätszuwachs des Promotors beobachtet wurde (vergleiche Abbildung 14). Auf diese Weise wurden vier konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert, die in Abbildung 16 grau eingefärbt sind: Ein CRE-Motiv, das vollständig dem Konsensusmotiv TGACGTCA entspricht und von Position -192 bis -185 lokalisiert ist, ein schwaches Bindemotiv für Sp1 (vergleiche 1.2.2.5) mit der Sequenz GGGAGGG von Position -136 bis -130, ein Halbmotiv für NF1 mit der Sequenz TGGC von -106 bis -103 sowie ein ausschließlich in *Rattus norvegicus* vom Konsensus leicht abweichendes Bindemotiv für NF-Y der Sequenz CTGATTCGCT von -115 bis -106. Dabei ist zu beachten, dass das Bindemotiv für NF-Y in umgekehrter Orientierung vorliegt, die Sequenz des Konsensusmotivs also der des Gegenstranges entspricht, was allerdings nicht ungewöhnlich ist [357]. Für die funktionelle Analyse dieser putativen Bindestellen erfolgte die Mutation der Bindestellen wie folgt (mutierte Basen unterstrichen, siehe auch 2.8.3): TGACGTCA zu TAGTACTA (CREB), GGGAGGG zu GTTAAAG (Sp1), CTGATTCGCT zu CTGACCCGCT (NF-Y) und TGGC zu TTTA (NF1). Der Einfachheit halber erfolgt die Bezeichnung der Bindestellen nach dem prominentesten der vorhergesagten Transkriptionsfaktoren, obgleich natürlich nur auf Basis von Computeranalysen nicht vorhergesagt werden kann, welcher den dominierenden Bindungspartner in vivo darstellt (vergleiche 1.2.2).

4.2.1.1 In C2C12-Zellen

Wie in Abbildung 17 dargestellt, führt weder die alleinige Mutation der Bindestelle für Sp1 (A) noch der für CREB (B) oder NF1 (C) zu einer signifikanten Veränderung in der basalen

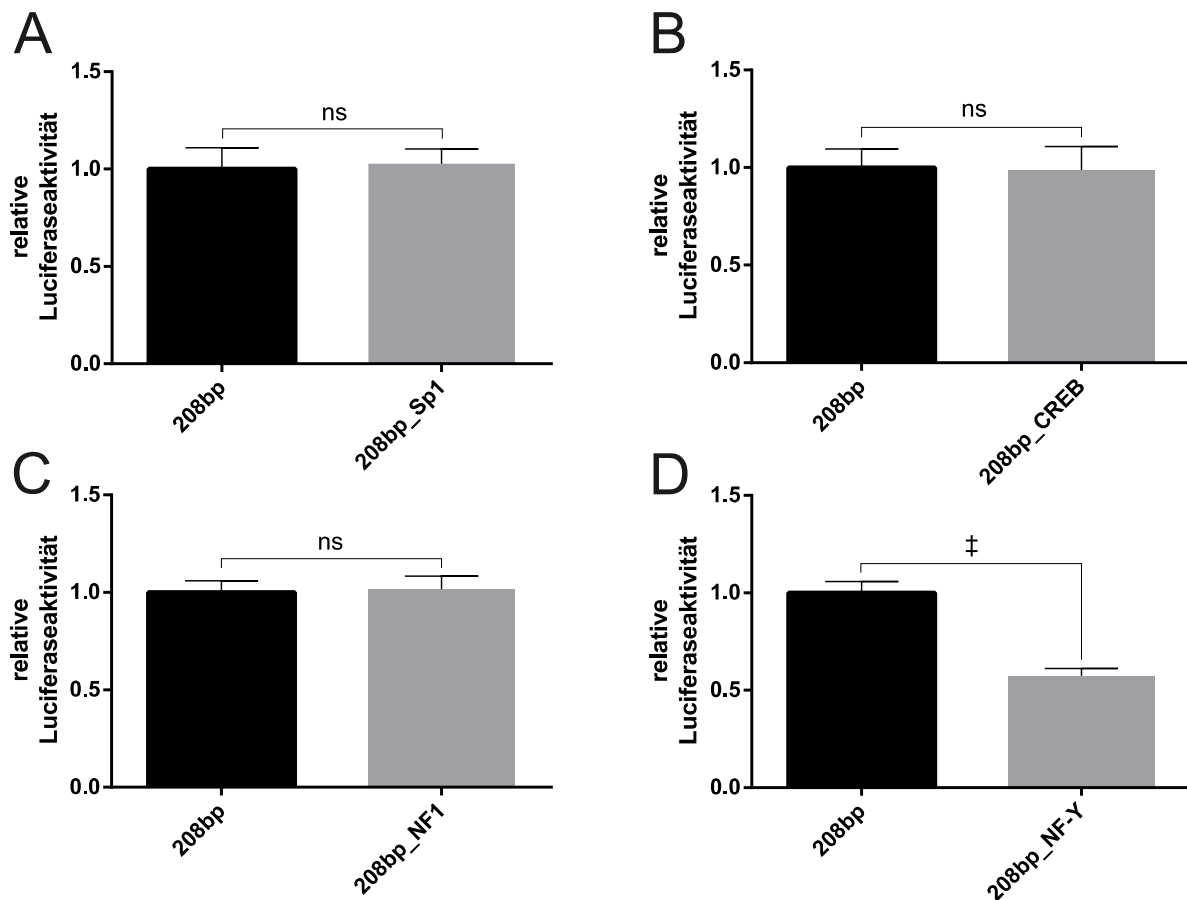


Abbildung 17: Luciferase-Assay nach Mutation einzelner Bindestellen im 208bp-Promotor in C2C12-Zellen. Während weder die einzelne Mutation der Bindestellen für Sp1 (A), CREB (B), oder NF1 (C) zu einer Veränderung der Promotoraktivität führt, kommt es nach alleiniger Mutation der NF-Y-Bindestelle (D) zu einer Reduktion der Promotoraktivität um ca. 40% ($p < 0,0001$).

Promotoraktivität. Im Gegensatz dazu kommt es nach der Mutation der NF-Y-Bindestelle zu einem Abfall der Promotoraktivität um ca. 40% ($p < 0,0001$; Abbildung 17D).

Die kombinierte Mutation der Bindestellen für Sp1 und CREB hat genau wie die beiden Einzelmutationen keinen signifikanten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität ($p = 0,13$; Abbildung 18A). Wird die Sp1-Bindestelle allerdings zusätzlich zur Bindestelle für NF-Y mutiert, führt dies zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Promotoraktivität als die alleinige Mutation der NF-Y-Bindestelle: im Vergleich zum Wildtyp-Promotor ist die Aktivität

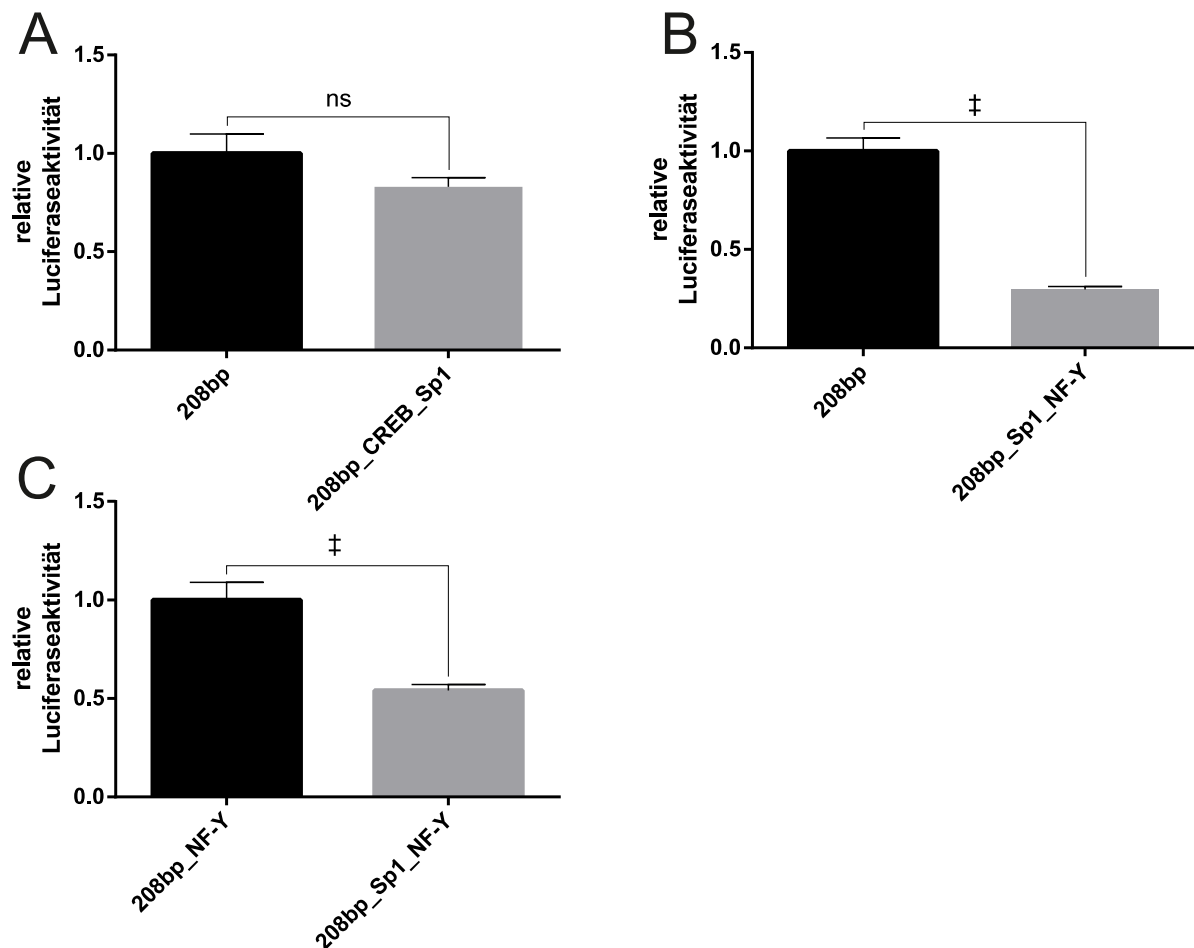


Abbildung 18: Luciferase-Assay nach kombinierter Mutation von zwei Bindestellen im 208bp-Promotorkonstrukt in C2C12-Zellen. Die kombinierte Mutation der Bindestellen für Sp1 und CREB führt zu keiner Reduktion der Promotoraktivität (A). Die kombinierte Mutation der Bindestellen für Sp1 und NF-Y führt zu einer Reduktion der Promotoraktivität um 70% im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (B, $p < 0,0001$) und um 45% im Vergleich zur alleinigen Mutation der NF-Y-Bindestelle (C, $p < 0,0001$).

um ca. 70% ($p < 0,0001$; Abbildung 18B) und im Vergleich zur alleinigen NF-Y-Mutation um ca. 45% reduziert ($p < 0,0001$; Abbildung 18C).

Durch gleichzeitige Mutation der Sp1-, CREB- und NF-Y-Bindestellen verringert sich die Promotoraktivität noch weiter: im Vergleich zum Wildtyp-Promotor wird eine Reduktion um

83% erreicht ($p < 0,0001$; Abbildung 19A) und um 43% im Vergleich zum Konstrukt mit Mutation der NF-Y- und Sp1-Bindestelle ($p < 0,0001$; Abbildung 19B).

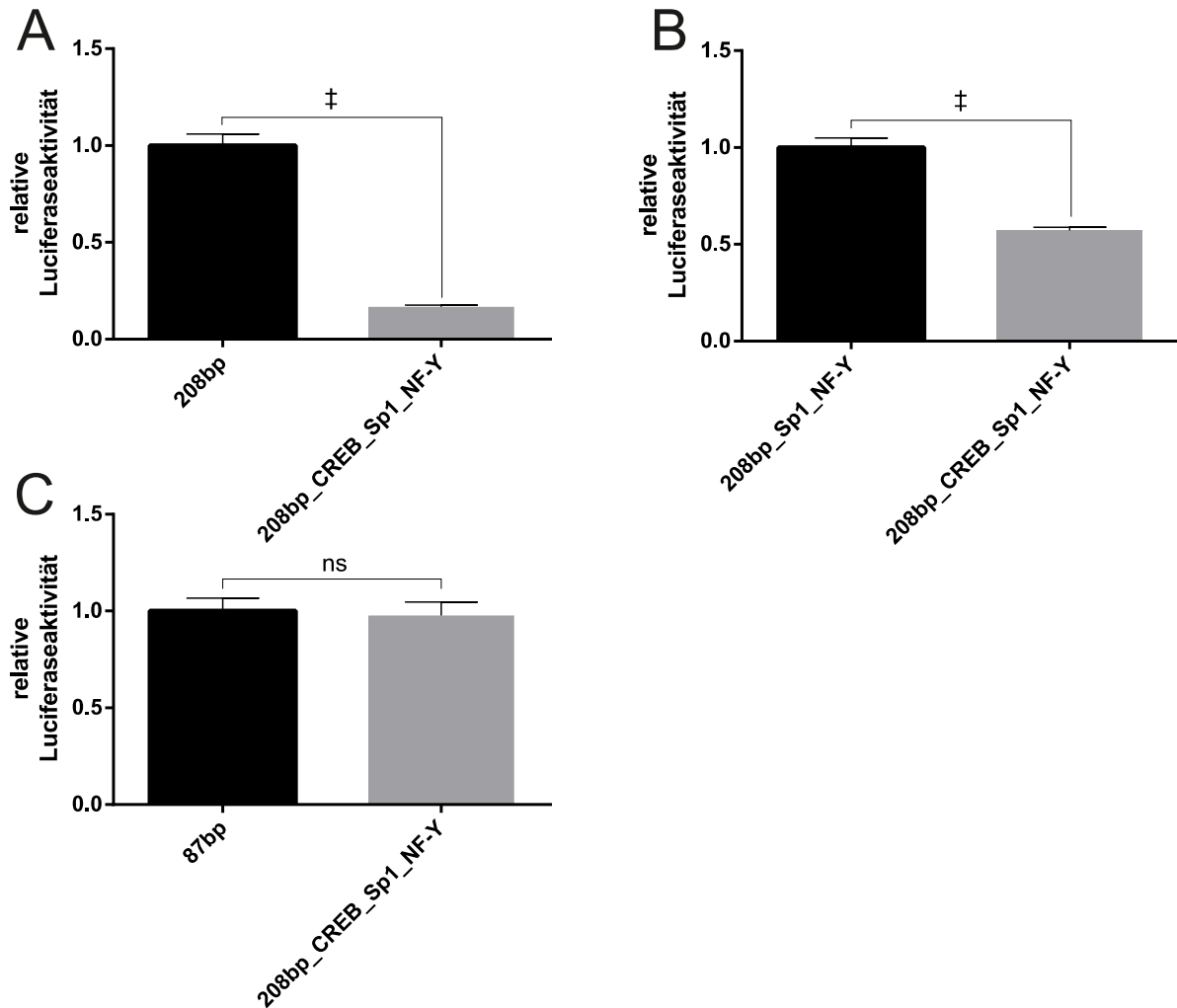


Abbildung 19: Luciferase-Assay nach kombinierter Mutation der Sp1-, CREB- und NF-Y-Bindestellen im 208bp-Promotor in C2C12-Zellen. Durch Mutation der CREB-Bindestelle zusätzlich zur Mutation der Sp1- und NF-Y-Bindestellen sinkt die Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp-Promotor um 83% (A, $p < 0,0001$) und im Vergleich zum Promotor ohne CREB-Mutation um 43% (B, $p < 0,0001$). Im Vergleich mit dem nächstkürzeren Konstrukt von 87bp zeigt sich nach Mutation aller drei Bindestellen kein Aktivitätsunterschied mehr (C, $p = 0.81$).

Im direkten Vergleich des dreifach mutierten Promotorkonstruktes zeigt sich kein Aktivitätsunterschied im Vergleich zum kürzeren 87bp-Konstrukt ($p = 0,82$; Abbildung 19C).

4.2.1.2 In neonatalen ventrikulären Rattenherzmuskelzellen

Die experimentellen Daten in neonatalen Rattenherzmuskelzellen (NRVCM) bestätigen die Ergebnisse in C2C12-Zellen mit einigen kleinen Unterschieden: Wie auch in C2C12-Zellen führt die alleinige Mutation der Sp1- oder CREB-Bindestelle nicht zu einer signifikanten

Reduktion der Promotoraktivität (Abbildung 20A und B), wohingegen die Mutation der NF-Y-Bindestelle zu einer deutlichen Abnahme der Promotoraktivität um 70% führt ($p < 0,0001$,

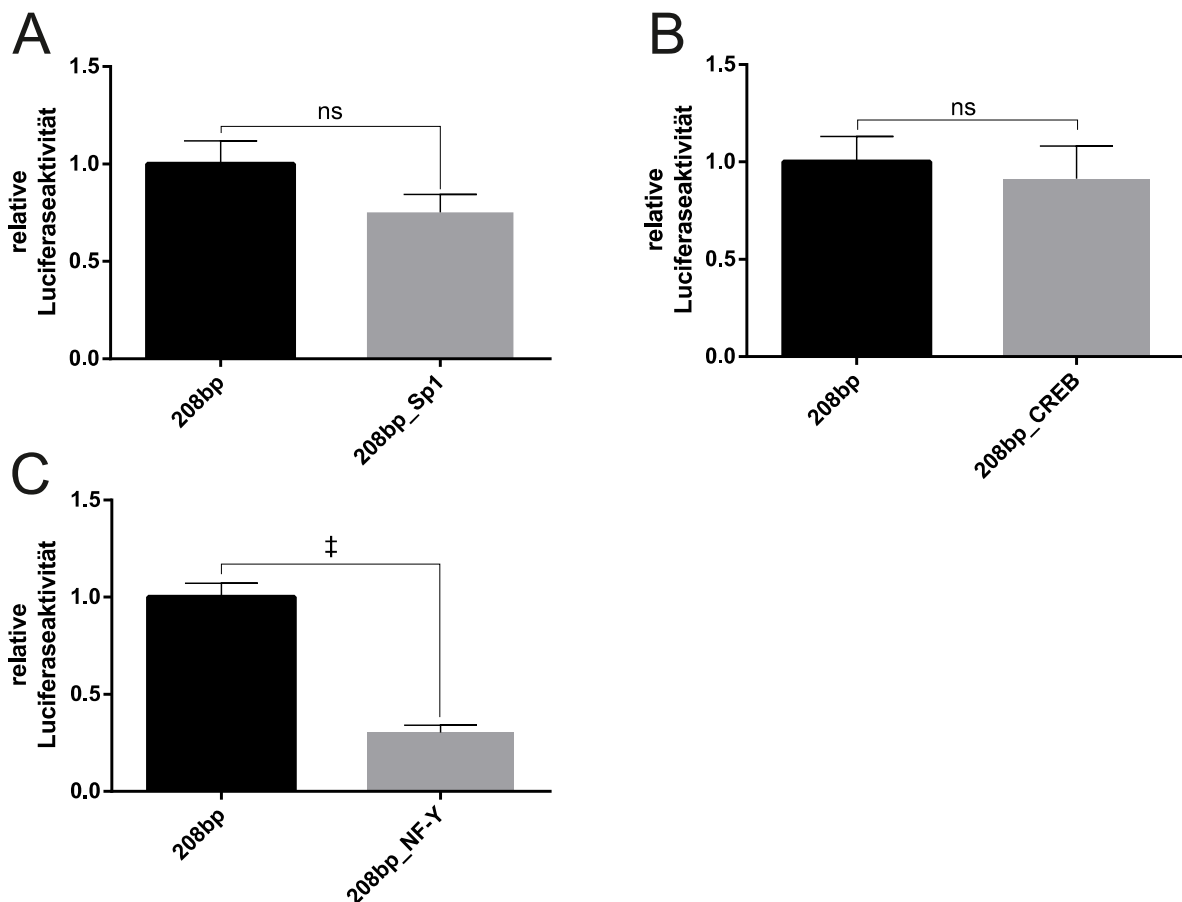


Abbildung 20: Luciferase-Assay nach Mutation einzelner Bindestellen im 208bp-Promotorkonstrukt in NRVCN. Die alleinige Mutation sowohl der Sp1- (A) als auch der CREB-Bindestelle (B) führt zu keiner signifikanten Reduktion der Promotoraktivität. Die isolierte Mutation der NF-Y-Bindestelle führt zu einer verringerten Aktivität um 70% (C, $p < 0,0001$).

