

**Bedeutung und funktionelle Charakterisierung des
Transkriptionsfaktors Egr-1 für die Pathogenese
der rheumatoiden Arthritis**

DISSERTATION

**der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

vorgelegt

von

**Dorothea Alexander
aus Bukarest (Rumänien)**

2003

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2003

Dekan: Professor Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Aicher

2. Berichterstatter: Professor_Dr._A._Nordheim

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Synovium	4
1.2	Synovitis bei der RA	5
1.3	Entzündungsmediatoren bei der RA	7
1.4	Matrix Metalloproteinasen	9
1.5	Transkriptionsfaktoren	11
1.5.1	Der Transkriptionsfaktor Egr-1	12
1.5.2	Egr-1 regulierte Gene	15
1.5.3	Die Egr-1 Rolle bei der Reifung von B- und T-Zellen	15
1.5.4	Egr-1 Knock-out Mäuse	16
1.5.5	Transkriptionsfaktoren und ihre Rolle bei der RA	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	
2.1	Zellkultur	21
2.1.1	Zelllinien	21
2.2	Herstellung des LB-Mediums/der Agar-Platten	21
2.2.1	Transformation von kompetenten Bakterien	22
2.2.2	Mini- und Maxi-Präparationen	22
2.2.3	Verwendete Vektoren	24
2.3	Prinzip der Transfektion mittels kationischer liposomaler Reagenzien	26
2.4	Immortalisierung synovialer Fibroblasten	26
2.5	Herstellung des rekombinanten murinen Egr-1	27
2.5.1	Stabile Transfektion immortalisierter Fibroblasten mit dem rekombinanten murinen Egr-1	28
2.5.2	Transiente Transfektion von humanen Fibrosarkomzellen (HT1080)	29
2.5.3	Transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen	31
2.6	RNA-Extraktion und c-DNA Synthese	33
2.7	RAP-PCR	33
2.8	Quantitative Echtzeit (real-time) PCR	34
2.9	Herstellung der Agarose-Gele	37
2.10	Egr-1 Proteinanalysen mittels Western Blotting	38
2.10.1	Kollagen Typ I Proteinanalysen mittels Western Blotting	39
2.10.2	Proteinanalysen mittels ELISA	40
2.11	Herstellung von Promotor-Konstrukten	40
2.12	Ligationsansätze	42
2.13	Promotor-Reporter Assays	43
2.14	Transduktion der murinen embryonalen Fibroblasten Zelllinie NIH3T3	43

3.	Ergebnisse	
3.1	Untersuchung des rekombinanten murinen Egr-1 auf Proteinebene nach der stabilen Transfektion immortalisierter Fibroblasten	47
3.2	Untersuchung des rekombinanten murinen Egr-1 auf Transkriptebene nach der stabilen Transfektion immortalisierter Fibroblasten	51
3.3	Untersuchung der Proliferation von stabil transfizierten Fibroblasten	52
3.4	Untersuchung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe der RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)	53
3.5	Bestätigung der Kollagen I (α 1 Kette) Genexpression mittels quantitativer Echtzeit PCR	54
3.6	Bestätigung der Kollagen I (α 2 Kette) Genexpression mittels quantitativer Echtzeit PCR	56
3.7	Untersuchung der Kollagen I Expression auf Proteinebene	57
3.8	Untersuchung der Kollagen II (α 1 Kette) und PDGF Genexpression	59
3.9	Untersuchung der TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) Genexpression	60
3.10	Untersuchung der TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) Proteinexpression	62
3.11	Transiente Transfektion von humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) mit dem pcDNA3.1(+) \times Egr-1 Vektor	63
3.12	Transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (EcR-293)	68
3.13	Funktionelle Analysen des TIMP-1 Promotors in Egr-1 überexprimierenden Klonen	72
3.14	Transduktion der murinen embryonalen Fibroblasten Zelllinie (NIH3T3)	77
3.15	Funktionelle Analysen des Kollagen Typ I Promotors in transduzierten Maus-Fibroblasten	81
4.	Diskussion	87
5.	Zusammenfassung	104
6.	Literaturverzeichnis	107
7.	Danksagung	123
8.	Lebenslauf	124
	Publikationen und Kongressbeiträge	

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator protein 1
AS	Aminosäure
BCR	B-cell antigen receptor
b-FGF	Basic fibroblast growth factor
CREB	cAMP regulated binding protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
EBS	Egr-1 binding site
EGR-1	Early growth response gene 1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FCS	Fötale Kälberserum
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JNK	c-jun aminoterminal kinase
kDA	Kilodalton
LH- β	Luteinizing hormone- β
MAPK	Mitogen activated protein kinase
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MMP	Matrix-metalloproteinase
NAB	NGFI-A binding protein
NF κ B	Nuclear factor κ B
NGFI-A	Nerve growth factor inducible gene A
OA	Osteoarthrose
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor activator of NF κ B ligand
RAP-PCR	Random arbitrarily primed PCR
SCID	Severe combined immunodeficient
SOD1	Superoxide dismutase
SRE	Serum response element
TCF	Ternary complex factor
TCR	T-cell receptor
TF	Tissue factor
TGF	Tissue growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
TRAP	Tartat resistant acid phosphatase
UDPGD	Uridin diphosphoglucose dehydrogenase
VCAM	Vascular cellular adhesion molecule