17C). Für die Mutation der NF1-Bindestelle wurden in NRVCN keine Untersuchungen durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in C2C12-Zellen führt die kombinierte Mutation der Sp1- und CREB-Bindestelle in NRVCN zu einer signifikanten Reduktion der Promotoraktivität um 51% (Abbildung 21A, $p < 0,0001$). Die zusätzliche Mutation der Sp1-Bindestelle bei bereits mutierter NF-Y-Bindestelle führt zu einer um 77% reduzierten Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (Abbildung 21B, $p < 0,0001$) und damit im indirekten Vergleich mit der alleinigen NF-Y-Mutation nur zu einer geringen zusätzlichen Aktivitätsabnahme. Der direkte Vergleich von 208bp_NF-Y und 208bp_Sp1_NF-Y wurde in NRVCN nicht durchgeführt.

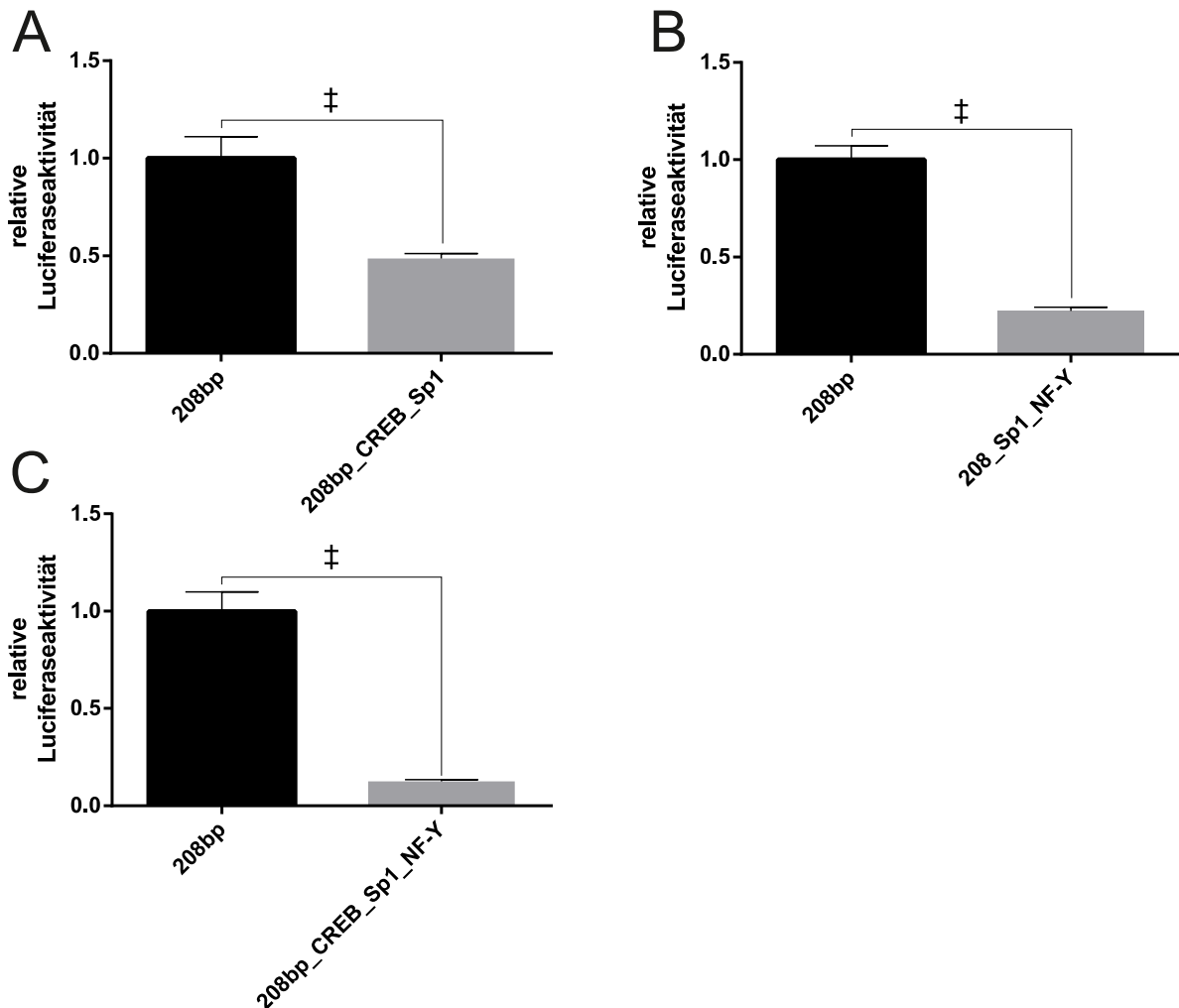


Abbildung 21: Kombinierte Mutation mehrerer Bindestellen des 208bp-Promotorkonstrukts in NRVCN. Die simultane Mutation der CREB- und der Sp1-Bindestelle verringert die Promotoraktivität um 51% (A, $p < 0,001$). Die Promotoraktivität nimmt bei kombinierter Mutation der Sp1- und NF-Y-Bindestelle um 77% (B, $p < 0,001$) und Mutation aller drei Bindestellen um 87% ab (C, $p < 0,001$).

Die Abnahme der Promotoraktivität nach kombinierter Mutation der Sp1-, CREB- und NF-Y-Bindestelle im Vergleich zum Wildtyp liegt bei 87% (Abbildung 21C, $p < 0,0001$). Es wurde kein direkter Vergleich dieses Konstruktes mit dem 87bp-Promotor in NRVCN durchgeführt, die ähnliche Aktivitätsreduktion im indirekten Vergleich mit den Untersuchungen in den C2C12-Zellen spricht allerdings dafür, dass auch in NRVCN durch Mutation dieser drei Bindestellen eine Abnahme der Aktivität auf das Niveau des 87bp-Promotors zu erwarten wäre.

4.3 Der Lmcd1-Promotor enthält zwei hochkonservierte MEF2-Bindestellen

Aus Screeningexperimenten einer anderen Arbeitsgruppe in HEK-Zellen war bekannt, dass die Expression von MEF2C-VP16 zu einer starken Aktivierung des Lmcd1-Promotors in vitro führt. Durch dieselbe Arbeitsgruppe war außerdem bereits eine putative MEF2-Bindestelle im

Lmcd1-Promotor identifiziert worden. Bei dieser Bindestelle handelte es sich um die in Abbildung 22 dargestellte proximale MEF2-Bindestelle. Diese befindet sich zwischen Position -365 und -355bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Durch eine weitere computergestützte Analyse des Promotors konnte eine zusätzliche konservierte MEF2-Bindestelle identifiziert werden, die in enger Nachbarschaft zur proximalen Bindestelle zwischen Position -388 und -378bp lokalisiert ist und im Folgenden als distale MEF2-Bindestelle bezeichnet wird. Diese

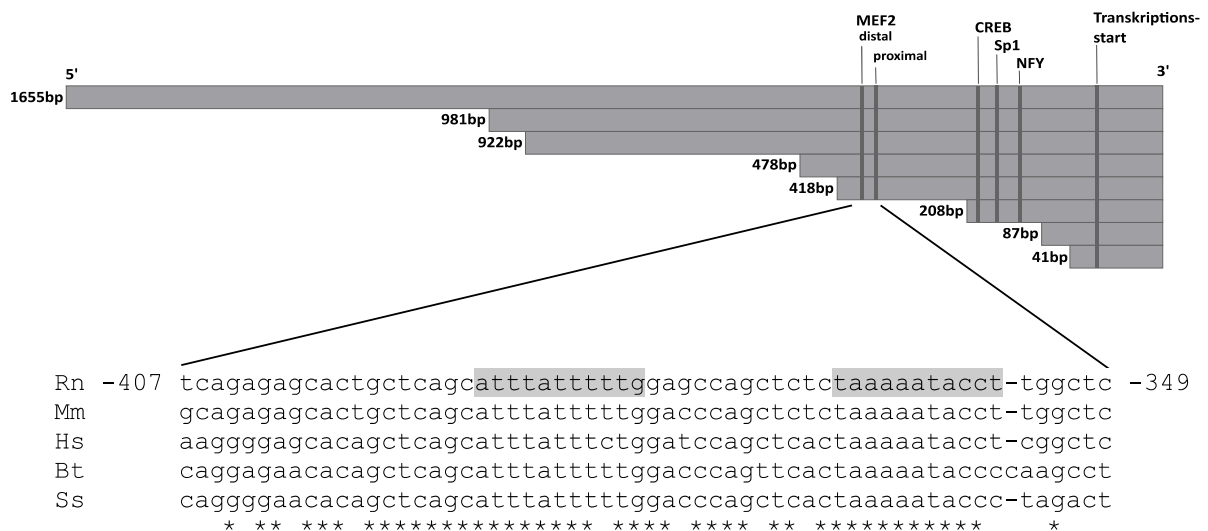


Abbildung 22: Das Multiple Sequence Alignment der Promotorsequenz von *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos taurus* und *Sus scrofa* im Zusammenspiel mit der computergestützten Suche nach cis-regulatorischen Elementen führte zur Identifizierung zweier putativer Bindestellen für MEF2. Diese sind zwischen Position -388 bis -378 (distale) beziehungsweise -365 und -355 (proximale) in Bezug zum Transkriptionsstart lokalisiert und im unteren Teil der Abbildung grau hinterlegt. Aus dem oberen Teil der Abbildung ist ersichtlich, dass diese ab dem 418bp-Promotor in den Promotorfragmenten enthalten sind.

beiden Bindestellen sind im 418bp-Konstrukt sowie allen längeren Promotorfragmenten enthalten und wurden durch Überexpression des Aktivators MEF2C-VP16 sowie Mutation auf ihre funktionelle Relevanz geprüft.

4.3.1 Überexpression von MEF2C-VP16 führt zu einer Aktivierung des Lmcd1-Promotors in C2C12-Zellen

Wie in Abbildung 23 zu erkennen, führt die Überexpression von MEF2C-VP16 in denjenigen Promotorfragmenten, in denen die beiden MEF2-Bindestellen enthalten sind, also ab dem 418bp-Fragment, zu einer Aktivierung des Lmcd-Promotors um den Faktor 20 im Vergleich zur

Basalaktivität des 208bp-Promotors ($p < 0,0001$).

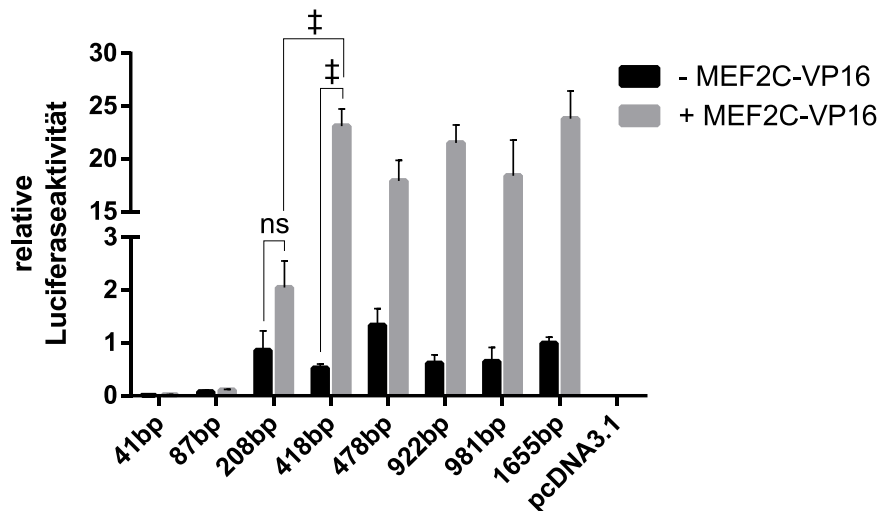


Abbildung 23: Promotoraktivität in Abhängigkeit von Promotorlänge und Überexpression von MEF2C-VP16. Fragmente, die die beiden MEF2-Bindestellen enthalten, zeigen eine um den Faktor 20 gesteigerte Aktivität im Vergleich zur basalen Aktivität des 208bp-Promotors ($p < 0,0001$). Die Normalisierung erfolgte auf die Proteinkonzentration.

4.3.2 Mutation der MEF2-Bindestellen führt zu reduzierter Promotoraktivierung durch Überexpression von MEF2C-VP16

Zum Nachweis, dass für die in Abbildung 23 dargestellten Aktivitätssteigerungen des Lmcd1-

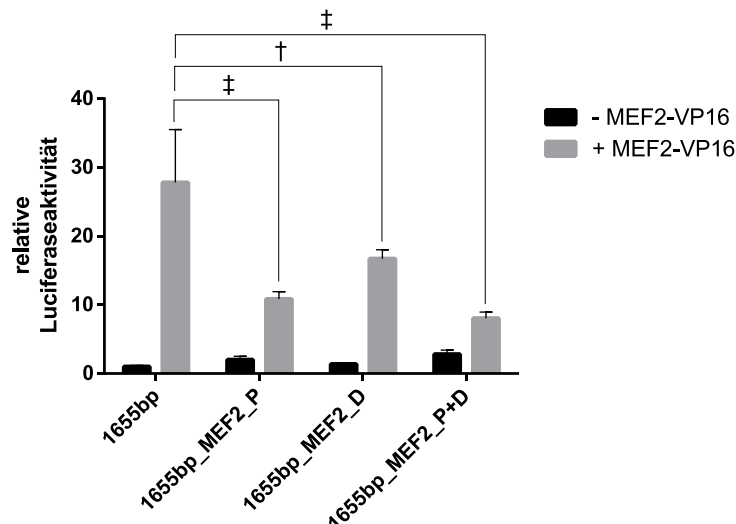


Abbildung 24: Vergleich der Wildtypaktivität des 1655bp-Promotors mit der Aktivität nach isolierter Mutation der proximalen (MEF2_P) beziehungsweise distalen (MEF2_D) Bindestelle sowie nach kombinierter Mutation beider Bindestellen (MEF2_P+D). Die Normalisierung erfolgte auf die Proteinkonzentration.

Promotors ab dem 208bp-Fragment durch MEF2C-VP16 die beiden identifizierten MEF2-Bindestellen notwendig sind, erfolgte die einzelne und kombinierte Mutation dieser Bindestellen im 1655bp-Promotor (Abbildung 24). Im Vergleich zum Wildtyp-Promotor führt die alleinige Mutation der proximalen MEF2-Bindestelle zu einer Reduktion der Aktivität um 60% ($p < 0,0001$), die der distalen um 40% ($p < 0,001$). Die kombinierte Mutation beider Bindestellen führt zu einer Reduktion der Promotoraktivität unter Überexpression von MEF2C-VP16 von ca. 70% ($p < 0,0001$). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutationskonstrukten waren allesamt nicht signifikant.

4.4 Behandlung der Zellen mit Phenylephrin führt zur Aktivierung des Lmcd1-Promotors in NRVCN

Unter einer Stimulation der NRVCN mit 5 μ M Phenylephrin für 48h kommt es beim 418bp-Konstrukt zu einer signifikanten Aktivierung des Promotors um den Faktor zwei (Abbildung 24, $p < 0,0001$). Bei den deutlichen Schwankungen, die bei den längeren Promotorkonstrukten unter Behandlung mit PE sichtbar sind, handelt es sich mit einiger Wahrscheinlichkeit um Artefakte. Da sich in Folgeexperimenten auch für das längste Fragment von 1655bp Länge eine signifikante Steigerung der Aktivität um den Faktor 2 durch eine Behandlung mit PE zeigte (siehe Abbildung 26), wurde es leider versäumt

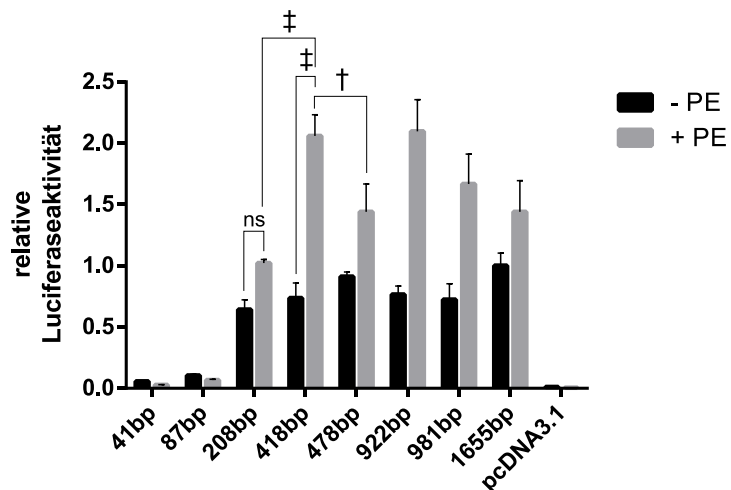


Abbildung 25: Aktivität der Promotorkonstrukte mit und ohne Stimulation durch Phenylephrin (PE). Normalisierung durch Renilla-Luciferase, unstimulierte Aktivität des 1655bp-Promotors = 1.0. Der 418bp-Promotor zeigt eine signifikante Steigerung der Aktivität um den Faktor 2 durch Stimulation mit PE. Den Schwankungen der PE-induzierten Aktivität in den längeren Konstrukten ist am ehesten artefaktbedingt (siehe Haupttext). Die scheinbare Reduktion der PE-bedingten Aktivität der beiden kürzesten Promotoren resultiert aus einer Induktion der Renilla-Luciferase durch PE.

diese Ergebnisse nochmals für alle Fragmente zu bestätigen. Wie schon in Abschnitt 3.4.13 beschrieben und in Abschnitt 5.4.3 diskutiert, führt die Behandlung von NRVCN mit PE ebenfalls zu einer Induktion der Renilla-Luciferase. Da eine Proteinbestimmung leider technisch nicht realisierbar war, musste dennoch eine Normalisierung durch die Renilla-Luciferase erfolgen. Dies erklärt einerseits die scheinbare PE-induzierte Reduzierung der

Aktivität der 41bp- und 87bp-Promotoren (Abbildung 25), und führt andererseits zu einer Unterschätzung der PE-induzierten Aktivitätssteigerung in den größeren Konstrukten.

4.4.1 Die Phenylephrin-abhängige Promotoraktivierung in NRVCN ist unabhängig von MEF2-Bindestellen

Nach erfolgter Mutation einer oder beider MEF2-Bindestellen kommt es unter Stimulierung der NRVCN mit 5µM Phenylephrin nicht zu einer Reduktion der Promotoraktivität (Abbildung 26). Dabei ist zu beachten, dass die Behandlung mit PE jeweils zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führt ($p < 0,001$ für 1655bp-Wildtyp; $p < 0,0001$ für alle anderen Konstrukte). Als Nebenfund zeigt sich, dass die Mutation der MEF2-Bindestellen ebenfalls nicht zu einer Reduktion der basalen Promotoraktivität führt, was nach den Ergebnissen der initialen Experimente zur Basalaktivität auch nicht zu erwarten war.

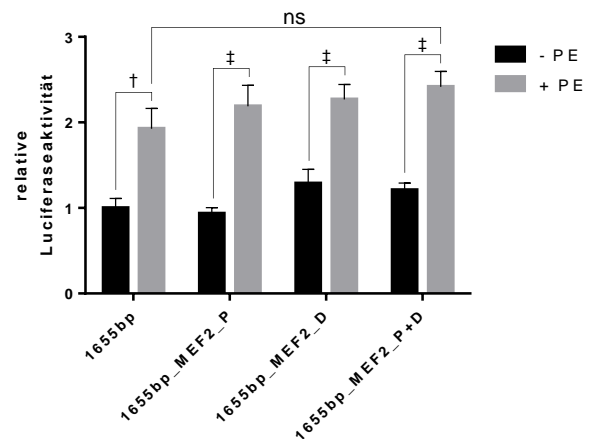


Abbildung 26: PE-abhängige Aktivität des 1655bp-Wildtyppromotors im Vergleich mit den MEF2-Mutationskonstrukten. Weder die isolierte noch die kombinierte Mutation der beiden MEF2-Bindestellen führt zu einer Änderung der Promotoraktivierung unter Einfluss von PE.

4.5 Aktivierung des untersuchten Promotorfragments durch biaxiale Dehnung ist fraglich

In NRVCN, die nach der Transfektion des 1655bp-Promotorkonstruktes biaxialer Dehnung (Stretch) ausgesetzt werden, kommt es in Abhängigkeit von der Stretchdauer zu einer Zunahme der Promotoraktivität (Abbildung 27). Diese Zunahme der Aktivität ist zwar bereits nach kürzerer stretch-Dauer zu erkennen, führt aber erst nach 24h zu einer signifikanten Steigerung um den Faktor 2 ($p < 0,001$). Bereits hier muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass es sich hierbei um Ergebnisse handelt, die sich

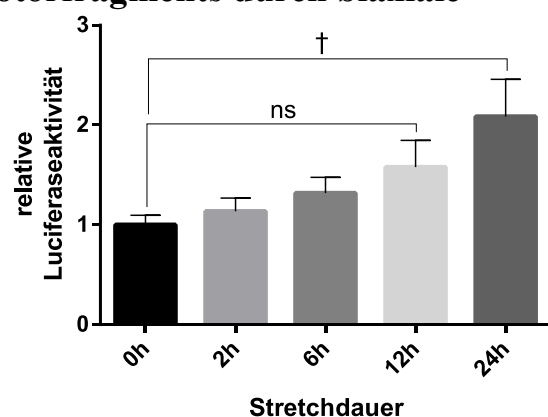


Abbildung 27: Stretch-abhängige Aktivität des 1655bp-Promotors nach 0, 2, 6, 12 und 24 Stunden. Nach 24 Stunden zeigt sich eine signifikante Zunahme der Aktivität um den Faktor 2 ($p < 0,001$).

experimentell nur inkonsistent replizieren ließen und daher die Aussagekraft dieser Ergebnisse eingeschränkt ist. Für weitere Details wird auf den folgenden Abschnitt sowie Abschnitt 5.4.4 verwiesen.

4.5.1 Mutation der MEF2-Bindestellen hat keinen Einfluss auf die Stretch-abhängige Aktivität des Lmcd1-Promotors

Zur Untersuchung des Einflusses der beiden MEF2-Bindestellen auf die Promotoraktivierung durch biaxialen Stretch wurde der 1655bp-Wildtyp-Promotor mit dem 1655_MEF2_P+D-Konstrukt verglichen. Nach 24h Stretch zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede in der Promotoraktivität zwischen den beiden Konstrukten (Abbildung 28A). Allerdings ließ sich auch die nach den initialen Ergebnissen (vergleiche Abbildung 27) erwartete Stretch-induzierte Aktivitätssteigerung um den Faktor zwei nach 24h hier nicht replizieren: Weder der Wildtyp-

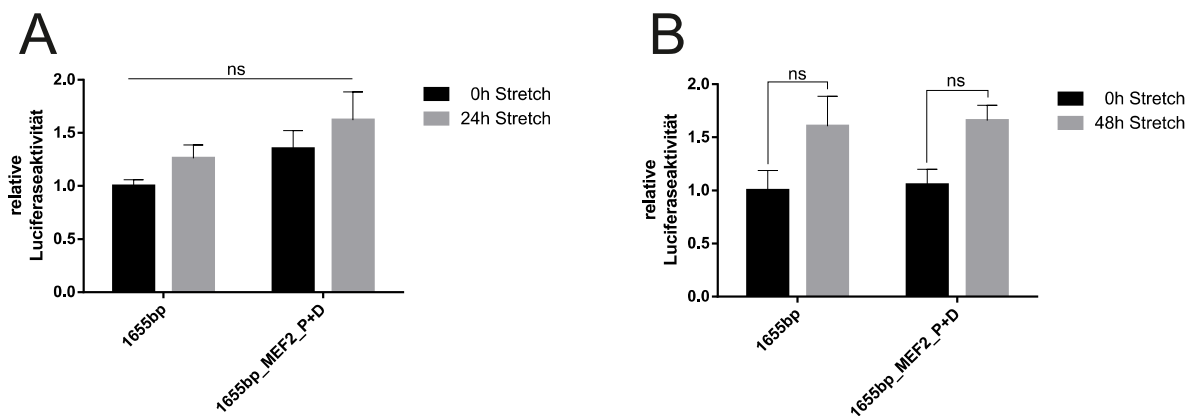


Abbildung 28: Promotoraktivität des Wildtyp-1655bp-Promotors und des 1655bp-Promotors mit kombinierter Mutation der beiden MEF2-Bindestellen nach 24h (A) und 48h (B). Es zeigt sich keinerlei Unterschied in der Promotoraktivierung zwischen unmutiertem und mutiertem Promotor. Entgegen den Erwartungen zeigt sich allerdings auch keine signifikante Induktion des Promotors durch Stretch, weder nach 24 noch nach 48 Stunden.

noch der mutierte Promotor zeigen nach 24h eine signifikante Steigerung der Aktivität im Vergleich zur nicht gestretchten Kontrolle (Abbildung 28A). Nach Verlängerung der Stretch-Dauer auf 48h ist die Aktivitätssteigerung durch Stretch zwar deutlich erkennbar, erreicht mit einer Zunahme um 50% aber nicht das erwartete Maß und ist ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 28B). Auch nach 48h zeigt sich kein Unterschied in der Promotoraktivität durch Mutation der beiden MEF2-Bindestellen im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (Abbildung 28B).

5 Diskussion

5.1 Generelle methodische Einschränkungen

Bevor die spezifischen Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden, soll zunächst auf einige Probleme hingewiesen werden, die durch die verwendete Methodik und den Versuchsaufbau bedingt sind. Obwohl es sich bei dem in dieser Arbeit zur Promotoranalyse verwendeten Ansatz, der auf der transienten Transfektion von Reporterplasmiden in Zielzellen *in vitro* basiert, um ein etabliertes Vorgehen handelt, existieren Einschränkungen die aus den Unterschieden zwischen Modell und *in vivo* Bedingungen resultieren. Diese werden im folgenden Absatz besprochen und sollten bei der Interpretation und Einordnung der Ergebnisse bedacht werden.

5.1.1 Unterschiede zwischen *in vitro* Modell und Bedingungen *in vivo*

5.1.1.1 Chromatinstruktur

Wie in Abschnitt 1.2.3.2 ausgeführt, spielt die Ordnung der DNA in Form von Chromatin eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Transkription. Für die Promotoranalyse mit Hilfe von transfizierten Plasmiden stellt sich daher die Frage, ob diese nach der Transfektion Nukleosomen ausbilden und wenn ja ob dies zu einer Chromatinstruktur führt, die mit derjenigen *in vivo* vergleichbar ist. Tatsächlich kommt es nach der Transfektion von Plasmiden zur Assoziation von Histonen mit Ausbildung einer Chromatinstruktur, die zwar in mancher Hinsicht Ähnlichkeiten mit derjenigen *in vivo* aufweist, aber auch deutliche Unterschiede erkennen lässt [440]: so kommen die Histone außer Histon H1 zwar in einem ähnlichen stöchiometrischen Verhältnis wie in regulärem Chromatin vor, scheinen sich aber eher zufällig und unkoordiniert anzuordnen [441]. Der Mangel an Histon H1 geht mit einem eher permissivem Zustand der transfizierten DNA einher [441] während die aberrante Organisation der übrigen Histone die Transkription in unvorhersehbarer Weise beeinflusst: so besteht einerseits die Möglichkeit, dass regulatorische Elemente als funktional identifiziert werden, obwohl deren Funktion im regulären Kontext durch Nukleosomen behindert wird. Umgekehrt werden funktionale Elemente möglicherweise nicht identifiziert, wenn diese nur im Kontext mit regulär strukturiertem Chromatin notwendig sind, beispielsweise zur Rekrutierung von am Chromatinremodelling beteiligten Enzymen wie BRG1 [442].

Zusammenfassend bedeutet dies, dass der in dieser Arbeit verwendete Ansatz die komplexen Chromatin-bedingten Einflüsse auf die Transkription unzureichend abbildet.

5.1.1.2 Methylierung

In ähnlicher Weise wie bereits für die Chromatinstruktur besprochen, muss davon ausgegangen

werden, dass das Methylierungsmuster des transfizierten Promotors vom natürlichen Zustand abweicht. Die verwendeten Vektoren sind ebenso wie die mittels PCR amplifizierten Promotorabschnitte zunächst komplett unmethyliert. Der in dieser Arbeit zur Vermehrung der Reporterplasmide verwendete *E. coli*-Stamm DH10B exprimiert die Methyltransferasen *dcm* und *dcm*, was zu einer Methylierung von Adenin im Motiv GATC [443] sowie des jeweils zweiten Cytosins der Motive CCTGG und CCAGG führt [444]. Es kommt folglich zu keiner Methylierung an CG-Dinukleotiden, so dass ein deutlich anderes Methylierungsmuster als in Eukaryonten entsteht (vergleiche 1.2.3.1). Nach der Transfektion in die Zielzellen ist die Plasmid-DNA zwar den eukaryontischen Methyltransferasen ausgesetzt, da diese aber vor allem hemimethylierte DNA-Stränge im direkten Anschluss an die Replikation als Substrat nutzen [445], kommt es vermutlich nicht zu einer relevanten Änderung des Methylierungsmusters.

Entsprechend den oben angestellten Überlegungen besteht bei dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz keinerlei Konservierung des ursprünglichen genomischen Methylierungsmusters des untersuchten Promotors.

5.1.1.3 Genomischer Kontext

Ein weiterer Unterschied des Modells liegt in der isolierten Betrachtung des Promotors außerhalb des genomischen Kontextes, also insbesondere außerhalb der Organisation von topologisch assoziierenden Domänen (vergleiche 1.2.1, 1.2.1.2 und 1.2.1.3), in das der Promotor regulär eingebettet ist: durch die isolierte Unterbringung des Promotors auf einem Plasmid, werden eventuelle Einflüsse von weiter distal gelegenen Enhancern oder Silencern nicht erfasst. Es ist daher möglich, dass regulatorische Elemente in ihrer Bedeutung über- oder unterschätzt beziehungsweise gar nicht erst identifiziert werden, da sie eine Wirkung ausschließlich im Zusammenspiel mit distalen Elementen entfalten.

5.1.2 Unterschiedliche Größe der verwendeten Plasmide

Generell gilt, dass die Effektivität einer Transfektion mit Hilfe von Liposomen (Lipofektion) mit zunehmender Größe des zu transfizierenden Plasmids abnimmt [446]. Dieser Effekt, der bei Plasmidgrößen bis 10kb besonders stark ausgeprägt ist, wurde in der genannten Untersuchung allerdings bei Normalisierung auf die Proteinkonzentration bestimmt. Unter der Annahme, dass bei Lipofektion eines größeren Testplasmids bei simultaner Lipofektion eines Kontrollplasmids konstanter Größe auch dieses mit geringerer Effektivität transfiziert wird und somit der systematische Fehler reduziert werden kann, wurde in dieser Arbeit, wenn möglich, ein entsprechender Ansatz verfolgt (für Ausnahmen siehe 3.4.13). Dennoch ist auch bei diesem

Vorgehen ein abnehmender Lipofektionserfolg mit steigender Plasmidgröße zu beobachten, der in einer Studie in einem Unterschied in der Transfektionseffektivität von 50 - 80% (abhängig von der untersuchten Zellart) zwischen Plasmiden mit einer Größe von 5,1kb bzw. 6,3kb resultierte [447]. Die in dieser Arbeit verwendeten Reporterplasmide besitzen bedingt durch die unterschiedliche Länge der eingefügten Promotorfragmente eine Größe zwischen 6099bp und 7713bp, so dass dieser Effekt vermutlich ebenfalls auftritt und bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden muss. Da in dieser Arbeit eine deutliche und signifikante Zunahme der Promotoraktivität mit zunehmender Promotor- und entsprechend mit zunehmender Plasmidgröße beobachtet wurde, ist das Ausmaß des verzerrenden Effektes aber vermutlich begrenzt.

Zusätzlich muss bedacht werden, dass die in dieser Arbeit durchgeführte massenäquivalente an Stelle einer äquimolaren Transfektion der Plasmide vermutlich ebenfalls zu einer reduzierten Luciferaseaktivität der größeren Plasmide führt, da diese bereits im Transfektionsgemisch in geringerer Molekülzahl vorliegen.

5.2 Kernpromotor

Die computergestützte Analyse der Kernpromotorregion erfolgte mit Hilfe zweier unterschiedlicher Vorgehensweisen. Unter der Annahme, dass funktionell bedeutsame DNA-Bereiche des Kernpromotors einer geringeren Mutationsrate unterliegen als solche ohne Funktion, erfolgte initial die Suche nach Kernpromotorelementen auf Basis des Multiple Sequence Alignments der Kernpromotorregion von *Rattus norvegicus* mit den Promotorsequenzen von *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos taurus* und *Sus scrofa*. Diese Analyse identifizierte ein schwach ausgeprägtes aber konserviertes TATA-Motiv (siehe 4.1). Die Sequenz AATTAAAG, die bereits eine relativ große Abweichung vom Konsensusmotiv TATAWAAR zeigt, ist von Position -44 bis -38 lokalisiert und zeigt in *Rattus norvegicus* somit zusätzlich eine deutliche Abweichung im Hinblick auf die optimale Positionierung im Bereich von -27 bis -32. Allerdings wird bei oben genanntem Vorgehen keine Rücksicht auf die Lage des jeweiligen Transkriptionsstarts in den Vergleichsspezies genommen. Entsprechend zeigte sich keinerlei Konservierung bezüglich der Entfernung des Motivs vom Transkriptionsstart, die beispielsweise bei *Sus scrofa* etwa -90 und bei *Mus musculus* +20 Nukleotide betrug. Dies ließ eine bedeutsame Funktion dieses TATA-Motivs als konserviertes Kernpromotorelement bereits a priori als unwahrscheinlich erscheinen, was durch die nachfolgende Mutationsanalyse bestätigt wurde.

Um der großen Rolle, die der relativen Position der Kernpromotorelemente in Bezug zum

Transkriptionsstart zukommt, besser gerecht zu werden, erfolgte zusätzlich eine für jede Spezies getrennt durchgeführte Suche nach Kernpromotorelementen im Bereich des Transkriptionsstarts ± 50 Nukleotide. Die nachfolgende Selektion nur derjenigen Elemente, die in allen Spezies an einer mit der Funktion des jeweiligen Elementes vereinbaren Position lokalisiert waren, führte zur Identifikation eines Initiator-Elementes. Während dieses in den Spezies *Homo sapiens* (CCAGCTC, 6 von 7 Basen konserviert), *Bos taurus* (CCATTCA, 6/7) und *Sus scrofa* (CGAGCCT, 5/7) sowohl die Sequenz als auch die Position betreffend eine relativ gute Übereinstimmung mit den Anforderungen zeigt, entspricht die algorithmisch vorhergesagte Sequenz in *Mus musculus* zwar perfekt der Konsensussequenz von YYANWYY liegt aber in toto stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Eine manuelle Überprüfung der direkt um den Transkriptionsstart von *Mus musculus* gelegenen Sequenz (TTAGAGG) zeigt allerdings, dass diese ebenfalls in 5 von 7 Basen mit dem Konsensusmotiv übereinstimmt. Die um den Transkriptionsstart von *Rattus norvegicus* gelegene Sequenz (CCGCTGG, 4/7) zeigt die geringste Sequenzkonservierung und ist auch die optimale Position betreffend um ein Nukleotid nach stromaufwärts verschoben. Unter der Annahme, dass der in den übrigen Spezies relativ gut konservierte Initiator tatsächlich funktionell relevant ist, erscheint es verlockend zu spekulieren, dass die schwache Konservierung dieses Elements im Kernpromotor von *Rattus norvegicus* in seiner Funktion durch die schwache TATA-Box ergänzt beziehungsweise ersetzt wird. Tatsächlich wird berichtet, dass TATA-Box und Inr unter bestimmten Umständen in der Lage sind sich funktionell zu ersetzen und bei gemeinsamem Auftreten synergistisch zu wirken [448]. Dabei scheint das Ausmaß der Synergie insbesondere von der Zusammensetzung des proximalen Promotors abzuhängen [449] und ist bei Sp1-haltigen Promotoren ausgeprägt [450,451]. Gegen diese Theorie spricht, dass die DNA-Sequenz, die das TATA-Motiv in *Rattus norvegicus* enthält, wie oben beschrieben auch in den anderen Spezies konserviert ist, was eine funktionelle Bedeutung nahelegt, die aber aufgrund der oben besprochenen deutlichen Unterschiede bezüglich der Lokalisation zum Transkriptionsstart eine andere Funktion als die eines Kernpromotorelementes vermuten lässt.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dass der Kernpromotor von *Lmcd1* nur einen vernachlässigbar geringen Einfluss auf die Transkriptionsrate besitzt. Diese Annahme wird durch den bei strikter Definition vollkommenen Mangel an herkömmlichen Kernpromotorelementen in *Rattus norvegicus* gestützt (siehe oben). Wie in Abschnitt 1.2.3.1.1 ausgeführt überlappen solche Promotoren häufig mit CpG-Inseln und sind außerdem mit sogenannten zerstreuten Promotoren assoziiert, an denen der Promotor mehrere Transkriptionsstarts aufweist, die über einen Bereich von 50 – 200 Basenpaaren verteilt sind

(siehe 1.2.1.1.3). Während der Promotor von *Rattus norvegicus*, wie auch der von *Mus musculus* und *Bos taurus*, aber keine solche Überlappung zeigt, liegt der Transkriptionsstart in den Spezies *Homo sapiens* und *Sus scrofa* tatsächlich in einer CpG-Insel.

Über die Anzahl und Verteilung der Transkriptionsstarts im *Lmcd1*-Promotor liegen aus dem Fantom5-Projekt [452–454] nur Daten für *Homo sapiens* und *Mus musculus* vor, die ebenfalls divergent sind: Für *Homo sapiens* werden insgesamt 7 Peaks gelistet, die über einen Abschnitt von ca. 350 Basenpaaren verteilt liegen, während für *Mus musculus* nur ein singulärer Peak aufgeführt wird.

Zusammenfassend bleiben bezüglich der regulatorischen Funktion und des Aufbaus des Kernpromotors von *Lmcd1* viele offene Fragen, die gegebenenfalls in weiteren Untersuchungen geklärt werden müssen.

5.3 Basale Aktivität des *Lmcd1*-Promotors

In dieser Arbeit konnte die fundamentale Bedeutung dreier Transkriptionsfaktorbindestellen für die basale Aktivität des *Lmcd1*-Promotors herausgearbeitet werden. Es handelt sich dabei um Bindestellen für CREB, Sp1 und NF-Y. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, erfolgte keine experimentelle Bestimmung der tatsächlich an diese Motive bindenden Transkriptionsfaktoren, so dass neben den namensgebenden Faktoren stets noch weitere als Bindungspartner in Frage kommen. So sagt die computergestützte Analyse für die CREB-Bindestelle beispielsweise Pax-

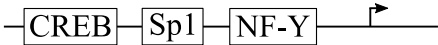

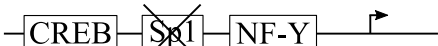
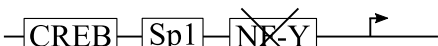

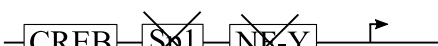

		Promotoraktivität	
		C2C12	NRVCM
<p>KLF1, 4 und 5 sowie für die NF-Y-Bindestelle Gfi-1b als potentiell weitere Bindungspartner vorher. Obgleich einige dieser Alternativen eher unwahrscheinlich erscheinen (die CREB-Bindestelle zeigt eine deutlich geringere Übereinstimmung mit dem Pax-2 Konsensusmotiv, Gfi-1b ist ein reiner transkriptionaler Repressor</p>		100%	100%
		100%	90% (ns)
		100%	75% (ns)
		60%	30%
		85% (ns)	50%
		30%	20%
		15%	12,5%

Abbildung 29: Promotoraktivität in C2C12-Zellen und NRVCM bei variabler Mutationskombination der identifizierten Bindestellen. Nicht signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp sind entsprechend gekennzeichnet (ns).