1. Einleitung

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung mit einer Prävalenz von etwa 1% der Bevölkerung. Über Phasen der rezidivierenden, meist-symmetrisch-manifesten Arthritiden kommt es sehr früh zu Knorpel- und Knochenläsionen, deren molekulare Grundlage in ihrer Komplexität immer noch nicht umfassend verstanden ist. Epidemiologische Daten belegen, daß 30% der Patienten schon im ersten Jahr und rund 70% innerhalb der ersten beiden Jahre nach Beginn der Primärsymptome radiologisch nachweisbare Erosionen entwickeln (Heijde et al., 1995). Obwohl die rheumatoide Arthritis als eine benigne Erkrankung eingestuft wird, zeigen statistische Analysen aus Langzeitbeobachtungen, dass die Mortalität der betreffenden Patienten erhöht ist. Zum einen basiert dies auf einer Beteiligung lebenswichtiger Organe des Herz-Kreislauf-Systems zum anderen auf Medikamenten-nebenwirkungen, Infektionen und Sekundär-malignomen (Pincus et al., 1986; Harris et al., 1990).

Aho et al. (1986) zeigte in einer großen Studie an monozygoten Zwillingen aus Finnland eine 12%-ige Übereinstimmung für RA verglichen mit der 4%-igen Konkordanz bei zweieiigen Zwillingen. Eine weitere Studie aus England, die an 203 RA-betroffenen Zwillingen durchgeführt wurde, deckte eine 15%-ige Konkordanz für RA bei eineiigen Zwillingen auf, im Vergleich zur 4%-igen Übereinstimmung bei dizygoten Zwillingen (Silman et al., 1993). Beide Studien konnten eine 3- bis 4-fach höhere Konkordanz für RA bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten nachweisen. Diese Daten weisen darauf hin, dass für die Entstehung der rheumatoiden Arthritis eine genetische Grundlage sicherlich eine wichtige Rolle spielt. Vor mehr als 20 Jahren wies der Bericht von Stastny et al. (1978) zum ersten Mal auf eine Assoziation zwischen bestimmten genetischen Marker und dem Ausbruch der RA hin. Bei Patienten mit einer schweren RA fand er eine höhere Frequenz der HLA (humanes leukozytäres Antigen) -DR4 Allele. Viele DRB1 Allele wurden mittlerweile mit der RA assoziiert, darunter die DR4-Subtypen DRB1*0401, *0404, *0405 und 0408 sowie DRB1*0101, *1402 und *1001

(Fugger und Svejgaard, 2000). Nepom et al. (1998) fasste das relative Risiko für die drei häufigsten DRB1-Allele in der kaukasischen Population zusammen. Dabei war das relative Risiko eine RA zu entwickeln für Patienten, die DRB1*0401 Allele exprimierten, 6mal höher und für Patienten, die DRB1*0404 Allele exprimierten, 5mal höher. Für das DRB1*0101 Allel ergab sich kein erhöhtes Risiko im Vergleich zu Individuen, die dieses Allel nicht tragen.

Die primäre Funktion der HLA-Moleküle besteht in der Bindung von Antigenpeptiden. Dies stellt ein Teil der Immunaktivierung dar, das zur Antigenpräsentation an die T-Zelle führt. Die Fähigkeit eines Antigenpeptids an ein HLA-Molekül gebunden zu werden, entscheidet darüber, ob eine Immunantwort gegen dieses Peptid generiert werden soll. Die individuelle Variation der HLA-Moleküle in der Peptid-Bindungsdomäne, verursacht durch den genetischen Polymorphismus, führt dazu, dass ein bestimmtes Peptid in einem Individuum als Antigen erkannt wird, im anderen Individuum jedoch wegen seiner Unfähigkeit an seine HLA-Moleküle zu binden, nicht erkannt wird (Abb 1). Die RA-assoziierten HLA-DR4 Moleküle tragen Änderungen der Aminosäuresequenz der Kodons 67, 70, 71 und 74. Dieses Merkmal reicht aus um die mit dem HLA-DR4 assoziierte Empfänglichkeit für RA zu ändern. Eines der Ziele bei der Generierung transgener Mäuse, die RA-assoziierte HLA-DR Moleküle exprimieren, war es humanisierte Tiermodelle für die RA zu entwickeln. Weder DRB1*0401 noch DRB1*0101 transgene Mäuse entwickeln eine spontane Arthritis (Fugger et al., 1994; Woods et al., 1994). Wenn DRB1*0401 (Andersson et al., 1998; Rosloniec et al., 1998) oder DRB1*0101 (Rosloniec et al., 1997) transgene Mäuse mit nativem Kollagen II immunisiert werden, entwickelt ein Großteil der Tiere eine inflammatorische Arthritis, die der humanen RA sehr ähnlich ist und die kaum von der klassischen Kollagen-induzierten Arthritis bei der Maus zu unterscheiden ist (Holmdahl et al., 1999).