[455] und würde daher nicht zu den Ergebnissen dieser Arbeit passen), sind zur definitiven Klärung der tatsächlich bindenden Faktoren weitere Untersuchungen notwendig.

Für die weiteren Überlegungen wird angenommen, dass es sich bei den bindenden Faktoren tatsächlich um CREB, Sp1 und NF-Y handelt. In Abbildung 29 ist der Einfluss verschiedener Mutationskombinationen auf die Aktivität des 208bp-Promotors zusammengefasst. Insgesamt sind die Ergebnisse in C2C12-Zellen und NRVCN ähnlich: in beiden Zellarten trägt die NF-Y-Bindestelle den größten Teil zur basalen Promotoraktivität bei, während isolierte Mutationen der anderen beiden Bindestellen zu keiner (C2C12) bzw. nur leichter aber nicht signifikanter Reduzierung der Promotoraktivität führen (NRVCN). Der synergistische Einfluss, den auch die CREB- und Sp1-Bindestelle auf die Promotoraktivität ausüben, wird deutlich, wenn diese Bindestellen kombiniert untereinander bzw. zusammen mit der NF-Y-Bindestelle mutiert werden. In Zusammenschau mit dem wahrscheinlichen Fehlen funktionaler Kernpromotorelemente (vergleiche 5.2), soll hier ein Modell postuliert werden, in dem die drei Faktoren CREB, Sp1 und NF-Y für die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie und die Ausbildung des PIC verantwortlich sind. Eine direkte Interaktion mit Bestandteilen des PIC, insbesondere mit TFIID, ist entsprechend für alle drei Faktoren beschrieben und auch die synergistische Kombination dieser drei Faktoren ist für andere Promotoren, wie beispielsweise den Sox9-Promotor, dokumentiert [456,457]. Für den Lmcd1-Promotor von *Rattus norvegicus* muss dabei beachtet werden, dass es sich bei den jeweiligen Bindemotiven nur bei dem für CREB um das optimale Motiv (TGACGTCA) handelt. Das Motiv für Sp1 (GGGAGGG) unterscheidet sich vom optimalen Motiv GGGCGGG und bindet Sp1 mit um den Faktor 3 reduzierter Affinität [374]. Analog dazu weicht die Bindestelle für NF-Y in *Rattus norvegicus* (ATTCG, entspricht CGAAT auf dem Gegenstrang) ebenfalls vom Konsensusmotiv (CCAAT, entspricht ATTGG auf dem Gegenstrang) ab. Als möglicher zusätzlicher Synergiemechanismus kommt daher die gegenseitige Bindung und Stabilisierung von Sp1 und NF-Y in Betracht, die ebenfalls bereits beschrieben ist und möglicherweise die imperfekten Bindemotive kompensiert [358,380].

5.4 Funktion der MEF2-Bindestellen

In dieser Arbeit sind zwei putative MEF2-Bindestellen im proximalen Lmcd1-Promotor von *Rattus norvegicus* identifiziert worden, die in den Spezies *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos taurus* und *Sus scrofa* konserviert sind (siehe 4.3). In C2C12-Zellen führt die Überexpression des Fusionsproteins MEF2C-VP16, welches aus der DNA-Bindedomäne von MEF2C sowie der Transaktivierungsdomäne von VP16 besteht, zu einer Steigerung der Transkriptionsrate um

den Faktor 20, die durch Mutation jeweils einer oder beider MEF2-Bindestellen signifikant reduziert wird.

5.4.1 Unterschiede zwischen MEF2C und MEF2C-VP16

Ogleich diese Ergebnisse einen stimulatorischen Einfluss von MEF2C auf die Promotoraktivität von *Lmcd1* nahelegen, muss beachtet werden, dass sich MEF2C-VP16 deutlich vom MEF2-Wildtyp unterscheidet: zwar enthält es die MADS- und MEF2-Domäne von MEF2C, die neben der DNA-Bindung auch eine Vielzahl der Interaktionen mit Koaktivatoren vermittelt (vergleiche 1.2.2.2), diese zeigen aber für sich alleingegenommen keinerlei Aktivierung der Transkription [326]. Erst durch die Fusion mit der Aktivierungsdomäne von VP16 entsteht ein potenter Transkriptionsaktivator, der die Transkription von einem MEF2-getriebenen Promotor um 60% stärker induziert als der MEF2C-Wildtyp [326]. Die Mechanismen der Transkriptionsaktivierung durch VP16 unterscheiden sich allerdings deutlich von Wildtyp-MEF2C: VP16 interagiert mit einer Vielzahl der basalen Transkriptionsfaktoren sowie dem Mediator- und SAGA-Komplex (siehe 1.2.2.6), so dass vermutlich ein Großteil des stimulierenden Effekts auf die beschleunigte Rekrutierung und Assemblierung des PIC zurückzuführen ist, während für Wildtyp-MEF2C keine Interaktionen mit basalen Transkriptionsfaktoren beschrieben sind [458]. Stattdessen scheint MEF2C seine aktivierende Funktion über die Interaktion mit Faktoren zu entfalten, die eher indirekt auf die Initiation wirken wie Sp1 [341] und p300 [339] bzw. durch Wirkung auf die Elongation mittels P-TEFb [338], so dass aus den Überexpressionsexperimenten mit MEF2C-VP16 nur mit großer Vorsicht auf einen analogen Effekt durch Wildtyp-MEF2C geschlossen werden sollte. Es wäre daher von großem Interesse, die durchgeführten Experimente unter Überexpression von Wildtyp-MEF2C zu wiederholen.

5.4.2 Kein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die basale Promotoraktivität

Zwar erschien ein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die basale Promotoraktivität auf Grund der Tatsache, dass kein Zuwachs an Basalaktivität im 418bp- im Vergleich zum 208bp-Promotor beobachtet werden konnte bereits früh als unwahrscheinlich, im Lichte der berichteten Fähigkeit zur synergistischen Interaktion mit Sp1 (siehe oben) war allerdings nicht auszuschließen, dass ein zusätzlich hemmender Faktor im 418bp-Promotor durch stimulierende Wirkung von MEF2C kompensiert würde. Diese Möglichkeit wurde allerdings durch Mutation der MEF2-Bindestellen ausgeschlossen, nach der sich keine Reduktion der basalen Aktivität des *Lmcd1*-Promotors zeigte (siehe 4.4.1)

5.4.3 PE-induzierte Promotoraktivierung von Lmcd1

Bei Phenylephrin (PE) handelt es sich um einen α_1 -Adrenorezeptoragonisten, der seine Wirkung über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt und für den schon lange ein prohypertropher Effekt im Rahmen der kardialen Hypertrophie nachgewiesen ist [459]. Im Anschluss an die Rezeptorbindung kommt es über eine Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras [460] neben einer Aktivierung von ERK-1/2 auch zu einer Aktivierung von p38, das über Phosphorylierung zu einer Aktivierung von MEF2 führt [332]. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung von Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinasen [461], die synergistisch mit den vorgenannten MAP-Kinasen und durch PE stimulierbar zu einer Aktivierung von MEF2 führen [327]. Weiterhin aktiviert PE den Calcineurin-Signalweg [421,462], der ebenfalls an der Aktivierung von MEF2 beteiligt ist (siehe 1.2.2.2).

Es lag daher nahe einen Einfluss der beiden MEF2-Bindestellen auf die von Frank et al. beobachtete PE-induzierte Überexpression von Lmcd1 [421] anzunehmen. Der Besprechung der MEF2-Bindestellen soll allerdings zunächst eine vergleichende Betrachtung der Promotoraktivierung durch PE in dieser Arbeit mit dem beobachteten Effekt bei Frank et al. vorangestellt werden: In den Untersuchungen von Frank et al. erzeugte die Stimulation von NRVCN in Zellkultur mit PE eine Erhöhung der Lmcd1-mRNA-Spiegel um den Faktor 2,5. Dies korreliert zwar auf den ersten Blick gut mit der in dieser Arbeit gezeigten Promotoraktivierung von Lmcd1 um den Faktor 2, beim Vergleich dieser Werte müssen aber einige zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden: (1) Ganz allgemein sind indirekte Vergleiche zwischen verschiedenen Studien aufgrund des erhöhten Verzerrungspotentials in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. (2) Bei der in dieser Arbeit gemessenen Aktivierung des Lmcd1-Promotors mittels Aktivitätsbestimmung des Firefly-Luciferase-Proteins handelt es sich letztlich um eine Messung der gebildeten Proteinmenge, da sich das gemessene Firefly-Signal proportional zu dieser verhält. Im Gegensatz dazu korreliert die mRNA-Menge allgemein nur schwach mit der tatsächlichen Proteinmenge [463,464], so dass Protein- und mRNA-Menge nur unter Vorbehalt verglichen werden sollten. In Untersuchungen an lebenden Mäusen nach Aortenligatur waren die gemessenen Steigerungen der mRNA- und Proteinspiegel von Lmcd1 allerdings vergleichbar [423]. (3) Die Behandlung mit PE führte neben einer Aktivierung des Lmcd1-Promotors auch zu einer gesteigerten Expression des Renilla-Luciferase-Proteins vom Kontrollvektor pRL-TK etwa um den Faktor 4 (siehe 3.4.13). Es wurde daher eine alternative Normalisierung auf die Proteinkonzentration pro Well versucht, die allerdings aufgrund der geringen messbaren Proteinkonzentration in den Versuchen mit NRVCN nicht etabliert werden konnte (siehe ebenfalls 3.4.13). Daher musste die

Normalisierung trotz dessen Induktion mit pRL-TK durchgeführt werden, was wahrscheinlich die deutliche Unterschätzung der PE-abhängigen Aktivierung des Lmcd1-Promotors zur Folge hat.

Nimmt man hypothetisch an, dass die in dieser Arbeit gezeigte Promotoraktivierung deutlich über eine Verdopplung hinaus- und mit einem entsprechenden Anstieg der mRNA-Spiegel einhergeht, kommt es zu einer Diskrepanz der berichteten Ergebnisse, die zusätzlich zu den oben genannten noch durch weitere Faktoren erklärt werden könnte: (1) Wie in Abschnitt 5.1.1.3 erwähnt, wurde der Lmcd1-Promotor in dieser Arbeit isoliert von seinem genomischen Kontext betrachtet, das heißt die Auswirkung von weiter entfernt gelegenen Silencern oder Enhancern wird nicht erfasst und führt gegebenenfalls zur Über- oder Unterschätzung der Promotoraktivierung. (2) Eine mögliche posttranskriptionale Regulation, beispielsweise der Lmcd1-mRNA-Spiegel in Folge einer Stimulation mit PE wird nicht detektiert, da diese zumeist transkriptspezifisch abläuft [465] und eventuelle Regulationsmechanismen dieser Art daher keinen Einfluss auf die Firefly-mRNA- und somit Firefly-Proteinmenge haben. Die in dieser Arbeit gezeigte Aktivierung des Lmcd1-Promotors durch PE, liegt somit zwar vermutlich deutlich über der von Frank et al. beobachteten Steigerung der Lmcd1-Expression, da diese aber entsprechend den genannten Überlegungen näher an der biologischen Realität (Tatsächliche Messung der Lmcd1-mRNA, Genexpression von Lmcd1 innerhalb des regulären genomischen Kontextes) liegt, ist wahrscheinlich, dass die Wirkung von PE auf die Genexpression von Lmcd1 nicht allein über den Promotor vermittelt wird, zumindest nicht direkt.

5.4.3.1 Kein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die PE-induzierte Promotoraktivierung von Lmcd1

Wie oben erwähnt lag es nahe, für die beobachtete Aktivierung des Lmcd1-Promotors durch Stimulation mit 5µM PE eine Funktion der beiden konservierten MEF2-Bindestellen anzunehmen. Tatsächlich führte die Stimulation von NRVCN mit Phenylephrin wie oben berichtet zwar zu einer Aktivierung des Lmcd1-Promotors, diese zeigte aber erstaunlicherweise keinerlei Abhängigkeit von den beiden MEF2-Bindestellen, mit entsprechend unveränderter Promotoraktivierung nach Mutation der Bindestellen (siehe 4.4.1).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte beachtet werden, dass die in Abschnitt 5.1 aufgeführten Einschränkungen umso schwerer wiegen, da MEF2 seine Wirkung hauptsächlich über die Modifikation von Histonen entfaltet (vergleiche 1.2.2.2), und somit in besonderem Ausmaß von diesen Einschränkungen betroffen ist. Andererseits zeigt MEF2 an Promotoren,

die nachweislich durch MEF2 reguliert werden, durchaus eine Aktivierung wenn diese in ein Reporterplasmid kloniert werden [326]. Zusammenfassend ist also ein Beitrag der MEF2-Bindestellen zur PE-vermittelten Promotoraktivierung von *Lmcd1* nicht auszuschließen, ein signifikanter Anteil wird aber mit großer Wahrscheinlichkeit über andere Faktoren vermittelt.

Bei der Suche nach diesen Faktoren sollte auch CREB in Betracht gezogen werden: über den oben geschilderten Ablauf, der PE-abhängig zu einer Aktivierung von p38 und CaMKII führt, kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung von CREB [318,319,466]. Zwar zeigte sich die PE-abhängige Aktivierung des *Lmcd1*-Promotors im 208bp-Promotor (der die identifizierte CREB-Bindestelle bereits enthält) nur in der Tendenz (siehe 4.4), allerdings ist nicht auszuschließen, dass für die induzierbare Aktivierung durch CREB noch weiter stromaufwärts gelegene und bislang nicht identifizierte Bindestellen im *Lmcd1*-Promotor notwendig sind, so dass die weitere Untersuchung der CREB-Bindestelle einen möglichen Ansatz bei der Suche nach den PE-vermittelnden Mechanismen des *Lmcd1*-Promotors darstellt. Dem steht allerdings die berichtete Notwendigkeit einer funktionalen TATA-Box für eine über die konstitutive Promotoraktivierung durch CREB hinausgehende Stimulierung der Transkription entgegen [307], eine Voraussetzung die nach den in Abschnitt 5.2 angestellten Überlegungen als vermutlich nicht gegeben zu betrachten ist.

5.4.4 Kein Einfluss der MEF2-Bindestellen auf die Stretch-induzierte Aktivierung des *Lmcd1*-Promotors

Seit langem ist bekannt, dass die biomechanische Belastung des Herzens zu einer kardialen Hypertrophie führt. Im Modell lässt sich dies sowohl in vivo, beispielsweise durch artifizielle Verengung der Aorta mittels „Aortic Banding“ mit konsekutiver Erhöhung der Nachlast [467] als auch in vitro durch Dehnung von kultivierten neonatalen ventrikulären Rattenherzmuskelzellen [421,468] simulieren und beobachten. An der Ausbildung dieser Hypertrophie sind eine Vielzahl von Signalwegen beteiligt [469]: unter anderem kommt es zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK-1/2 [470] sowie des Calcineurin-Signalweges und der CaMKII [471]. Da es sich bei p38, Calcineurin und der CaMKII jeweils um Proteine handelt, die einen aktivierenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor MEF2 entfalten (vergleiche 1.2.2.2), lag es nahe eine Funktion der beiden identifizierten MEF2-Bindestellen auf die Stretch-induzierte Aktivierung des *Lmcd1*-Promotors zu vermuten.

In dieser Arbeit konnte zunächst eine Aktivierung des 1655bp-Promotors um den Faktor 2 durch 24h dynamischen Stretch beobachtet (siehe 4.5) und damit prinzipiell gezeigt werden, dass die bekannte Stretch-abhängige Überexpression von *Lmcd1* (siehe 1.3) zumindest teilweise über

eine gesteigerte Transkriptionsrate sowie Elemente im proximalen Promotor von Lmcd1 vermittelt wird. Frank et al. konnten nach 24h Stretch allerdings eine Steigerung der Lmcd1-mRNA-Level um den Faktor 6 zeigen [421]. Diese scheinbar deutliche Diskrepanz muss allerdings unter Beachtung der folgenden Überlegungen interpretiert werden: (1) Es gilt auch hier, dass ein Vergleich der Protein- mit der mRNA-Menge nur unter Vorbehalt durchgeführt werden sollte (siehe 5.4.3). (2) Entsprechend der bereits in Abschnitt 5.1.1.3 gemachten Einschränkung ist denkbar, dass zur vollständigen Vermittlung der Stretch-induzierten Transkriptionssteigerung von Lmcd1 weiter entfernt gelegene Enhancer notwendig sind, deren Funktion in dieser Arbeit nicht erfasst wurde. (3) Ein Teil der Stretch-induzierten Überexpression wird möglicherweise posttranskriptional, also beispielsweise über eine verlangsamte Degradierung der Lmcd1-mRNA vermittelt. Da die posttranskriptionale Regulation der Genexpression zumeist transkriptspezifisch erfolgt [465], sind solche Einflüsse mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht detektierbar.

Wie bereits erwähnt ließ sich in den nachfolgenden Experimenten mit mutierten MEF2-Bindestellen keine zuverlässige Aktivierung des Wildtyp-Promotors durch 24h Stretch replizieren (siehe 4.5.1). In daraufhin durchgeführten Versuchen mit einer Stretchdauer von 48h zeigte sich zwar eine stärkere Aktivierung als nach 24h, die allerdings mit einer Steigerung um den Faktor 1,5 ebenfalls hinter den erwarteten Werten zurückblieb und nicht signifikant war. Als mögliche Erklärung kommen vor allem methodeninherente Probleme in Frage. So lässt sich ein im Vergleich zu herkömmlichen Kulturplatten relativ variables Anwachsen vitaler Zellen auf den speziellen Stretch-Platten beobachten, was trotz des Aussähens gleicher Zellzahlen zu unterschiedlichen Startbedingungen zu Beginn verschiedener Stretchexperimente führt. Zusätzlich verschärft wurde dieses Problem durch den beobachtbaren zellschädigenden Effekt sowohl von Lipofectamine 3000 (siehe 3.4.11.2) als auch durch den Stretch an sich in Abhängigkeit von der unmittelbar vor Stretchbeginn vorliegenden Zelldichte und -vitalität, der zu einem zusätzlich variablen Untergang von NRVCN während des Stretchs führte.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen hat sich in dieser Arbeit keinerlei Veränderung der Stretch-induzierten Aktivität des 1655bp-Lmcd1-Promotors durch kombinierte Mutation der beiden MEF2-Bindestellen gezeigt (siehe 4.5.1). Zwar sollte dieses Erkenntnis mit einiger Vorsicht betrachtet und gegebenenfalls durch weitere Versuche kontrolliert werden, dennoch steht diese im Einklang mit den hier berichteten Ergebnissen zur Stimulation von NRVCN mit PE: auch in diesen zeigte sich keine Veränderung der PE-abhängigen Promotoraktivierung nach Mutation der MEF2-Bindestellen. Da sich die durch

Phenylephrin bzw. Stretch aktivierten Signalwege überschneiden, und beide zu einer Aktivierung von p38, Calcineurin sowie der CaMKII führen, die allesamt zur Aktivierung von MEF2 beitragen, stützt diese Erkenntnis die berichteten Ergebnisse nach denen die MEF2-Bindestellen nicht an der Stretch-abhängigen Promotoraktivierung von Lmcd1 beteiligt sind.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten die Regulationsmechanismen der Genexpression von LIM and cysteine-rich domains 1 (Lmcd1) auf Ebene des Promotors untersucht werden. Bei Lmcd1 handelt es sich um ein Protein, welches vor allem in kardialer und quergestreifter Muskulatur exprimiert wird, im Herzen vor allem an der Z-Scheibe lokalisiert ist und vor allem Protein-Protein-Interaktionen eingeht. In vorangegangenen Untersuchungen konnte nicht nur eine herausragende Rolle von Lmcd1 im Rahmen der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie als Antwort auf bestimmte Stimuli (z.B. Nachlasterhöhung oder hormonelle Stimuli) herausgearbeitet werden, es hatte sich in diesen Arbeiten zusätzlich gezeigt, dass Lmcd1 im Mausmodell sowohl notwendig als auch ausreichend für einen hypertrophen Umbau des Herzens war: eine Überexpression von Lmcd1 führt ohne weitere Intervention zu einer kardialen Hypertrophie während es in Knockdown-Experimenten von Lmcd1 auch unter Stimulation mit sonst hypertroph wirkenden Einflüssen nicht zu einer hypertrophen Antwort kam.

Obgleich in den Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass es im Rahmen der kardialen Hypertrophie zu einer Expressionszunahme von Lmcd1 kommt, also der Einfluss von Lmcd1 auf die Herzhypertrophie vermutlich auch über die Expressionsrate von Lmcd1 selbst reguliert wird, hatten sich bis dato vorliegende Arbeiten vor allem mit dem Einfluss von Lmcd1 auf Proteinebene beschäftigt. In dieser Arbeit sollten daher die Mechanismen näher beleuchtet werden, die über eine Regulation der Genexpression von Lmcd1 zu einer Modulation der hypertrophen kardialen Antwort beitragen könnten. Zu diesem Zweck ist der Promotor von Lmcd1 mit Hilfe computergestützter und molekularbiologischer Techniken untersucht worden, insbesondere mit dem Ziel funktionell relevante Transkriptionsfaktorbindestellen zu eruieren. Hierdurch konnten auf DNA-Ebene Bindemotive für Sp1, NF-Y und CREB identifiziert werden, deren kombinierte Mutation zu einem vollständigen Verlust der basalen Aktivität des Lmcd1-Promotors führte (zu beachten ist, dass der direkte Nachweis einer tatsächlichen Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an diese Motive nicht Bestandteil dieser Arbeit war). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass im Lmcd1-Promotor zwei hochkonservierte Bindestellen für MEF2 vorliegen, die eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität durch ein

Fusionsprotein aus MEF2 und VP16 vermitteln, also eine expressionssteigernde Wirkung auch durch Wildtyp-MEF2 nahelegen, eine Hypothese, die in dieser Arbeit allerdings nicht getestet wurde.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die aus Vorarbeiten berichtete Steigerung der Lmcd1-Expression in neonatalen Rattenherzmuskelzellen durch Phenylephrin und dynamischen Stretch vermutlich nicht durch diese MEF2-Bindestellen vermittelt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Roeder RG, Rutter WJ. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*. 18. Oktober 1969;224(5216):234–7.
2. Goodfellow SJ, Zomerdijs JCBM. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem*. 2013;61:211–36.
3. Haag JR, Pikaard CS. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. August 2011;12(8):483–92.
4. Falkenberg M, Larsson N-G, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:679–99.
5. Roeder RG, Rutter WJ. Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. März 1970;65(3):675–82.
6. Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG, Rutter WJ. Specific Inhibition of Nuclear RNA Polymerase II by α -Amanitin. *Science*. 23. Oktober 1970;170(3956):447–9.
7. Young RA. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:689–715.
8. Kolodziej PA, Woychik N, Liao SM, Young RA. RNA polymerase II subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation. *Mol Cell Biol*. Mai 1990;10(5):1915–20.
9. Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(3):129–43.
10. Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. *Science*. 8. Juni 2001;292(5523):1863–76.
11. Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier-Davis B, Thompson NE, u. a. Architecture of RNA Polymerase II and Implications for the Transcription Mechanism. *Science*. 28. April 2000;288(5466):640–9.
12. Fu J, Gnatt AL, Bushnell DA, Jensen GJ, Thompson NE, Burgess RR, u. a. Yeast RNA Polymerase II at 5 Å Resolution. *Cell*. 17. September 1999;98(6):799–810.
13. Armache K-J, Kettenberger H, Cramer P. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. Juni 2003;100(12):6964–8.

14. Bushnell DA, Kornberg RD. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: Implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. Juni 2003;100(12):6969–73.
15. Chen H-T, Hahn S. Mapping the Location of TFIIB within the RNA Polymerase II Transcription Preinitiation Complex: A Model for the Structure of the PIC. *Cell*. Oktober 2004;119(2):169–80.
16. Cramer P. RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev*. April 2004;14(2):218–26.
17. Wang D, Bushnell DA, Westover KD, Kaplan CD, Kornberg RD. Structural Basis of Transcription: Role of the Trigger Loop in Substrate Specificity and Catalysis. *Cell*. Dezember 2006;127(5):941–54.
18. Kaplan CD, Larsson K-M, Kornberg RD. The RNA Polymerase II Trigger Loop Functions in Substrate Selection and is Directly Targeted by α -amanitin. *Mol Cell*. 6. Juni 2008;30(5):547–56.
19. Nesser NK, Peterson DO, Hawley DK. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28. Februar 2006;103(9):3268–73.
20. Izban MG, Luse DS. The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII. *Genes Dev*. 1. Juli 1992;6(7):1342–56.
21. Kettenberger H, Armache K-J, Cramer P. Architecture of the RNA Polymerase II-TFIIS Complex and Implications for mRNA Cleavage. *Cell*. 8. August 2003;114(3):347–57.
22. Hu X, Malik S, Negroiu CC, Hubbard K, Velalar CN, Hampton B, u. a. A Mediator-responsive form of metazoan RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20. Juni 2006;103(25):9506–11.
23. Jishage M, Malik S, Wagner U, Überheide B, Ishihama Y, Hu X, u. a. Transcriptional regulation by Pol II(G) involving Mediator and competitive interactions of Gdown1 and TFIIF with Pol II. *Mol Cell*. 13. Januar 2012;45(1):51–63.
24. Corden JL. The RNA Polymerase II C-terminal Domain: Tethering Transcription to Transcript and Template. *Chem Rev*. 13. November 2013;113(11):8423–55.
25. Harlen KM, Churchman LS. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol*. April 2017;18(4):263–73.
26. Jeronimo C, Collin P, Robert F. The RNA Polymerase II CTD: The Increasing Complexity of a Low-Complexity Protein Domain. *J Mol Biol*. 19. Juni 2016;428(12):2607–22.
27. Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM, Dahmus ME. A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dezember 1985;82(23):7934–8.
28. Zehring WA, Lee JM, Weeks JR, Jokerst RS, Greenleaf AL. The C-terminal repeat

- domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juni 1988;85(11):3698–702.
29. Zhang J, Corden JL. Identification of phosphorylation sites in the repetitive carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem*. 5. Februar 1991;266(4):2290–6.
 30. Lee JM, Greenleaf AL. A protein kinase that phosphorylates the C-terminal repeat domain of the largest subunit of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mai 1989;86(10):3624–8.
 31. Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. 5. Mai 1992;267(13):9005–13.
 32. Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem*. 15. Mai 1993;268(14):10416–24.
 33. Sims RJ, Rojas LA, Beck DB, Bonasio R, Schüller R, Drury WJ, u. a. The C-Terminal Domain of RNA Polymerase II Is Modified by Site-Specific Methylation. *Science*. 1. April 2011;332(6025):99–103.
 34. Lu H, Flores O, Weinmann R, Reinberg D. The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. November 1991;88(22):10004–8.
 35. Svejstrup JQ, Li Y, Fellows J, Gnatt A, Bjorklund S, Kornberg RD. Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. Juni 1997;94(12):6075–8.
 36. Usheva A, Maldonado E, Goldring A, Lu H, Houbavi C, Reinberg D, u. a. Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell*. 29. Mai 1992;69(5):871–81.
 37. Wong KH, Jin Y, Struhl K. TFIIF phosphorylation of the Pol II CTD stimulates Mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Mol Cell*. 22. Mai 2014;54(4):601–12.
 38. Max T, Søgaard M, Svejstrup JQ. Hyperphosphorylation of the C-terminal Repeat Domain of RNA Polymerase II Facilitates Dissociation of Its Complex with Mediator. *J Biol Chem*. 11. Mai 2007;282(19):14113–20.
 39. DeJong J, Roeder RG. A single cDNA, hTFIIA/alpha, encodes both the p35 and p19 subunits of human TFIIA. *Genes Dev*. November 1993;7(11):2220–34.
 40. Ranish JA, Hahn S. The yeast general transcription factor TFIIA is composed of two polypeptide subunits. *J Biol Chem*. 15. Oktober 1991;266(29):19320–7.
 41. Høiby T, Zhou H, Mitsiou DJ, Stunnenberg HG. A facelift for the general transcription

- factor TFIIA. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr.* Juli 2007;1769(7–8):429–36.
42. Buratowski S, Hahn S, Guarente L, Sharp PA. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell.* 24. Februar 1989;56(4):549–61.
 43. Cortes P, Flores O, Reinberg D. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IIJ. *Mol Cell Biol.* Januar 1992;12(1):413–21.
 44. Imbalzano AN, Zaret KS, Kingston RE. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem.* 18. März 1994;269(11):8280–6.
 45. Geiger JH, Hahn S, Lee S, Sigler PB. Crystal Structure of the Yeast TFIIA/TBP/DNA Complex. *Science.* 10. Mai 1996;272(5263):830–6.
 46. Tan S, Hunziker Y, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature.* Mai 1996;381(6578):127–34.
 47. Sawadogo M, Roeder RG. Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative in vitro assay. *Proc Natl Acad Sci.* 1. Juli 1985;82(13):4394–8.
 48. Ranish JA, Lane WS, Hahn S. Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. *Science.* 28. Februar 1992;255(5048):1127–9.
 49. Matsui T, Segall J, Weil PA, Roeder RG. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 25. Dezember 1980;255(24):11992–6.
 50. Chou S, Chatterjee S, Lee M, Struhl K. Transcriptional activation in yeast cells lacking transcription factor IIA. *Genetics.* Dezember 1999;153(4):1573–81.
 51. Ozer J, Bolden AH, Lieberman PM. Transcription Factor IIA Mutations Show Activator-specific Defects and Reveal a IIA Function Distinct from Stimulation of TBP-DNA Binding. *J Biol Chem.* 10. Mai 1996;271(19):11182–90.
 52. Yokomori K, Zeidler MP, Chen JL, Verrijzer CP, Mlodzik M, Tjian R. Drosophila TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev.* 1. Oktober 1994;8(19):2313–23.
 53. Auble DT, Hansen KE, Mueller CG, Lane WS, Thorner J, Hahn S. Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev.* 15. August 1994;8(16):1920–34.
 54. Kotani T, Miyake T, Tsukihashi Y, Hinnebusch AG, Nakatani Y, Kawaichi M, u. a. Identification of Highly Conserved Amino-terminal Segments of dTAFII230 and yTAFII145 That Are Functionally Interchangeable for Inhibiting TBP-DNA Interactions in Vitro and in Promoting Yeast Cell Growth in Vivo. *J Biol Chem.* 27. November 1998;273(48):32254–64.
 55. Deng W, Roberts SGE. TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II.

Chromosoma. 1. Oktober 2007;116(5):417–29.

56. Reinberg D, Roeder RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and functional analysis of initiation factors IIB and IIE. *J Biol Chem.* 5. März 1987;262(7):3310–21.
57. Buratowski S, Zhou H. Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. Juni 1993;90(12):5633–7.
58. Zhu W, Zeng Q, Colangelo CM, Lewis LM, Summers MF, Scott RA. The N-terminal domain of TFIIB from *Pyrococcus furiosus* forms a zinc ribbon. *Nat Struct Mol Biol.* Februar 1996;3(2):122–4.
59. Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Usheva AA, Hisatake K, Lee DK, u. a. Crystal structure of a TFIIB–TBP–TATA-element ternary complex. *Nature.* 14. September 1995;377(6545):119–28.
60. Goodrich JA, Hoey T, Thut CJ, Admon A, Tjian R. *Drosophila* TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell.* 5. November 1993;75(3):519–30.
61. Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebright RH. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 1. Januar 1998;12(1):34–44.
62. Deng W, Roberts SGE. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev.* 15. Oktober 2005;19(20):2418–23.
63. Littlefield O, Korkhin Y, Sigler PB. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci.* 23. November 1999;96(24):13668–73.
64. Bushnell DA, Westover KD, Davis RE, Kornberg RD. Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II-TFIIB Cocystal at 4.5 Angstroms. *Science.* 13. Februar 2004;303(5660):983–8.
65. Fang SM, Burton ZF. RNA Polymerase II-associated Protein (RAP) 74 Binds Transcription Factor (TF) IIB and Blocks TFIIB-RAP30 Binding. *J Biol Chem.* 17. Mai 1996;271(20):11703–9.
66. Kostrewa D, Zeller ME, Armache K-J, Seizl M, Leike K, Thomm M, u. a. RNA polymerase II–TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature.* 19. November 2009;462(7271):323–30.
67. Liu X, Bushnell DA, Wang D, Calero G, Kornberg RD. Structure of an RNA Polymerase II–TFIIB Complex and the Transcription Initiation Mechanism. *Science.* 8. Januar 2010;327(5962):206.
68. Sainsbury S, Niesser J, Cramer P. Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex. *Nature.* 17. Januar 2013;493(7432):437–40.
69. Lin YS, Green MR. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell.* 8. März 1991;64(5):971–81.

70. Kwok RPS, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, u. a. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*. 21. Juli 1994;370(6486):223–6.
71. Lin Y-S, Ha I, Maldonado E, Reinberg D, Green MR. Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature*. Oktober 1991;353(6344):569–71.
72. Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*. 9. August 1991;66(3):563–76.
73. Kokubo T, Takada R, Yamashita S, Gong DW, Roeder RG, Horikoshi M, u. a. Identification of TFIID components required for transcriptional activation by upstream stimulatory factor. *J Biol Chem*. 15. August 1993;268(23):17554–8.
74. Cler E, Papai G, Schultz P, Davidson I. Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell Mol Life Sci*. 1. Juli 2009;66(13):2123–34.
75. Andel F, Ladurner AG, Inouye C, Tjian R, Nogales E. Three-Dimensional Structure of the Human TFIID-IIA-IIB Complex. *Science*. 10. Dezember 1999;286(5447):2153–6.
76. Brand M, Leurent C, Mallouh V, Tora L, Schultz P. Three-Dimensional Structures of the TAFII-Containing Complexes TFIID and TFIIIC. *Science*. 10. Dezember 1999;286(5447):2151–3.
77. Sawadogo M, Roeder RG. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell*. November 1985;43(1):165–75.
78. Nakajima N, Horikoshi M, Roeder RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol*. Oktober 1988;8(10):4028–40.
79. Chalkley GE, Verrijzer CP. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J*. 1. September 1999;18(17):4835–45.
80. Burke TW, Kadonaga JT. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev*. 15. November 1997;11(22):3020–31.
81. Theisen JWM, Lim CY, Kadonaga JT. Three Key Subregions Contribute to the Function of the Downstream RNA Polymerase II Core Promoter. *Mol Cell Biol*. Juli 2010;30(14):3471–9.
82. Lee D-H, Gershenzon N, Gupta M, Ioshikhes IP, Reinberg D, Lewis BA. Functional Characterization of Core Promoter Elements: the Downstream Core Element Is Recognized by TAF1. *Mol Cell Biol*. November 2005;25(21):9674–86.
83. Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R. Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module. *Science*. 26. Mai 2000;288(5470):1422–5.

84. Mizzen CA, Yang X-J, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, u. a. The TAFII250 Subunit of TFIID Has Histone Acetyltransferase Activity. *Cell*. Dezember 1996;87(7):1261–70.
85. Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, Pijnappel WWMP, van Schaik FMA, Varier RA, u. a. Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4. *Cell*. Oktober 2007;131(1):58–69.
86. Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4. Januar 1994;91(1):192–6.
87. Ferreri K, Gill G, Montminy M. The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. Februar 1994;91(4):1210–3.
88. Asahara H, Santoso B, Guzman E, Du K, Cole PA, Davidson I, u. a. Chromatin-Dependent Cooperativity between Constitutive and Inducible Activation Domains in CREB. *Mol Cell Biol*. Dezember 2001;21(23):7892–900.
89. Garbett KA, Tripathi MK, Cencki B, Layer JH, Weil PA. Yeast TFIID Serves as a Coactivator for Rap1p by Direct Protein-Protein Interaction. *Mol Cell Biol*. Januar 2007;27(1):297–311.
90. Papai G, Weil PA, Schultz P. New insights into the function of transcription factor TFIID from recent structural studies. *Curr Opin Genet Dev*. April 2011;21(2):219–24.
91. Huisinga KL, Pugh BF. A Genome-Wide Housekeeping Role for TFIID and a Highly Regulated Stress-Related Role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*. 27. Februar 2004;13(4):573–85.
92. Grant PA, Schieltz D, Pray-Grant MG, Steger DJ, Reese JC, Yates III JR, u. a. A Subset of TAFIIs Are Integral Components of the SAGA Complex Required for Nucleosome Acetylation and Transcriptional Stimulation. *Cell*. 10. Juli 1998;94(1):45–53.
93. Bhaumik SR, Green MR. Differential Requirement of SAGA Components for Recruitment of TATA-Box-Binding Protein to Promoters In Vivo. *Mol Cell Biol*. November 2002;22(21):7365–71.
94. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, u. a. Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell*. März 1996;84(6):843–51.
95. Ohkuma Y, Sumimoto H, Horikoshi M, Roeder RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and characterization of general transcription factor TFIIE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dezember 1990;87(23):9163–7.
96. Miwa K, Kojima R, Obita T, Ohkuma Y, Tamura Y, Mizuguchi M. Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIE at Atomic Resolution. *J Mol Biol*. Oktober 2016;428(21):4258–66.

97. Chen H-T, Warfield L, Hahn S. The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol.* August 2007;14(8):696–703.
98. Grünberg S, Warfield L, Hahn S. Architecture of the RNA polymerase II preinitiation complex and mechanism of ATP-dependent promoter opening. *Nat Struct Mol Biol.* August 2012;19(8):788–96.
99. Ohkuma Y, Hashimoto S, Wang CK, Horikoshi M, Roeder RG. Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- α . *Mol Cell Biol.* September 1995;15(9):4856–66.
100. Maxon ME, Goodrich JA, Tjian R. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase II α and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev.* 1. März 1994;8(5):515–24.
101. Lin YC, Gralla JD. Stimulation of the XPB ATP-dependent helicase by the β subunit of TFIIE. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(9):3072–81.
102. Parvin JD, Sharp PA. DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell.* 7. Mai 1993;73(3):533–40.
103. Holstege FC, van der Vliet PC, Timmers HT. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* 1. April 1996;15(7):1666–77.
104. Burton ZF, Killeen M, Sopta M, Ortolan LG, Greenblatt J. RAP30/74: a general initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* April 1988;8(4):1602–13.
105. Sopta M, Carthew RW, Greenblatt J. Isolation of three proteins that bind to mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 25. August 1985;260(18):10353–60.
106. Rani PG, Ranish JA, Hahn S. RNA Polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-Mediator Complexes: the Major Stable Pol II Complexes and Their Activity in Transcription Initiation and Reinitiation. *Mol Cell Biol.* Februar 2004;24(4):1709–20.
107. Flores O, Lu H, Killeen M, Greenblatt J, Burton ZF, Reinberg D. The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. November 1991;88(22):9999–10003.
108. Chen ZA, Jawhari A, Fischer L, Buchen C, Tahir S, Kamenski T, u. a. Architecture of the RNA polymerase II–TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *EMBO J.* 17. Februar 2010;29(4):717–26.
109. Eichner J, Chen H-T, Warfield L, Hahn S. Position of the general transcription factor TFIIF within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *EMBO J.* 17. Februar 2010;29(4):706–16.
110. Ghazy MA, Brodie SA, Ammerman ML, Ziegler LM, Ponticelli AS. Amino Acid Substitutions in Yeast TFIIF Confer Upstream Shifts in Transcription Initiation and Altered Interaction with RNA Polymerase II. *Mol Cell Biol.* Dezember

2004;24(24):10975–85.