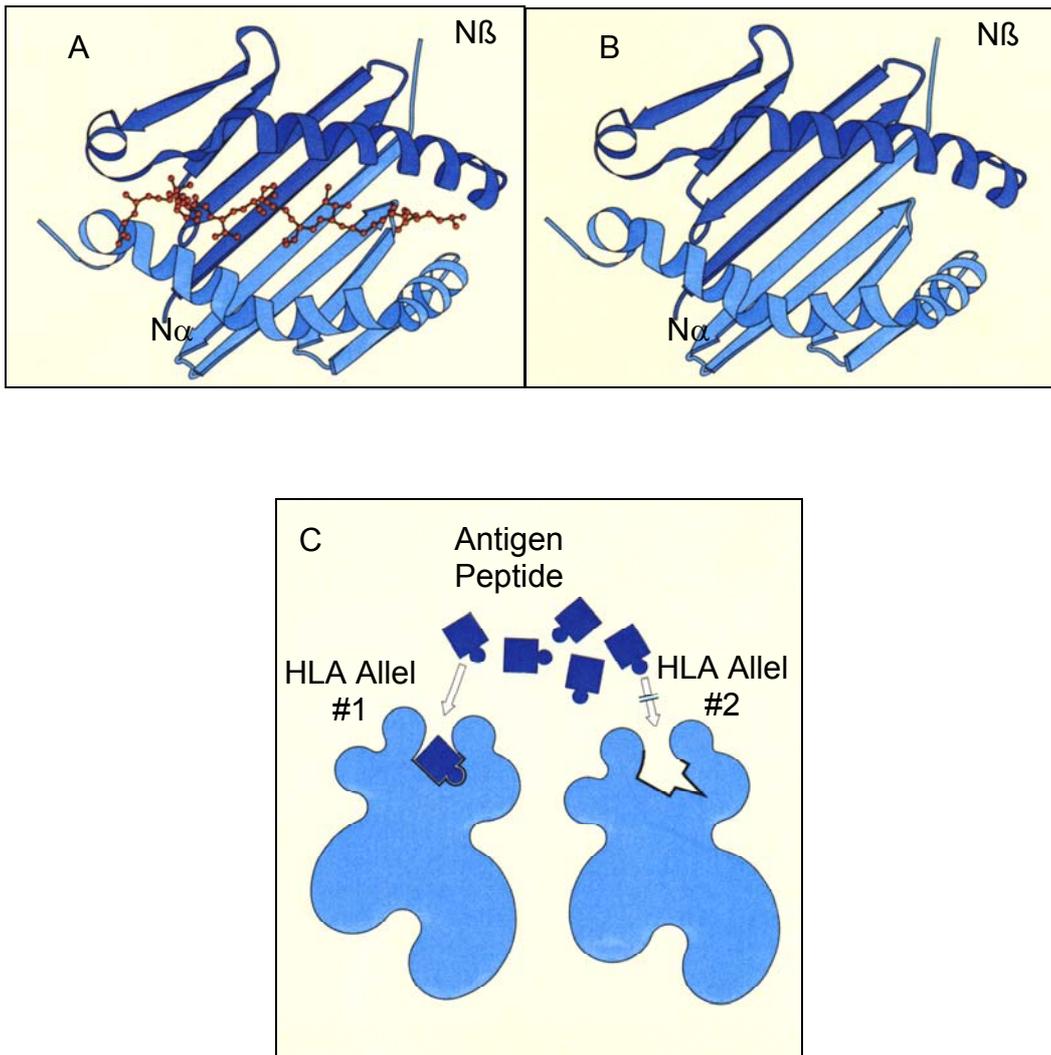


Abb. 1 Schematische Struktur der HLA-Moleküle am Beispiel des HLA-DRB1*04 Moleküls. Die zwei parallelen α -Helices bilden die „Wände“ der vermuteten Antigen-Bindungsstelle, während die β -Faltblattstrukturen den „Boden“ der Bindungsstelle bilden (A, Sicht von oben). Die HLA Klasse II Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette, die jeweils eine α -Helix und eine β -Faltblattstruktur enthalten. B zeigt die HLA-Struktur mit dem gebundenen Peptid in der Bindungsgrube. C. Schematische Darstellung zweier HLA-Allele mit unterschiedlichen Antigen-Bindungsstellen. Das entsprechende Antigenpeptid kann nur an das HLA-Allel #1, nicht an das HLA-Allel #2 binden. Die Unterschiede in den HLA-Bindungsdomänen ergeben sich aus dem Polymorphismus der Aminosäuresequenz und aus der resultierenden dreidimensionalen Konformation.

Demnach ist die Bindung eines arthritogenen Peptides oder womöglich mehrerer Peptide in der Initialphase der Erkrankung von Bedeutung. In dieser Phase spielen Antigenpräsentation und CD4⁺-T-Helferzellen eine entscheidende Rolle (Quale et al., 1992; Weyand et al., 1992; Friede et al., 1996). Es werden jedoch auch Infektionen vermutet, obwohl definierte Erreger - wie bei der Lyme-Arthritis oder bei reaktiven Arthritiden, nicht gefunden werden konnten. Vermutlich ist nicht ein einziger Erreger verantwortlich, sondern eine unglückliche Kaskade von für sich genommen harmlosen Infektionen, die jedoch im Zusammenspiel mit Autoimmunreaktionen schließlich den Durchbruch zu einer Autoimmunerkrankung hervorrufen. Ist die Erkrankung einmal eingetreten, wird sie in ihrem Verlauf durch bestimmte Zytokine oder durch Gene, die für eine starke Expression von Entzündungsmediatoren verantwortlich sind, modifiziert.

1.1 Das Synovium

Das Synovium, die Membran, die die Gelenke schützend umgibt, besteht aus zwei Schichten. Der gefäßlosen, ein- bis zweischichtigen Intima folgt die Subintima, die normalerweise relativ zellos ist, sie beinhaltet Gefäße, Fettzellen und Fibroblasten. Die lose verteilten Zellen der Intima werden in Typ A und Typ B Zellen eingeteilt. Die Typ A Zellen zeigen Merkmale von Gewebe-Makrophagen, sie exprimieren makrophagenspezifische Oberflächenmarker wie CD14 und CD 68, Fc-Rezeptoren und besitzen einen prominenten Golgi-Apparat sowie zahlreiche Lysosomen. Die Typ-B Zellen zeigen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie, das stark entwickelte endoplasmatische Retikulum verleiht ihnen eine prominente sekretorische Fähigkeit, sie zeigen weder Fc-Rezeptoren noch Makrophagenmarker auf ihrer Oberfläche. Immunhistochemisch konnte das Enzym Uridin Diphosphoglucose Dehydrogenase (UDPGD) in Typ B Synoviozyten nachgewiesen werden (Wilkinson et al., 1992; Pitsillides et al., 1993). Dieses Enzym wandelt die UDP-Glucose in UDP-Glucuronat um, eines der zwei Substrate, das von der Hyaluronsäure Synthase für die Zusammensetzung

des Hyaluronsäure Polymers benötigt wird. Hyaluronsäure ist Bestandteil der Synovialflüssigkeit, der ihr eine visköse Konsistenz verleiht.

1.2 Synovitis bei der RA

Bei der rheumatoiden Arthritis, sowie auch in anderen inflammatorischen Arthritiden, verändert sich das Synovium während der Krankheit dramatisch. In der Anfangsphase nimmt das Synovialgewebe an Umfang zu, eine vermehrte Angiogenese und Hyperplasie der Intima wird beobachtet. Die späte chronische Phase der Krankheit ist durch eine starke Hyperplasie der Intima, die über zehn Zellschichten aufweist, eine verstärkte Vaskularisierung sowie eine vermehrte Infiltration der Subintima mit T- und B-Zellen, Makrophagen und Plasma-Zellen, charakterisiert (Abb. 2).

In einem Merkmal unterscheidet sich die rheumatoide Arthritis von anderen inflammatorischen Arthropathien. Teile des Synoviums wachsen an der Grenzschicht zu Knorpel und Knochen aggressiv-invasiv. Dieses knorpel-destruktive Gewebe wird auch als Pannus bezeichnet und ist für die charakteristischen Erosionen, die in Gelenken von RA-Patienten beobachtet werden (Heijde et al., 1995), verantwortlich. Der Pannus besteht aus invasiv-wachsenden Zellen, die vermehrt Proto-Onkogene, Adhäsionsmoleküle und zerstörende Metalloproteinasen exprimieren (Krane et al, 1982, Zvaifler et al., 1994). Diese Zellen exprimieren sowohl phenotypische als auch funktionelle Merkmale der Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten und der Chondrozyten. Es ist noch unbekannt, ob es sich bei diesen Zellen um eine separate Zelllinie oder um entdifferenzierte Synoviozyten oder Chondrozyten handelt. T. Geiler et al. konnten zeigen, daß humanes Synovium von RA Patienten, das mit einem Stück Knorpel unter die Nierenkapsel von SCID Mäusen koimplantiert wurde, das aggressiv-invasive Wachstum beibehält und in den Knorpel einwächst (Geiler et al., 1994). Bemerkenswert daran war, dass die benachbarten Chondrozyten auch aktiviert zu scheitern schienen und ihrerseits die perizelluläre Matrix zerstörten. U. Müller-Ladner et al. konnten weiterhin nachweisen, dass in diesem Tiermodell synoviale

Fibroblasten auch in Abwesenheit von Entzündungs- bzw. Immunzellen ihre zerstörerische Eigenschaft beibehalten (Müller-Ladner et al., 1996). Die Tatsache, dass der Pannus ein invasives Verhalten trotz der Abwesenheit von Lymphozyten zeigt, lässt vermuten, dass die RA-Synoviozyten in irgendeiner Form aktiviert oder sich in einem Transformations-ähnlichen Zustand befinden.