111. He Y, Fang J, Taatjes DJ, Nogales E. Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature*. 28. März 2013;495(7442):481–6.
112. Čabart P, Újvári A, Pal M, Luse DS. Transcription factor TFIIF is not required for initiation by RNA polymerase II, but it is essential to stabilize transcription factor TFIIB in early elongation complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20. September 2011;108(38):15786–91.
113. Chang C, Kostrub CF, Burton ZF. RAP30/74 (transcription factor IIF) is required for promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 25. September 1993;268(27):20482–9.
114. Yan Q, Moreland RJ, Conaway JW, Conaway RC. Dual Roles for Transcription Factor IIF in Promoter Escape by RNA Polymerase II. *J Biol Chem*. 10. Dezember 1999;274(50):35668–75.
115. Ren D, Lei L, Burton ZF. A Region within the RAP74 Subunit of Human Transcription Factor IIF Is Critical for Initiation but Dispensable for Complex Assembly. *Mol Cell Biol*. November 1999;19(11):7377–87.
116. Funk JD, Nedialkov YA, Xu D, Burton ZF. A Key Role for the $\alpha 1$ Helix of Human RAP74 in the Initiation and Elongation of RNA Chains. *J Biol Chem*. 6. Dezember 2002;277(49):46998–7003.
117. Schweikhard V, Meng C, Murakami K, Kaplan CD, Kornberg RD, Block SM. Transcription factors TFIIF and TFIIS promote transcript elongation by RNA polymerase II by synergistic and independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci*. 6. Mai 2014;111(18):6642–7.
118. Luse DS. Rethinking the role of TFIIF in transcript initiation by RNA polymerase II. *Transcription*. 1. Juli 2012;3(4):156–9.
119. Rossignol M, Keriel A, Staub A, Egly J-M. Kinase Activity and Phosphorylation of the Largest Subunit of TFIIF Transcription Factor. *J Biol Chem*. 6. August 1999;274(32):22387–92.
120. Kitajima S, Chibazakura T, Yonaha M, Yasukochi Y. Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation. *J Biol Chem*. 25. November 1994;269(47):29970–7.
121. Újvári A, Pal M, Luse DS. The Functions of TFIIF during Initiation and Transcript Elongation Are Differentially Affected by Phosphorylation by Casein Kinase 2. *J Biol Chem*. 1. Juli 2011;286(26):23160–7.
122. Gibbons BJ, Brignole EJ, Azubel M, Murakami K, Voss NR, Bushnell DA, u. a. Subunit architecture of general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. Februar 2012;109(6):1949–54.
123. Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L, Prakash S. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature*. Oktober

- 1993;365(6449):852–5.
124. Guzder SN, Sung P, Bailly V, Prakash L, Prakash S. RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Nature*. 16. Juni 1994;369(6481):578–81.
 125. Feaver WJ, Gileadi O, Li Y, Kornberg RD. CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell*. 20. Dezember 1991;67(6):1223–30.
 126. Roy R, Adamczewski JP, Seroz T, Vermeulen W, Tassan JP, Schaeffer L, u. a. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell*. 16. Dezember 1994;79(6):1093–101.
 127. Compe E, Egly J-M. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Juni 2012;13(6):343–54.
 128. Tirode F, Busso D, Coin F, Egly JM. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell*. Januar 1999;3(1):87–95.
 129. Kim T-K, Ebright RH, Reinberg D. Mechanism of ATP-Dependent Promoter Melting by Transcription Factor IIH. *Science*. 26. Mai 2000;288(5470):1418–21.
 130. Lu H, Zawel L, Fisher L, Egly J-M, Reinberg D. Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature*. 20. August 1992;358(6388):641–5.
 131. Hengartner CJ, Myer VE, Liao S-M, Wilson CJ, Koh SS, Young RA. Temporal Regulation of RNA Polymerase II by Srb10 and Kin28 Cyclin-Dependent Kinases. *Mol Cell*. Juli 1998;2(1):43–53.
 132. Mäkelä TP, Parvin JD, Kim J, Huber LJ, Sharp PA, Weinberg RA. A kinase-deficient transcription factor TFIIH is functional in basal and activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23. Mai 1995;92(11):5174–8.
 133. Serizawa H, Conaway JW, Conaway RC. Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature*. Mai 1993;363(6427):371–4.
 134. Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dezember 2008;9(12):958–70.
 135. Kim YJ, Björklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*. 20. Mai 1994;77(4):599–608.
 136. Kornberg RD. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*. Mai 2005;30(5):235–9.
 137. Allen BL, Taatjes DJ. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2015;16(3):155–66.
 138. Wang X, Sun Q, Ding Z, Ji J, Wang J, Kong X, u. a. Redefining the modular

- organization of the core Mediator complex. *Cell Res.* Juli 2014;24(7):796–808.
139. Asturias FJ, Jiang YW, Myers LC, Gustafsson CM, Kornberg RD. Conserved Structures of Mediator and RNA Polymerase II Holoenzyme. *Science.* 12. Februar 1999;283(5404):985–7.
 140. Tsai K-L, Tomomori-Sato C, Sato S, Conaway RC, Conaway JW, Asturias FJ. Subunit Architecture and Functional Modular Rearrangements of the Transcriptional Mediator Complex. *Cell.* 5. Juni 2014;157(6):1430–44.
 141. Liao S-M, Zhang J, Jeffery DA, Koleske AJ, Thompson CM, Chao DM, u. a. A kinase–cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature.* März 1995;374(6518):193–6.
 142. Tsai K-L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway RC, Conaway JW, Asturias FJ. A conserved Mediator–CDK8 kinase module association regulates Mediator–RNA polymerase II interaction. *Nat Struct Mol Biol.* Mai 2013;20(5):611–9.
 143. Flanagan PM, Kelleher RJ, Sayre MH, Tschochner H, Kornberg RD. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature.* 4. April 1991;350(6317):436–8.
 144. Robinson PJ, Trnka MJ, Bushnell DA, Davis RE, Mattei P-J, Burlingame AL, u. a. Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell.* 8. September 2016;166(6):1411–1422.e16.
 145. Esnault C, Ghavi-Helm Y, Brun S, Soutourina J, Van Berkum N, Boschiero C, u. a. Mediator-Dependent Recruitment of TFIIF Modules in Preinitiation Complex. *Mol Cell.* 8. August 2008;31(3):337–46.
 146. Larivière L, Geiger S, Hoepfner S, Röther S, Sträßer K, Cramer P. Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8–Med18–Med20. *Nat Struct Mol Biol.* Oktober 2006;13(10):895–901.
 147. Petrenko N, Jin Y, Wong KH, Struhl K. Mediator Undergoes a Compositional Change during Transcriptional Activation. *Mol Cell.* 3. November 2016;64(3):443–54.
 148. Lee YC, Park JM, Min S, Han SJ, Kim Y-J. An Activator Binding Module of Yeast RNA Polymerase II Holoenzyme. *Mol Cell Biol.* April 1999;19(4):2967–76.
 149. Ansari SA, Morse RH. Mechanisms of Mediator complex action in transcriptional activation. *Cell Mol Life Sci.* 1. August 2013;70(15):2743–56.
 150. Elmlund H, Baraznenok V, Lindahl M, Samuelsen CO, Koeck PJB, Holmberg S, u. a. The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci.* 24. Oktober 2006;103(43):15788–93.
 151. Ptashne M, Gann A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature.* 1997;386(6625):569–77.
 152. Gonzalez D, Hamidi N, Sol RD, Benschop JJ, Nancy T, Li C, u. a. Suppression of Mediator is regulated by Cdk8-dependent Grr1 turnover of the Med3 coactivator. *Proc Natl Acad Sci.* 18. Februar 2014;111(7):2500–5.

153. Belakavadi M, Fondell JD. Cyclin-Dependent Kinase 8 Positively Cooperates with Mediator To Promote Thyroid Hormone Receptor-Dependent Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol.* 15. Mai 2010;30(10):2437–48.
154. Guidi BW, Bjornsdottir G, Hopkins DC, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, u. a. Mutual Targeting of Mediator and the TFIIH Kinase Kin28. *J Biol Chem.* 9. Juli 2004;279(28):29114–20.
155. Borggreffe T, Yue X. Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors. *Semin Cell Dev Biol.* September 2011;22(7):759–68.
156. Li H, Gade P, Nallar SC, Raha A, Roy SK, Karra S, u. a. The Med1 Subunit of Transcriptional Mediator Plays a Central Role in Regulating CCAAT/Enhancer-binding Protein- β -driven Transcription in Response to Interferon- γ . *J Biol Chem.* 9. Mai 2008;283(19):13077–86.
157. Mittler G, Stühler T, Santolin L, Uhlmann T, Kremmer E, Lottspeich F, u. a. A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *EMBO J.* 15. Dezember 2003;22(24):6494–504.
158. Kremer SB, Kim S, Jeon JO, Moustafa YW, Chen A, Zhao J, u. a. Role of Mediator in Regulating Pol II Elongation and Nucleosome Displacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* Mai 2012;191(1):95–106.
159. Mukundan B, Ansari A. Novel Role for Mediator Complex Subunit Srb5/Med18 in Termination of Transcription♦. *J Biol Chem.* 28. Oktober 2011;286(43):37053–7.
160. Huang Y, Li W, Yao X, Lin Q, Yin J, Liang Y, u. a. Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the Med23 Subunit. *Mol Cell.* 24. Februar 2012;45(4):459–69.
161. Agarwal K, Baek K, Jeon C, Miyamoto K, Ueno A, Yoon H. Stimulation of transcript elongation requires both the zinc finger and RNA polymerase II binding domains of human TFIIS. *Biochemistry (Mosc).* 1. August 1991;30(31):7842–51.
162. Olmsted VK, Awrey DE, Koth C, Shan X, Morin PE, Kazanis S, u. a. Yeast Transcript Elongation Factor (TFIIS), Structure and Function I: NMR STRUCTURAL ANALYSIS OF THE MINIMAL TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE REGION. *J Biol Chem.* 28. August 1998;273(35):22589–94.
163. Cheung ACM, Cramer P. Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. *Nature.* März 2011;471(7337):249–53.
164. Chodosh LA, Fire A, Samuels M, Sharp PA. 5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *J Biol Chem.* 5. Februar 1989;264(4):2250–7.
165. Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, Hirose S, u. a. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* 1. Februar 1998;12(3):343–56.
166. Hirtreiter A, Damsma GE, Cheung ACM, Klose D, Grohmann D, Vojnic E, u. a.

- Spt4/5 stimulates transcription elongation through the RNA polymerase clamp coiled-coil motif. *Nucleic Acids Res.* 1. Juli 2010;38(12):4040–51.
167. Grohmann D, Nagy J, Chakraborty A, Klose D, Fielden D, Ebright RH, u. a. The Initiation Factor TFE and the Elongation Factor Spt4/5 Compete for the RNAP Clamp during Transcription Initiation and Elongation. *Mol Cell.* 22. Juli 2011;43(2):263–74.
 168. Missra A, Gilmour DS. Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proc Natl Acad Sci.* 22. Juni 2010;107(25):11301–6.
 169. Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H. P-TEFb-Mediated Phosphorylation of hSpt5 C-Terminal Repeats Is Critical for Processive Transcription Elongation. *Mol Cell.* 20. Januar 2006;21(2):227–37.
 170. Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, u. a. NELF, a Multisubunit Complex Containing RD, Cooperates with DSIF to Repress RNA Polymerase II Elongation. *Cell.* 2. April 1999;97(1):41–51.
 171. Yamaguchi Y, Inukai N, Narita T, Wada T, Handa H. Evidence that Negative Elongation Factor Represses Transcription Elongation through Binding to a DRB Sensitivity-Inducing Factor/RNA Polymerase II Complex and RNA. *Mol Cell Biol.* 1. Mai 2002;22(9):2918–27.
 172. Ye Q, Hu Y-F, Zhong H, Nye AC, Belmont AS, Li R. BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol.* 10. Dezember 2001;155(6):911–22.
 173. Natarajan M, Lester GMS, Lee C, Missra A, Wasserman GA, Steffen M, u. a. Negative Elongation Factor (NELF) Coordinates RNA Polymerase II Pausing, Premature Termination, and Chromatin Remodeling to Regulate HIV Transcription. *J Biol Chem.* 6. September 2013;288(36):25995–6003.
 174. Marshall NF, Price DH. Purification of P-TEFb, a Transcription Factor Required for the Transition into Productive Elongation. *J Biol Chem.* 26. Mai 1995;270(21):12335–8.
 175. Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.* 1. März 1998;12(5):755–62.
 176. Cho E-J, Kobor MS, Kim M, Greenblatt J, Buratowski S. Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* 15. Dezember 2001;15(24):3319–29.
 177. Czudnochowski N, Böskén CA, Geyer M. Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nat Commun.* 15. Mai 2012;3:842.
 178. Kim JB, Sharp PA. Positive Transcription Elongation Factor b Phosphorylates hSPT5 and RNA Polymerase II Carboxyl-terminal Domain Independently of Cyclin-dependent Kinase-activating Kinase. *J Biol Chem.* 13. April 2001;276(15):12317–23.
 179. Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T, Peterlin BM. Dynamics of Human

Immunodeficiency Virus Transcription: P-TEFb Phosphorylates RD and Dissociates Negative Effectors from the Transactivation Response Element. *Mol Cell Biol.* 15. Januar 2004;24(2):787–95.

180. Jonkers I, Kwak H, Lis JT. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *eLife.* 29. April 2014;3:e02407.
181. Nguyen VT, Kiss T, Michels AA, Bensaude O. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature.* 15. November 2001;414(6861):322–5.
182. Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature.* 15. November 2001;414(6861):317–22.
183. Yik JHN, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ, Zhou Q. Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) Kinase and RNA Polymerase II Transcription by the Coordinated Actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell.* Oktober 2003;12(4):971–82.
184. Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci.* 22. Juli 2003;100(15):8758–63.
185. Donner AJ, Ebmeier CC, Taatjes DJ, Espinosa JM. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat Struct Mol Biol.* Februar 2010;17(2):194–201.
186. Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, u. a. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci.* 1. Mai 2012;109(18):6927–32.
187. Zhou M, Huang K, Jung K-J, Cho W-K, Klase Z, Kashanchi F, u. a. Bromodomain Protein Brd4 Regulates Human Immunodeficiency Virus Transcription through Phosphorylation of CDK9 at Threonine 29. *J Virol.* 15. Januar 2009;83(2):1036–44.
188. Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. NF- κ B Binds P-TEFb to Stimulate Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II. *Mol Cell.* August 2001;8(2):327–37.
189. Kurosu T, Peterlin BM. VP16 and Ubiquitin: Binding of P-TEFb via Its Activation Domain and Ubiquitin Facilitates Elongation of Transcription of Target Genes. *Curr Biol.* 22. Juni 2004;14(12):1112–6.
190. Eberhardy SR, Farnham PJ. Myc Recruits P-TEFb to Mediate the Final Step in the Transcriptional Activation of the cad Promoter. *J Biol Chem.* 18. Oktober 2002;277(42):40156–62.
191. Zhang F, Barboric M, Blackwell TK, Peterlin BM. A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. *Genes Dev.* 15. März 2003;17(6):748–58.

192. Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol.* Mai 2004;11(5):394–403.
193. Butler JEF, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 15. Oktober 2002;16(20):2583–92.
194. Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Taira H, Mizushima-Sugano J, Hata H, u. a. Identification and Characterization of the Potential Promoter Regions of 1031 Kinds of Human Genes. *Genome Res.* Mai 2001;11(5):677–84.
195. Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, Nguyen L, Myers RM. Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res.* 2006;16(1):1–10.
196. Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM, Martinez E. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene.* 1. März 2007;389(1):52–65.
197. Gershenzon NI, Ioshikhes IP. Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics.* 15. April 2005;21(8):1295–300.
198. Jin VX, Singer GA, Agosto-Pérez FJ, Liyanarachchi S, Davuluri RV. Genome-wide analysis of core promoter elements from conserved human and mouse orthologous pairs. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:114.
199. Baumann M, Pontiller J, Ernst W. Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview. *Mol Biotechnol.* 2010;45(3):241–7.
200. Parry TJ, Theisen JWM, Hsu J-Y, Wang Y-L, Corcoran DL, Eustice M, u. a. The TCT motif, a key component of an RNA polymerase II transcription system for the translational machinery. *Genes Dev.* 15. September 2010;24(18):2013–8.
201. Tokusumi Y, Ma Y, Song X, Jacobson RH, Takada S. The New Core Promoter Element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) Directs Activator-, Mediator-, and TATA-Binding Protein-Dependent but TFIID-Independent RNA Polymerase II Transcription from TATA-Less Promoters. *Mol Cell Biol.* 1. März 2007;27(5):1844–58.
202. Kadonaga JT. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012;1(1):40–51.
203. Juven-Gershon T, Hsu J-Y, Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(3):253–9.
204. Goldberg M. PhD Thesis. Stanford University; 1979.
205. Breathnach R, Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:349–83.
206. Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, u. a. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet.* 2006;38(6):626–35.

207. Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol.* 20. April 1990;212(4):563–78.
208. Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedinger C, Chambon P. Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science.* 19. September 1980;209(4463):1406–14.
209. Smale ST, Baltimore D. The „initiator“ as a transcription control element. *Cell.* 7. April 1989;57(1):103–13.
210. Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* Januar 1994;14(1):116–27.
211. Burke TW, Kadonaga JT. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 15. März 1996;10(6):711–24.
212. Kutach AK, Kadonaga JT. The Downstream Promoter Element DPE Appears To Be as Widely Used as the TATA Box in *Drosophila* Core Promoters. *Mol Cell Biol.* Juli 2000;20(13):4754–64.
213. Ohler U, Liao G, Niemann H, Rubin GM. Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* 2002;3(12):research0087.1-87.12.
214. Lim CY, Santoso B, Boulay T, Dong E, Ohler U, Kadonaga JT. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev.* 1. Juli 2004;18(13):1606–17.
215. Lewis BA, Kim T-K, Orkin SH. A downstream element in the human β -globin promoter: Evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci.* 20. Juni 2000;97(13):7172–7.
216. Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 1. November 1996;10(21):2657–83.
217. Fire A, Samuels M, Sharp PA. Interactions between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription. *J Biol Chem.* 25. Februar 1984;259(4):2509–16.
218. Kim Y, Geiger JH, Hahn S, Sigler PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature.* Oktober 1993;365(6446):512–20.
219. Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature.* Oktober 1993;365(6446):520–7.
220. Koleske AJ, Young RA. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature.* März 1994;368(6470):466–9.
221. Ossipow V, Tassan JP, Nigg EA, Schibler U. A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell.* 6. Oktober 1995;83(1):137–46.

222. Holstege FCP, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, u. a. Dissecting the Regulatory Circuitry of a Eukaryotic Genome. *Cell*. 25. November 1998;95(5):717–28.
223. Wang W, Carey M, Gralla JD. Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science*. 24. Januar 1992;255(5043):450–3.
224. Robb NC, Cordes T, Hwang LC, Gryte K, Duchi D, Craggs TD, u. a. The Transcription Bubble of the RNA Polymerase–Promoter Open Complex Exhibits Conformational Heterogeneity and Millisecond-Scale Dynamics: Implications for Transcription Start-Site Selection. *J Mol Biol*. 11. März 2013;425(5):875–85.
225. Saunders A, Core LJ, Lis JT. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. August 2006;7(8):557–67.
226. Dvir A. Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr*. 13. September 2002;1577(2):208–23.
227. Luse DS. Promoter clearance by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta*. Januar 2013;1829(1):63–8.
228. Luse DS, Jacob GA. Abortive initiation by RNA polymerase II in vitro at the adenovirus 2 major late promoter. *J Biol Chem*. 5. November 1987;262(31):14990–7.
229. Luse DS, Kochel T, Kuempel ED, Coppola JA, Cai H. Transcription initiation by RNA polymerase II in vitro. At least two nucleotides must be added to form a stable ternary complex. *J Biol Chem*. 5. Januar 1987;262(1):289–97.
230. Zawel L, Kumar KP, Reinberg D. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*. 15. Juni 1995;9(12):1479–90.
231. Dvir A, Conaway RC, Conaway JW. A role for TFIIH in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19. August 1997;94(17):9006–10.
232. Kettenberger H, Armache K-J, Cramer P. Complete RNA Polymerase II Elongation Complex Structure and Its Interactions with NTP and TFIIIS. *Mol Cell*. Dezember 2004;16(6):955–65.
233. Kireeva ML, Komissarova N, Waugh DS, Kashlev M. The 8-Nucleotide-long RNA:DNA Hybrid Is a Primary Stability Determinant of the RNA Polymerase II Elongation Complex. *J Biol Chem*. 3. März 2000;275(9):6530–6.
234. Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II Elongation Complex at 3.3 Å Resolution. *Science*. 8. Juni 2001;292(5523):1876–82.
235. Bar-Nahum G, Epshtein V, Ruckenstein AE, Rafikov R, Mustaev A, Nudler E. A Ratchet Mechanism of Transcription Elongation and Its Control. *Cell*. 28. Januar 2005;120(2):183–93.
236. Foster JE, Holmes SF, Erie DA. Allosteric Binding of Nucleoside Triphosphates to RNA Polymerase Regulates Transcription Elongation. *Cell*. 27. Juli 2001;106(2):243–52.

237. Steitz TA, Steitz JA. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. Juli 1993;90(14):6498–502.
238. Martinez-Rucobo FW, Cramer P. Structural basis of transcription elongation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. Januar 2013;1829(1):9–19.
239. Brueckner F, Cramer P. Structural basis of transcription inhibition by α -amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nat Struct Mol Biol*. August 2008;15(8):811–8.
240. Jonkers I, Lis JT. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2015;16(3):167–77.
241. Scheidegger A, Nechaev S. RNA Polymerase II Pausing as a Context-Dependent Reader of the Genome. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. Februar 2016;94(1):82–92.
242. Hendrix DA, Hong J-W, Zeitlinger J, Rokhsar DS, Levine MS. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci*. 3. Juni 2008;105(22):7762–7.
243. Li J, Liu Y, Rhee HS, Ghosh SKB, Bai L, Pugh BF, u. a. Kinetic Competition between Elongation Rate and Binding of NELF Controls Promoter-Proximal Pausing. *Mol Cell*. 6. Juni 2013;50(5):711–22.
244. Brown SA, Imbalzano AN, Kingston RE. Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev*. 15. Juni 1996;10(12):1479–90.
245. Jimeno-González S, Ceballos-Chávez M, Reyes JC. A positioned +1 nucleosome enhances promoter-proximal pausing. *Nucleic Acids Res*. 31. März 2015;43(6):3068–78.
246. Henriques T, Gilchrist DA, Nechaev S, Bern M, Muse GW, Burkholder A, u. a. Stable Pausing by RNA Polymerase II Provides an Opportunity to Target and Integrate Regulatory Signals. *Mol Cell*. 21. November 2013;52(4):517–28.
247. Fay A, Misulovin Z, Li J, Schaaf CA, Gause M, Gilmour DS, u. a. Cohesin Selectively Binds and Regulates Genes with Paused RNA Polymerase. *Curr Biol*. Oktober 2011;21(19):1624–34.
248. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, u. a. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. 23. September 2010;467(7314):430–5.
249. Rasmussen EB, Lis JT. Short transcripts of the ternary complex provide insight into RNA polymerase II elongational pausing. *J Mol Biol*. 6. Oktober 1995;252(5):522–35.
250. Brannan K, Kim H, Erickson B, Glover-Cutter K, Kim S, Fong N, u. a. mRNA Decapping Factors and the Exonuclease Xrn2 Function in Widespread Premature Termination of RNA Polymerase II Transcription. *Mol Cell*. Mai 2012;46(3):311–24.
251. Komissarova N, Kashlev M. RNA Polymerase Switches between Inactivated and Activated States By Translocating Back and Forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem*. 13. Juni 1997;272(24):15329–38.

252. Touloukhonov I, Zhang J, Palangat M, Landick R. A Central Role of the RNA Polymerase Trigger Loop in Active-Site Rearrangement during Transcriptional Pausing. *Mol Cell*. 3. August 2007;27(3):406–19.
253. Sydow JF, Brueckner F, Cheung ACM, Damsma GE, Dengl S, Lehmann E, u. a. Structural Basis of Transcription: Mismatch-Specific Fidelity Mechanisms and Paused RNA Polymerase II with Frayed RNA. *Mol Cell*. 26. Juni 2009;34(6):710–21.
254. Thomas MJ, Platas AA, Hawley DK. Transcriptional Fidelity and Proofreading by RNA Polymerase II. *Cell*. Mai 1998;93(4):627–37.
255. Palangat M, Landick R. Roles of RNA:DNA hybrid stability, RNA structure, and active site conformation in pausing by human RNA polymerase II. *J Mol Biol*. 10. August 2001;311(2):265–82.
256. Kireeva ML, Hancock B, Cremona GH, Walter W, Studitsky VM, Kashlev M. Nature of the Nucleosomal Barrier to RNA Polymerase II. *Mol Cell*. 1. April 2005;18(1):97–108.
257. Bintu L, Ishibashi T, Dangkulwanich M, Wu Y-Y, Lubkowska L, Kashlev M, u. a. Nucleosomal Elements that Control the Topography of the Barrier to Transcription. *Cell*. 9. November 2012;151(4):738–49.
258. Porrua O, Libri D. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2015;16(3):190–202.
259. Porrua O, Boudvillain M, Libri D. Transcription Termination: Variations on Common Themes. *Trends Genet*. August 2016;32(8):508–22.
260. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:29–59.
261. Andersson R, Sandelin A, Danko CG. A unified architecture of transcriptional regulatory elements. *Trends Genet*. August 2015;31(8):426–33.
262. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, u. a. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. Mai 2012;485(7398):376–80.
263. Blazeck J, Alper HS. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol J*. 2013;8(1):46–58.
264. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, u. a. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*. März 2007;39(3):311–8.
265. Lee C-K, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet*. August 2004;36(8):900–5.
266. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, u. a. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. Mai 2011;473(7345):43–9.
267. Juven-Gershon T, Cheng S, Kadonaga JT. Rational design of a super core promoter

- that enhances gene expression. *Nat Methods*. November 2006;3(11):917–22.
268. Wong JM, Bateman E. TBP-DNA interactions in the minor groove discriminate between A:T and T:A base pairs. *Nucleic Acids Res*. 25. Mai 1994;22(10):1890–6.
 269. Hahn S, Buratowski S, Sharp PA, Guarente L. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci*. 1. August 1989;86(15):5718–22.
 270. Huminiecki Ł, Horbańczuk J. Can We Predict Gene Expression by Understanding Proximal Promoter Architecture? *Trends Biotechnol* [Internet]. [zitiert 28. April 2017]; Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779917300562>
 271. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, u. a. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science*. 2. September 2005;309(5740):1559–63.
 272. Suzuki Y, Taira H, Tsunoda T, Mizushima-Sugano J, Sese J, Hata H, u. a. Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites. *EMBO Rep*. 15. Mai 2001;2(5):388–93.
 273. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*. 2007;8(6):424–36.
 274. Yamashita R, Suzuki Y, Sugano S, Nakai K. Genome-wide analysis reveals strong correlation between CpG islands with nearby transcription start sites of genes and their tissue specificity. *Gene*. Mai 2005;350(2):129–36.
 275. Lenhard B, Sandelin A, Carninci P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*. April 2012;13(4):233–45.
 276. Plank JL, Dean A. Enhancer Function: Mechanistic and Genome-Wide Insights Come Together. *Mol Cell*. 3. Juli 2014;55(1):5–14.
 277. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, u. a. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci*. 14. Dezember 2010;107(50):21931–6.
 278. Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, u. a. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature*. 12. Februar 2009;457(7231):854–8.
 279. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases. *Cell*. 29. November 1996;87(5):953–9.
 280. Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, u. a. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development*. 15. September 2009;136(18):3131–41.
 281. Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev*. 1. Mai 1991;5(5):820–6.

282. Liu W, Ma Q, Wong K, Li W, Ohgi K, Zhang J, u. a. Brd4 and JMJD6-Associated Anti-Pause Enhancers in Regulation of Transcriptional Pause Release. *Cell*. Dezember 2013;155(7):1581–95.
283. Butler JEF, Kadonaga JT. Enhancer–promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev*. 1. Oktober 2001;15(19):2515–9.
284. Zabidi MA, Arnold CD, Schernhuber K, Pagani M, Rath M, Frank O, u. a. Enhancer-core-promoter specificity separates developmental and housekeeping gene regulation. *Nature*. 26. Februar 2015;518(7540):556–9.
285. Kim T-K, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, u. a. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. Mai 2010;465(7295):182–7.
286. Wang D, Garcia-Bassets I, Benner C, Li W, Su X, Zhou Y, u. a. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature*. 16. Juni 2011;474(7351):390–4.
287. Hah N, Murakami S, Nagari A, Danko CG, Kraus WL. Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. *Genome Res*. 1. August 2013;23(8):1210–23.
288. Melo CA, Drost J, Wijchers PJ, van de Werken H, de Wit E, Vrieling JAFO, u. a. eRNAs Are Required for p53-Dependent Enhancer Activity and Gene Transcription. *Mol Cell*. 7. Februar 2013;49(3):524–35.
289. Hsieh C-L, Fei T, Chen Y, Li T, Gao Y, Wang X, u. a. Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation. *Proc Natl Acad Sci*. 20. Mai 2014;111(20):7319–24.
290. Gaszner M, Felsenfeld G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet*. 2006;7(9):703–13.
291. Ong C-T, Corces VG. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet*. April 2014;15(4):234–46.
292. Ghirlando R, Felsenfeld G. CTCF: making the right connections. *Genes Dev*. 15. April 2016;30(8):881–91.
293. Splinter E, Heath H, Kooren J, Palstra R-J, Klous P, Grosveld F, u. a. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the β -globin locus. *Genes Dev*. 1. September 2006;20(17):2349–54.
294. Guo Y, Xu Q, Canzio D, Shou J, Li J, Gorkin DU, u. a. CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function. *Cell*. 13. August 2015;162(4):900–10.
295. Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem*. 5. Juli 1988;263(19):9063–6.
296. De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*. 1. Juli 1999;24(7):281–5.

297. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. The Structure of a CREB bZIP·Somatostatin CRE Complex Reveals the Basis for Selective Dimerization and Divalent Cation-enhanced DNA Binding. *J Biol Chem.* 10. November 2000;275(45):35242–7.
298. Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM. Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc Natl Acad Sci.* 1. Juni 1992;89(11):4820–4.
299. Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature.* 2. Januar 1992;355(6355):80–4.
300. Bleckmann SC, Blendy JA, Rudolph D, Monaghan AP, Schmid W, Schütz G. Activating Transcription Factor 1 and CREB Are Important for Cell Survival during Early Mouse Development. *Mol Cell Biol.* 15. März 2002;22(6):1919–25.
301. Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of permatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature.* März 1996;380(6570):162–5.
302. Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hämmerling GJ, Arnold B, Schütz G. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 14. April 1998;95(8):4481–6.
303. Zhang X, Odom DT, Koo S-H, Conkright MD, Canettieri G, Best J, u. a. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22. März 2005;102(12):4459–64.
304. Berkowitz LA, Gilman MZ. Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Juli 1990;87(14):5258–62.
305. Blendy JA, Kaestner KH, Schmid W, Gass P, Schutz G. Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform. *EMBO J.* 1. März 1996;15(5):1098–106.
306. Iguchi-Ariga SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 1. Mai 1989;3(5):612–9.
307. Conkright MD, Guzmán E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M. Genome-Wide Analysis of CREB Target Genes Reveals A Core Promoter Requirement for cAMP Responsiveness. *Mol Cell.* April 2003;11(4):1101–8.
308. Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature.* Oktober 1993;365(6449):855–9.
309. Bullock BP, Habener JF. Phosphorylation of the cAMP Response Element Binding Protein CREB by cAMP-Dependent Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase-3

- Alters DNA-Binding Affinity, Conformation, and Increases Net Charge. *Biochemistry (Mosc)*. März 1998;37(11):3795–809.
310. Nichols M, Weih F, Schmid W, DeVack C, Kowenz-Leutz E, Luckow B, u. a. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J*. September 1992;11(9):3337–46.
 311. Felinski EA, Kim J, Lu J, Quinn PG. Recruitment of an RNA Polymerase II Complex Is Mediated by the Constitutive Activation Domain in CREB, Independently of CREB Phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 15. Februar 2001;21(4):1001–10.
 312. Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, u. a. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell*. 10. Juli 1992;70(1):105–13.
 313. Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF, Lickteig RL, Johnson GL, u. a. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol*. 1. Mai 1993;13(5):2822–34.
 314. Canettieri G, Morante I, Guzmán E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, u. a. Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC–PP1 complex. *Nat Struct Mol Biol*. März 2003;10(3):175–81.
 315. Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 17. November 1989;59(4):675–80.
 316. Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*. 1. März 1995;47(3):439–49.
 317. Seamon KB, Daly JW. Forskolin, cyclic AMP and cellular physiology. *Trends Pharmacol Sci*. 1. Januar 1983;4:120–3.
 318. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J*. 2. September 1996;15(17):4629–42.
 319. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 7. Juni 1991;252(5011):1427–30.
 320. Sun P, Enslen H, Myung PS, Maurer RA. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*. 1. November 1994;8(21):2527–39.
 321. Fiol CJ, Williams JS, Chou CH, Wang QM, Roach PJ, Andrisani OM. A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem*. 23. Dezember 1994;269(51):32187–93.
 322. Conkright MD, Canettieri G, Screatton R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch JB, u. a.

- TORCs: Transducers of Regulated CREB Activity. *Mol Cell*. August 2003;12(2):413–23.
323. Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, u. a. The CREB Coactivator TORC2 Functions as a Calcium- and cAMP-Sensitive Coincidence Detector. *Cell*. Oktober 2004;119(1):61–74.
 324. Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of Muscle Differentiation by the MEF2 Family of MADS Box Transcription Factors. *Dev Biol*. November 1995;172(1):2–14.
 325. Fickett JW. Quantitative discrimination of MEF2 sites. *Mol Cell Biol*. 1996;16(1):437–441.
 326. Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol Cell Biol*. 1. Juni 1996;16(6):2627–36.
 327. Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci*. 11. April 2000;97(8):4070–5.
 328. Zhang CL, McKinsey TA, Lu J, Olson EN. Association of COOH-terminal-binding Protein (CtBP) and MEF2-interacting Transcription Repressor (MITR) Contributes to Transcriptional Repression of the MEF2 Transcription Factor. *J Biol Chem*. 5. Januar 2001;276(1):35–9.
 329. Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao T-P. Regulation of MEF2 by Histone Deacetylase 4- and SIRT1 Deacetylase-Mediated Lysine Modifications. *Mol Cell Biol*. 1. Oktober 2005;25(19):8456–64.
 330. McKinsey TA, Zhang C-L, Lu J, Olson EN. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*. 2. November 2000;408(6808):106–11.
 331. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 3. Juli 2006;116(7):1853–64.
 332. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*. März 1997;386(6622):296–9.
 333. Rampalli S, Li L, Mak E, Ge K, Brand M, Tapscott SJ, u. a. p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. *Nat Struct Mol Biol*. Dezember 2007;14(12):1150–6.
 334. Youn H-D, Chatila TA, Liu JO. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J*. 15. August 2000;19(16):4323–31.
 335. Mao Z, Wiedmann M. Calcineurin Enhances MEF2 DNA Binding Activity in Calcium-dependent Survival of Cerebellar Granule Neurons. *J Biol Chem*. 22. Oktober 1999;274(43):31102–7.
 336. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, u. a. Activation

- of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J.* 15. November 2001;20(22):6414–23.
337. Pon JR, Marra MA, Pon JR, Marra MA. MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes. *Oncotarget.* 25. Oktober 2015;7(3):2297–312.
 338. Nojima M, Huang Y, Tyagi M, Kao H-Y, Fujinaga K. The Positive Transcription Elongation Factor b Is an Essential Cofactor for the Activation of Transcription by Myocyte Enhancer Factor 2. *J Mol Biol.* Oktober 2008;382(2):275–87.
 339. Sartorelli V, Huang J, Hamamori Y, Kedes L. Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol Cell Biol.* 1. Februar 1997;17(2):1010–26.
 340. Ma K, Chan JKL, Zhu G, Wu Z. Myocyte Enhancer Factor 2 Acetylation by p300 Enhances Its DNA Binding Activity, Transcriptional Activity, and Myogenic Differentiation. *Mol Cell Biol.* 1. Mai 2005;25(9):3575–82.
 341. Krainc D, Bai G, Okamoto S, Carles M, Kusiak JW, Brent RN, u. a. Synergistic Activation of the N-Methyl-D-aspartate Receptor Subunit 1 Promoter by Myocyte Enhancer Factor 2C and Sp1. *J Biol Chem.* 2. Oktober 1998;273(40):26218–24.
 342. Molkenstein JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell.* Dezember 1995;83(7):1125–36.
 343. Kruse U, Qian F, Sippel AE. Identification of a fourth Nuclear Factor I gene in chicken by cDNA cloning: NFI-X. *Nucleic Acids Res.* 11. Dezember 1991;19(23):6641–6641.
 344. Gronostajski RM. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene.* 2000;249(1–2):31–45.
 345. Meisterernst M, Gander I, Rogge L, Winnacker EL. A quantitative analysis of nuclear factor I/DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(10):4419–35.
 346. Mermoud N, O'Neill EA, Kelly TJ, Tjian R. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell.* 25. August 1989;58(4):741–53.
 347. Xiao H, Lis JT, Xiao H, Greenblatt J, Friesen JD. The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* 11. Juni 1994;22(11):1966–73.
 348. Kim TK, Roeder RG. Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci.* 10. Mai 1994;91(10):4170–4.
 349. Alevizopoulos A, Dusserre Y, Tsai-Pflugfelder M, Weid T von der, Wahli W, Mermoud N. A proline-rich TGF-beta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes Dev.* 15. Dezember 1995;9(24):3051–66.
 350. Hebbar PB, Archer TK. Nuclear Factor 1 Is Required for Both Hormone-Dependent Chromatin Remodeling and Transcriptional Activation of the Mouse Mammary Tumor Virus Promoter. *Mol Cell Biol.* 1. Februar 2003;23(3):887–98.