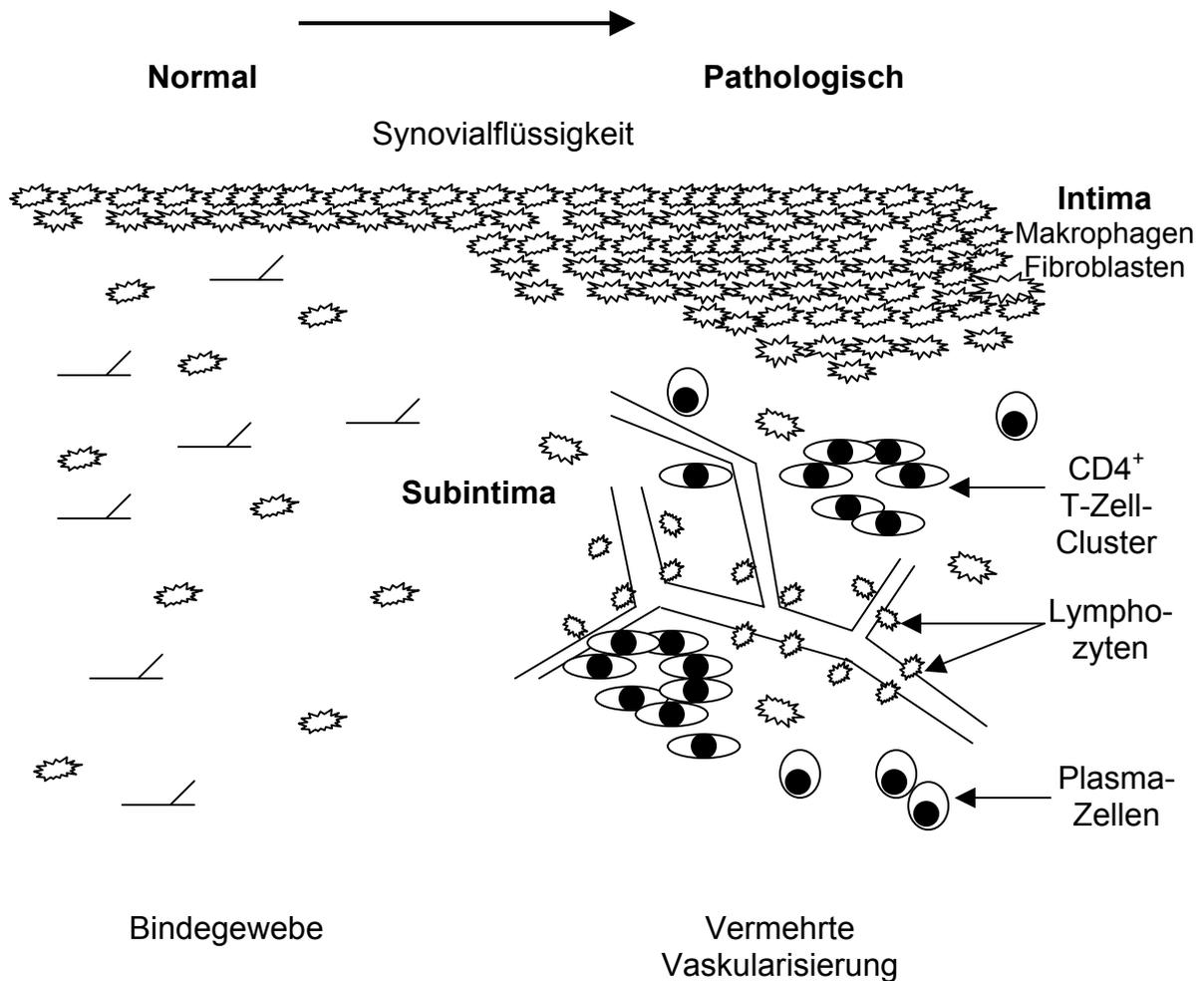


Abb. 2 Schematische Darstellung des vermuteten Ablaufs der Synovitis. Bei der rheumatoiden Arthritis verbreitet sich die normalerweise 1- bis 2-zellige Deckzellschicht stark. Es kommt zu einer Infiltration mit T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen, welche zu Plasma-Zellen reifen. Außerdem erfolgt eine massive Gefäßneubildung, es kommt zum Austritt von Lymphozyten ins Synovialgewebe, wobei die CD4⁺-T-Zellen Cluster bilden und die CD8⁺-T-Zellen diffus das Gewebe infiltrieren.

Abb. 2 beschreibt den vermuteten Ablauf der Synovitis: durch ein noch unbekanntes Antigen oder Antigene werden T-Zellen aktiviert, die ihrerseits Makrophagen aktivieren, was sich in einer starken Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (vor allem IL-1 und TNF- α) manifestiert. Dies setzt Entzündungsvorgänge in Gang, die wiederum zur Aktivierung der Fibroblasten führt, die ihrerseits durch die massive Produktion von Proteinase den umliegenden Knorpel zerstören.

Neben den aktivierten Fibroblasten, die an der Knorpeldestruktion maßgeblich beteiligt sind, führen aktivierte Osteoklasten zur Knochenresorption (Bromley et al., 1984; Gravallesse et al., 1998; Gravallesse et al., 2000). Ähnlich wurden TRAP- (Tartrat resistente saure Phosphatase) und Kalzitonin-Rezeptor positive, multinukleäre Zellen an der Oberfläche der Gelenkserosionen bei der Kollagen-induzierten Arthritis in der Maus gefunden (Suzuki et al., 1998; Romas et al., 2000). Verschiedene Zytokine und Faktoren, die vom synovialen Gewebe produziert werden, sind in der Lage die Differenzierung der Monozyten/Makrophagen in Richtung funktioneller Osteoklasten zu lenken.

1.3 Entzündungsmediatoren bei der RA

Zu den Entzündungsmediatoren, die bei der rheumatoiden Arthritis zu systemischen Reaktionen führen können, da sie via Blutbahn in zahlreiche Gewebe gelangen, zählen vor allem TNF α (Tumor Nekrose Faktor α) und IL-1 (Interleukin 1), weiterhin M-CSF (Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor), IL-17 (Interleukin-17) und RANKL (Rezeptor Aktivator des NF κ B-Ligands). Die Zytokine TNF α und IL-1 werden oft zusammen erwähnt bzw. berücksichtigt, weil sie auf synoviale Zellen ähnliche Wirkungen haben, obwohl sie an verschiedene Rezeptoren binden. Beide Zytokine rufen eine arthritische Erkrankung hervor (Chandrasekhar et al., 1995; Henderson et al., 1989). IL-1 ist ein 17 kDa Protein, das während der Antigenpräsentation hauptsächlich von Makrophagen produziert wird. Fibroblasten, Endothel-

zellen, T- und B-Lymphozyten sind jedoch auch in der Lage, IL-1 auszuschütten. IL-1 kommt in 2 Isoformen vor: IL-1 α und IL-1 β , wobei IL-1 α auch in einer membranständigen Form vorkommen kann, während IL-1 β ausschließlich sezerniert wird und somit die pathologisch wichtigere Form des IL-1 darstellt. Biochemische Untersuchungen ergaben, dass zwei unabhängige Gene, die eine 27%-ige Sequenzhomologie aufweisen für die zwei IL-1 Polypeptide kodieren. Beide Proteine binden an den gleichen IL-Rezeptor der Zellen. IL-1 ist ein hochwirksamer, interzellulärer Signalstoff, der sowohl auf Fibroblasten als auch auf Chondrozyten und Osteoklasten wirken kann.