351. Denny SK, Yang D, Chuang C-H, Brady JJ, Lim JS, Grüner BM, u. a. Nfib Promotes Metastasis through a Widespread Increase in Chromatin Accessibility. *Cell*. 14. Juli 2016;166(2):328–42.
352. Alevizopoulos A, Dusserre Y, Rüegg U, Mermod N. Regulation of the Transforming Growth Factor β -responsive Transcription Factor CTF-1 by Calcineurin and Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase IV. *J Biol Chem*. 19. September 1997;272(38):23597–605.
353. Brun M, Glubrecht DD, Baksh S, Godbout R. Calcineurin Regulates Nuclear Factor I Dephosphorylation and Activity in Malignant Glioma Cell Lines. *J Biol Chem*. 16. August 2013;288(33):24104–15.
354. Sinha S, Maity SN, Lu J, Crombrugghe B de. Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc Natl Acad Sci*. 28. Februar 1995;92(5):1624–8.
355. Mantovani R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*. 1999;239(1):15–27.
356. Dolfini D, Gatta R, Mantovani R. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2012;47(1):29–49.
357. Mantovani R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(5):1135–43.
358. Wright KL, Moore TL, Vilen BJ, Brown AM, Jenny P. -Y. Ting. Major Histocompatibility Complex Class II-associated Invariant Chain Gene Expression Is Up-regulated by Cooperative Interactions of Sp1 and NF-Y. *J Biol Chem*. 8. September 1995;270(36):20978–86.
359. Dolfini D, Zambelli F, Pavesi G, Mantovani R. A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell Cycle*. 15. Dezember 2009;8(24):4127–37.
360. Coustry F, Maity SN, Sinha S, Crombrugghe B de. The Transcriptional Activity of the CCAAT-binding Factor CBF Is Mediated by Two Distinct Activation Domains, One in the CBF-B Subunit and the Other in the CBF-C Subunit. *J Biol Chem*. 14. Juni 1996;271(24):14485–91.
361. de Silvio A, Imbriano C, Mantovani R. Dissection of the NF-Y transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res*. 1. Juli 1999;27(13):2578–84.
362. Manni I, Caretti G, Artuso S, Gurtner A, Emiliozzi V, Sacchi A, u. a. Posttranslational Regulation of NF-YA Modulates NF-Y Transcriptional Activity. *Mol Biol Cell*. 1. Dezember 2008;19(12):5203–13.
363. Roder K, Wolf SS, Larkin KJ, Schweizer M. Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene*. 24. Juni 1999;234(1):61–9.
364. Bellorini M, Lee DK, Dantonel JC, Zemzoumi K, Roeder RG, Tora L, u. a. CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Res*. 1.

Juni 1997;25(11):2174–81.

- 365. Frontini M, Imbriano C, diSilvio A, Bell B, Bogni A, Romier C, u. a. NF-Y Recruitment of TFIID, Multiple Interactions with Histone Fold TAFIIs. *J Biol Chem.* 22. Februar 2002;277(8):5841–8.
- 366. Caretti G, Motta MC, Mantovani R. NF-Y Associates with H3-H4 Tetramers and Octamers by Multiple Mechanisms. *Mol Cell Biol.* 1. Dezember 1999;19(12):8591–603.
- 367. Nardone V, Chaves-Sanjuan A, Nardini M. Structural determinants for NF-Y/DNA interaction at the CCAAT box. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech.* Mai 2017;1860(5):571–80.
- 368. Donati G, Gatta R, Dolfini D, Fossati A, Ceribelli M, Mantovani R. An NF-Y-Dependent Switch of Positive and Negative Histone Methyl Marks on CCAAT Promoters. *PLOS ONE.* 30. April 2008;3(4):e2066.
- 369. Peng Y, Jahroudi N. The NFY Transcription Factor Inhibits von Willebrand Factor Promoter Activation in Non-endothelial Cells through Recruitment of Histone Deacetylases. *J Biol Chem.* 7. März 2003;278(10):8385–94.
- 370. van Vliet J, Crofts LA, Quinlan KGR, Czolij R, Perkins AC, Crossley M. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics.* April 2006;87(4):474–82.
- 371. Suske G, Bruford E, Philipsen S. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics.* 2005;85(5):551–6.
- 372. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 2003;4(2):206.
- 373. Wierstra I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(1):1–13.
- 374. Letovsky J, Dynan WS. Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2639–53.
- 375. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1. März 1994;14(3):1582–93.
- 376. Suzuki T, Kimura A, Nagai R, Horikoshi M. Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells.* 1. Januar 2000;5(1):29–41.
- 377. Hung J-J, Wang Y-T, Chang W-C. Sp1 Deacetylation Induced by Phorbol Ester Recruits p300 To Activate 12(S)-Lipoxygenase Gene Transcription. *Mol Cell Biol.* 1. März 2006;26(5):1770–85.
- 378. Kadam S, Emerson BM. Transcriptional Specificity of Human SWI/SNF BRG1 and BRM Chromatin Remodeling Complexes. *Mol Cell.* 1. Februar 2003;11(2):377–89.
- 379. Xu YZ, Heravi M, Thuraisingam T, Di Marco S, Muanza T, Radzioch D. Brg-1

- mediates the constitutive and fenretinide-induced expression of SPARC in mammary carcinoma cells via its interaction with transcription factor Sp1. *Mol Cancer*. 5. August 2010;9:210.
380. Yamada K, Tanaka T, Miyamoto K, Noguchi T. Sp Family Members and Nuclear Factor-Y Cooperatively Stimulate Transcription from the Rat Pyruvate Kinase M Gene Distal Promoter Region via Their Direct Interactions. *J Biol Chem*. 16. Juni 2000;275(24):18129–37.
 381. Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature*. 4. Februar 1999;397(6718):446–50.
 382. Chang W-C, Hung J-J. Functional role of post-translational modifications of Sp1 in tumorigenesis. *J Biomed Sci*. 2012;19:94.
 383. Wang Y-T, Chuang J-Y, Shen M-R, Yang W-B, Chang W-C, Hung J-J. Sumoylation of Specificity Protein 1 Augments Its Degradation by Changing the Localization and Increasing the Specificity Protein 1 Proteolytic Process. *J Mol Biol*. 25. Juli 2008;380(5):869–85.
 384. Milanini-Mongiat J, Pouyssegur J, Pagès G. Identification of Two Sp1 Phosphorylation Sites for p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases THEIR IMPLICATION IN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE TRANSCRIPTION. *J Biol Chem*. 7. Juni 2002;277(23):20631–9.
 385. D'Addario M, Arora PD, McCulloch CA. Role of p38 in stress activation of Sp1. *Gene*. 1. September 2006;379:51–61.
 386. Ahlgren R, Suske G, Waterman MR, Lund J. Role of Sp1 in cAMP-dependent Transcriptional Regulation of the Bovine CYP11A Gene. *J Biol Chem*. 2. Juli 1999;274(27):19422–8.
 387. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Names A, u. a. Spl elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 29. September 1994;371(6496):435–8.
 388. Zhu W-G, Srinivasan K, Dai Z, Duan W, Druhan LJ, Ding H, u. a. Methylation of Adjacent CpG Sites Affects Sp1/Sp3 Binding and Activity in the p21Cip1 Promoter. *Mol Cell Biol*. 15. Juni 2003;23(12):4056–65.
 389. Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression. *Free Radic Biol Med*. 1. April 2010;48(7):895–904.
 390. Hirai H, Tani T, Kikyo N. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *Int J Dev Biol*. 16. Februar 2011;54(11–12):1589–96.
 391. Babb R, Huang CC, Aufiero DJ, Herr W. DNA Recognition by the Herpes Simplex Virus Transactivator VP16: a Novel DNA-Binding Structure. *Mol Cell Biol*. 15. Juli 2001;21(14):4700–12.

392. Kundu TK, Palhan VB, Wang Z, An W, Cole PA, Roeder RG. Activator-Dependent Transcription from Chromatin In Vitro Involving Targeted Histone Acetylation by p300. *Mol Cell*. 1. September 2000;6(3):551–61.
393. Vignali M, Steger DJ, Neely KE, Workman JL. Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J*. 1. Juni 2000;19(11):2629–40.
394. Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, u. a. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*. 21. April 2016;532(7599):329–33.
395. Vanyushin BF, Tkacheva SG, Belozersky AN. Rare Bases in Animal DNA. *Nature*. März 1970;225(5236):948–9.
396. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, u. a. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 19. November 2009;462(7271):315–22.
397. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature*. 24. August 1978;274(5673):775–80.
398. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, u. a. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 15. Februar 2001;409(6822):860–921.
399. Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, u. a. A Unifying Model for the Selective Regulation of Inducible Transcription by CpG Islands and Nucleosome Remodeling. *Cell*. 10. Juli 2009;138(1):114–28.
400. Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. Sp1 binding is inhibited by mCpmCpG methylation. *Gene*. 11. August 1997;195(1):67–71.
401. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. Juli 2012;13(7):484–92.
402. Rishi V, Bhattacharya P, Chatterjee R, Rozenberg J, Zhao J, Glass K, u. a. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP α binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proc Natl Acad Sci*. 23. November 2010;107(47):20311–6.
403. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 20. Juli 1987;196(2):261–82.
404. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1412–7.
405. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, u. a. Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome. *PLOS Genet*. 23. September 2010;6(9):e1001134.
406. Rozenberg JM, Shlyakhtenko A, Glass K, Rishi V, Myakishev MV, FitzGerald PC, u. a. All and only CpG containing sequences are enriched in promoters abundantly bound by RNA polymerase II in multiple tissues. *BMC Genomics*. 5. Februar 2008;9:67.

407. Blackledge NP, Zhou JC, Tolstorukov MY, Farcas AM, Park PJ, Klose RJ. CpG Islands Recruit a Histone H3 Lysine 36 Demethylase. *Mol Cell*. 23. April 2010;38(2):179–90.
408. Hargreaves DC, Horng T, Medzhitov R. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell*. 2009;138(1):129–45.
409. Zhu J, He F, Hu S, Yu J. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet*. Oktober 2008;24(10):481–4.
410. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 18. September 1997;389(6648):251–60.
411. Kornberg RD. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*. 24. Mai 1974;184(4139):868–71.
412. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 „tail“ to DNA. *J Biol Chem*. 5. Januar 1993;268(1):305–14.
413. Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, u. a. Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell*. 18. November 2005;123(4):581–92.
414. Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, u. a. WDR5 Associates with Histone H3 Methylated at K4 and Is Essential for H3 K4 Methylation and Vertebrate Development. *Cell*. 17. Juni 2005;121(6):859–72.
415. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, u. a. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 6. Juli 2006;442(7098):96–9.
416. Bespalova IN, Burmeister M. Identification of a Novel LIM Domain Gene, LMCD1, and Chromosomal Localization in Human and Mouse. *Genomics*. 1. Januar 2000;63(1):69–74.
417. Bekman E, Henrique D. Embryonic expression of three mouse genes with homology to the *Drosophila melanogaster* prickly gene. *Mech Dev*. Dezember 2002;119, Supplement:S77–81.
418. Sánchez-García I, Rabbits TH. The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet*. 1. September 1994;10(9):315–20.
419. Schmeichel KL, Beckerle MC. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*. 21. Oktober 1994;79(2):211–9.
420. Kadrmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. November 2004;5(11):920–31.
421. Frank D, Frauen R, Hanselmann C, Kuhn C, Will R, Gantenberg J, u. a. Lmcd1/Dyxin, a novel Z-disc associated LIM protein, mediates cardiac hypertrophy in vitro and in vivo.

- J Mol Cell Cardiol. 2010;49(4):673–82.
422. Rath N, Wang Z, Lu MM, Morrissey EE. LMCD1/Dyxin is a novel transcriptional cofactor that restricts GATA6 function by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol.* 2005;25(20):8864–73.
 423. Bian ZY, Huang H, Jiang H, Shen DF, Yan L, Zhu LH, u. a. LIM and cysteine-rich domains 1 regulates cardiac hypertrophy by targeting calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling. *Hypertension.* 2010;55(2):257–63.
 424. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J Biol Chem.* 29. Mai 1998;273(22):13367–70.
 425. Wilkins BJ, Dai Y-S, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, u. a. Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 9. Januar 2004;94(1):110–8.
 426. Luosujarvi H, Aro J, Tokola H, Leskinen H, Tenhunen O, Skoumal R, u. a. A novel p38 MAPK target dyxin is rapidly induced by mechanical load in the heart. *Blood Press.* 2010;19(1):54–63.
 427. Chang C-Y, Lin S-C, Su W-H, Ho C-M, Jou Y-S. Somatic LMCD1 mutations promoted cell migration and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 24. Mai 2012;31(21):2640–52.
 428. Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Lüdde M, Katus HA, u. a. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension.* 2008;51(2):309–18.
 429. Liang CS, Ikeda D, Kinoshita S, Shimizu A, Sasaki T, Asakawa S, u. a. Myocyte enhancer factor 2 regulates expression of medaka *Oryzias latipes* fast skeletal myosin heavy chain genes in a temperature-dependent manner. *Gene.* 2008;407(1–2):42–53.
 430. Udelhoven M, Leiser U, Freude S, Hettich MM, Laudes M, Schnitker J, u. a. Identification of a region in the human IRS2 promoter essential for stress induced transcription depending on SP1, NFI binding and ERK activation in HepG2 cells. *J Mol Endocrinol.* 2010;44(2):99–113.
 431. Dwivedi PP, Anderson PH, Omdahl JL, Grimes HL, Morris HA, May BK. Identification of growth factor independent-1 (GFI1) as a repressor of 25-hydroxyvitamin D 1-alpha hydroxylase (CYP27B1) gene expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(2):351–65.
 432. Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C, Mathis D. A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell.* 11. September 1987;50(6):863–72.
 433. Kim HJ, Ko MS, Kim HK, Cho WJ, Lee SH, Lee BJ, u. a. Transcription factor Sp1 regulates basal transcription of the human DRG2 gene. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech.* 2011;1809(3):184–90.
 434. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. In: Russell DJ, Herausgeber. *Multiple Sequence Alignment Methods.* Totowa,

NJ: Humana Press; 2014. S. 105–16.

435. Sloutskin A, Danino YM, Orenstein Y, Zehavi Y, Doniger T, Shamir R, u. a. ElemeNT: a computational tool for detecting core promoter elements. *Transcription*. 27. Mai 2015;6(3):41–50.
436. Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, u. a. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*. 1. Januar 2014;42(D1):D142–7.
437. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
438. Karolchik D, Barber GP, Casper J, Clawson H, Cline MS, Diekhans M, u. a. The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res*. 1. Januar 2014;42(D1):D764–70.
439. Ureta-Vidal A, Ettiwiller L, Birney E. Comparative genomics: genome-wide analysis in metazoan eukaryotes. *Nat Rev Genet*. April 2003;4(4):251–62.
440. Smith CL, Hager GL. Transcriptional Regulation of Mammalian Genes in Vivo A TALE OF TWO TEMPLATES. *J Biol Chem*. 31. Oktober 1997;272(44):27493–6.
441. Hebbar PB, Archer TK. Altered Histone H1 Stoichiometry and an Absence of Nucleosome Positioning on Transfected DNA. *J Biol Chem*. 22. Februar 2008;283(8):4595–601.
442. Deroo BJ, Archer TK. Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene*. 28. Mai 2001;20(24):3039–46.
443. Geier GE, Modrich P. Recognition sequence of the dam methylase of Escherichia coli K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J Biol Chem*. 25. Februar 1979;254(4):1408–13.
444. May MS, Hattman S. Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes. *J Bacteriol*. August 1975;123(2):768–70.
445. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase Methylates DNA Processively with High Preference for Hemimethylated Target Sites. *J Biol Chem*. 12. November 2004;279(46):48350–9.
446. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M, u. a. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res*. 1. Oktober 1999;27(19):3792–8.
447. Yin W, Xiang P, Li Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Anal Biochem*. 15. November 2005;346(2):289–94.
448. Smale ST, Schmidt MC, Berk AJ, Baltimore D. Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juni 1990;87(12):4509–13.

449. Smale ST. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.* 1. Oktober 2001;15(19):2503–8.
450. Emami KH, Navarre WW, Smale ST. Core promoter specificities of the Sp1 and VP16 transcriptional activation domains. *Mol Cell Biol.* 1. November 1995;15(11):5906–16.
451. O'Shea-Greenfield A, Smale ST. Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem.* 15. Januar 1992;267(2):1391–402.
452. The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (dgt). A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature.* 27. März 2014;507(7493):462–70.
453. Abugessaisa I, Shimoji H, Sahin S, Kondo A, Harshbarger J, Lizio M, u. a. FANTOM5 transcriptome catalog of cellular states based on Semantic MediaWiki. Database [Internet]. 1. Januar 2016 [zitiert 4. August 2017];2016. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/baw105/2630487/FANTOM5-transcriptome-catalog-of-cellular-states>
454. Severin J, Lizio M, Harshbarger J, Kawaji H, Daub CO, Hayashizaki Y, u. a. Interactive visualization and analysis of large-scale sequencing datasets using ZENBU. *Nat Biotechnol.* März 2014;32(3):217–9.
455. Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol.* 1996;16(8):4024–34.
456. Colter DC, Piera-Velazquez S, Hawkins DF, Whitecavage MK, Jimenez SA, Stokes DG. Regulation of the human Sox9 promoter by the CCAAT-binding factor. *Matrix Biol.* 1. Mai 2005;24(3):185–97.
457. Piera-Velazquez S, Hawkins DF, Whitecavage MK, Colter DC, Stokes DG, Jimenez SA. Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB. *Exp Cell Res.* 1. April 2007;313(6):1069–79.
458. Dong C, Yang X-Z, Zhang C-Y, Liu Y-Y, Zhou R-B, Cheng Q-D, u. a. Myocyte enhancer factor 2C and its directly-interacting proteins: A review. *Prog Biophys Mol Biol* [Internet]. [zitiert 19. Mai 2017]; Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610716300839>
459. Simpson P. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res.* 1. Juni 1985;56(6):884–94.
460. Sugden PH, Clerk A. Activation of the Small GTP-binding Protein Ras in the Heart by Hypertrophic Agonists. *Trends Cardiovasc Med.* 1. Januar 2000;10(1):1–8.
461. Ramirez MT, Zhao X-L, Schulman H, Brown JH. The Nuclear δ B Isoform of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Regulates Atrial Natriuretic Factor Gene Expression in Ventricular Myocytes. *J Biol Chem.* 5. Dezember 1997;272(49):31203–8.

462. Prasad AM, Inesi G. Effects of thapsigargin and phenylephrine on calcineurin and protein kinase C signaling functions in cardiac myocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1. Mai 2009;296(5):C992–1002.
463. Greenbaum D, Jansen R, Gerstein M. Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics*. 1. April 2002;18(4):585–96.
464. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol*. 1. März 1999;19(3):1720–30.
465. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 1. März 2006;20(5):515–24.
466. Markou T, Hadzopoulou-Cladaras M, Lazou A. Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 1. November 2004;37(5):1001–11.
467. Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res*. 1. Juli 1993;73(1):184–92.
468. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Nagai R, Aikawa R, u. a. Role of Ion Channels and Exchangers in Mechanical Stretch-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res*. 9. März 1998;82(4):430–7.
469. Dostal DE, Feng H, Nizamutdinov D, Golden HB, Afroze SH, Dostal JD, u. a. Mechanosensing and Regulation of Cardiac Function. *J Clin Exp Cardiol*. 5. Juni 2014;5(6):314.
470. Lal H, Verma S, Smith M, Guleria R, Lu G, Foster D, u. a. Stretch-Induced MAP Kinase Activation in Cardiac Myocytes: Differential Regulation through β 1-Integrin and Focal Adhesion Kinase. *J Mol Cell Cardiol*. August 2007;43(2):137–47.
471. Saito T, Fukuzawa J, Osaki J, Sakuragi H, Yao N, Haneda T, u. a. Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1. September 2003;35(9):1153–60.

8 Anhang

8.1 IUPAC Nomenklatur für Nukleinsäuren

Symbol	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
R	A oder G
Y	C oder T
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C, G oder T
D	A, G oder T
H	A, C oder T
V	A, C oder G
N	A, C, G oder T
-	Lücke

Tabelle 12: IUPAC Nomenklatur für Nukleinsäuren.

9 Eigene Veröffentlichung

Eilers F, Frauen R, Johnson B, Olson EN, Frey N, Frank D. The prohypertrophic molecule Dyxin/Lmcd1 is regulated by the stress- responsive transcription factor MEF2. Postervortrag, 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie; Mannheim 10. April 2015.

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Derk Frank für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche Unterstützung des Projekts sowie bei Prof. Dr. med. Norbert Frey für die Nutzungsmöglichkeit der exzellent ausgestatteten Räumlichkeiten.

Dr. med. Robert Frauen danke ich für die geleistete Unterstützung vor allem in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Molekulare Kardiologie am UKSH für die freundliche Arbeitsatmosphäre, unzählige Hilfestellungen und gegebene Ratschläge.