TNF α wird von T-Zellen und Makrophagen produziert. Es wird als Homotrimer synthetisiert, an der Zelloberfläche exprimiert und schließlich sezerniert nach Abtrennung durch eine Matrix-Metalloproteinase. TNF α ist ein Hauptregulator der normalen Immunantwort aber auch der primäre Mediator bei entzündlichen Erkrankungen wie z.B. beim septischen Schock. TNF α und IL-1 sind potente Stimulatoren der Synoviozyten (Alvaro-Gracia et al., 1990, Dayer et al., 1986) und wirken normalerweise synergistisch, die Zugabe beider Faktoren zu den Synoviozyten resultiert in einer verstärkten Ausschüttung der Entzündungsmediatoren und Metalloproteinasen, die hauptverantwortlich sind für die Knorpeldestruktion.

Weitere Entzündungsmediatoren, die bei der RA eine wichtige Rolle spielen, sind Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8). IL-6 wird in großen Mengen sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch in Überständen von synovialen Fibroblasten gefunden. IL-6 ist hauptsächlich verantwortlich für die B-Zell Stimulation, es stellt aber auch ein Wachstumsfaktor für die T-Zellen dar und induziert die Produktion von Akute-Phasen Proteinen. IL-8 gehört zur Familie der Chemokine und trägt zur Migration einer hohen Anzahl an Neutrophilen ins Gelenk bei. IL-8 wurde ebenfalls in hohen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit gefunden. Die synovialen Gewebemakrophagen produzieren konstitutiv IL-8, während die synovialen Fibroblasten die Stimulation durch IL-1 und TNF α benötigen, um IL-8 auszuschütten. Der Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) wird ebenfalls in

hohen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit gefunden und wird konstitutiv von den Synoviozyten exprimiert. Die Makrophagenproliferation im Knochenmark wird vom M-CSF unterstützt, außerdem stimuliert es die monozytäre $\text{TNF}\alpha$ Produktion.

1.4 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind die Enzyme, die für die Knorpeldestruktion verantwortlich sind.

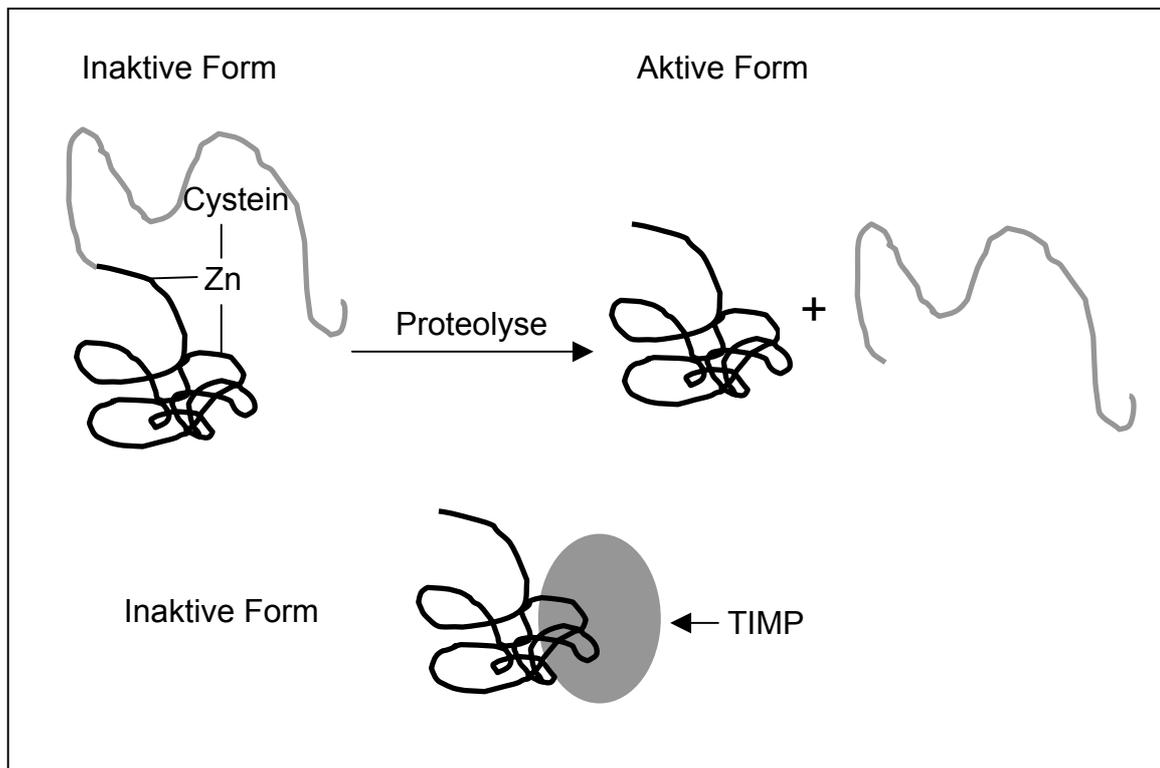


Abb. 3 Struktur der Metalloproteinasen. Schematische Darstellung der Aktivierung von Metalloproteinasen durch Proteolyse. Nach der Spaltung des Cysteinrestes, ist das Zink-Ion in der Lage die enzymatische, katalytische Reaktion in Gang zu setzen. Der Inhibitor der Metalloproteinasen (TIMP) kann an das aktive Enzym binden und seine Aktivität hemmen.

Diese werden generell als inaktive Proenzyme sezerniert, die erst einer proteolytischen Spaltung unterzogen werden müssen, um aktiviert zu werden (Abb. 3).

Die proteolytische Aktivität der Metalloproteinasen hängt von der Verfügbarkeit des Zink-Kations ab, das in der inaktiven Form an einem Cysteinrest gebunden ist. Zwei Metalloproteinasen, die hauptsächlich die Knorpeldestruktion bei der RA vermitteln, sind MMP-1 (Kollagenase-1, interstitielle Kollagenase) und MMP-3 (Stromelysin, Transin, Proteoglykanase). Die Kollagenase 1 (MMP-1) kann die trippel-helikalen Kollagene des Typs I, II, III, VII, VIII und X degradieren, Stromelysin (MMP-3) spaltet Proteoglykane, Laminin und Fibronectin sowie Kollagen Typ II, III, IV, V, IX. Stromelysin ist zusätzlich befähigt, latente pro-MMP's (pro-MMP-1, -7, -8, -9, -13, Nagase et al., 1997) zu aktivieren und gibt damit ein positives Feedback-Signal für die Knorpeldestruktion. Die Kombination beider Kollagenasen ist besonders effektiv, da sie die wichtigsten Strukturproteine innerhalb der Gelenke zerstören können. Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten signifikant mehr MMP-1 und -3 nachgewiesen werden konnte im Vergleich zu den OA-Patienten (Yoshihara et al., 2000, Cunnane et al., 2001).

Die Produktion der Metalloproteinasen wird durch Inhibitoren kontrolliert. Ihre Wirkung ist sowohl auf einen direkten Effekt durch die Bindung des aktiven Proteins als auch auf einen indirekten Effekt, indem sie die proteolytische Spaltung des membranständigen TNF α hemmen, zurück-zuführen. Zu der Familie der Metalloproteinasen Inhibitoren gehören 4 Mitglieder: TIMP-1, -2, -3 und -4. TIMP-1 inhibiert die Expression von MMP-1 und MMP-3. TIMP-3 ist hauptsächlich in der extrazellulären Matrix, TIMP-4 in den Gefäßen lokalisiert. Im Gegensatz zu den Metalloproteinasen scheint die Produktion der Metalloproteinasen-Inhibitoren im RA-Synovium ein ähnliches Expressionsmuster wie im OA-Synovium zu zeigen. Das Verhältnis zwischen den Inhibitoren und den entsprechenden Metalloproteinasen ist demnach niedriger bei RA als bei nichtinflammatorischen Arthritiden. Das TIMP-1 Gen wird konstitutiv exprimiert, während Stromelysin und Kollagenase in nur sehr

geringen Mengen produziert werden. Zytokine wie IL-1 und TNF α erhöhen dramatisch die Stromelysin und Kollagenase Expression, haben aber keinen relevanten Einfluß auf die TIMP-1 Expression. Im Gegensatz dazu erhöht IL-6 die TIMP-1 aber nicht die Stromelysin Expression. Demnach ist das Zytokin-Milieu wichtig für die Feinregulierung der Metalloproteinasen und deren Inhibitoren und somit für die Kontrolle der Matrixdestruktion.

1.5 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Expression von Genen kontrollieren und somit jede Zellentwicklung und Funktion regulieren. Die generelle Aktivität im Nukleus, die räumliche Organisation der Zielgene und das Vorhandensein spezifischer DNA-Bindungsstellen beeinflussen ihre Zellfunktion. Manche Transkriptionsfaktoren assoziieren durch exponierte Leucin-Reste, die als Leucin Zipper bezeichnet werden (Landschulz et al., 1988), mit anderen Proteinen bevor sie an die DNA binden. Diese Assoziation zu anderen Proteinen bestimmt die Stabilität ihrer DNA-Bindung bzw. ihre Affinität zu DNA-Bindungsstellen und moduliert ihre Phosphorylierung.

Zieht man Zellen eine Zeit lang unter Serumentzug und appliziert dann Serum, wird in den ersten 30 Minuten die Expression von zahlreichen Genen induziert. Manche sind schon nach 5-10 Min. detektierbar und werden aus diesem Grund als „immediate early genes“ bezeichnet. Diese rasche Induktion erfolgt durch das Fehlen einer de novo Protein-Synthese. Sogar nach Zugabe von Cycloheximid, ein Gift, das die Ribosomen blockiert, kann die Transkription der „immediate early genes“ immer noch induziert werden.

Es gibt induzierbare und konstitutive Transkriptionsfaktoren, die auch ohne externe Stimuli an regulatorische DNA-Stellen binden. Die Transkriptionsfaktoren werden außerdem in zwei weitere Familien eingeteilt: in die generellen Transkriptionsfaktoren und in die Promotor/Enhancer Transkriptionsfaktoren. Die generellen Transkriptionsfaktoren werden konstitutiv exprimiert, binden mit der RNA-Polymerase II an die TATA Box, wo die

Transkription startet. Promotor/Enhancer Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA-Stellen, die sich näher oder weiter weg von der TATA-Box befinden können.

Transkriptionsfaktoren agieren nicht nur als Aktivatoren, sondern auch als Repressoren, indem sie DNA-Stellen besetzen ohne die generellen Transkriptionsfaktoren zu aktivieren oder einfach indem sie andere Faktoren an der DNA-Bindung verhindern. Ein Wechsel vom transkriptionalen Aktivator zum Repressor kann auch durch alternatives Splicing oder posttranslationelle Modifikationen erfolgen.

Die Transkription wird durch ein Multiprotein Komplex (TFIID), der sich an die TATA Box anlagert, initiiert, indem die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II mit diesem Komplex interagiert. Der TFIID Initiations-Komplex besteht aus dem TATA bindendem Protein und aus wenigstens acht TBP-assoziierten Proteinen. Durch die Interaktion der konstitutiven und/oder der induzierbaren Transkriptionsfaktoren mit dem TATA bindendem Protein oder mit einem der assoziierten Proteinen, wird der Initiationskomplex aktiviert.

Transkriptionsfaktoren können auch die Elongation des primären Transkripts durch das Heranziehen von Elongationsfaktoren, die an den Komplex assoziiert werden, regulieren (Yankulov et al., 1994). All diese Schritte können durch negative Regulatoren antagonisiert werden. Neben den Transkriptionsfaktoren spielen die Histonproteine eine wichtige Rolle beim Aufbau der räumlichen Organisation, die für die Gentranskription notwendig ist (Wolffe et al., 1994).

1.5.1 Der Transkriptionsfaktor Egr-1

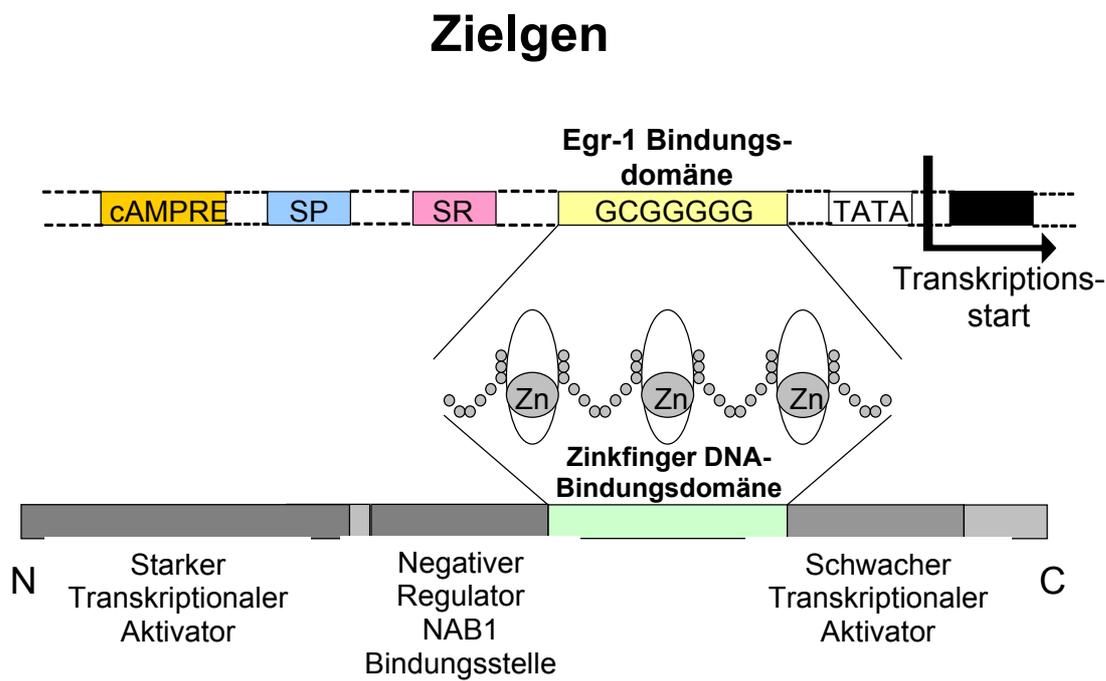
Das für das Zinkfingerprotein Krox-24 kodierende Gen wurde erstmals aus Ratten-Zellen isoliert und als *nerve growth factor inducible gene (A)* (NGFI-A) bezeichnet (Milbrandt et al., 1987). NGFI-A ist homolog zum murinen *tis8* (Lim et al., 1987), *zif 268* (Christy et al., 1988) zum humanen *Egr-1* (*early growth response gene 1*, Sukhatme et al., 1988) und zum *zenk* Protein, das im Vogel identifiziert wurde (Nastiuk et al., 1994). Krox-24 besitzt 3

Zinkfingerdomänen für die sequenz-spezifische DNA-Bindung. In diesen Regionen beträgt die Homologie zwischen dem Ratten-spezifischen Krox-24 und dem murinen Egr-1 98%. Das humane Egr-1 besteht aus 533 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 57 KD, das aber aufgrund der Glycin-reichen Domänen im SDS-Gel auf der Höhe von 80 KD detektierbar wird (Cao et al., 1990; Waters et al., 1990). Es ist auf dem Chromosom 5 in einer Region lokalisiert (5q23-31), die bei Patienten mit 5q-myeloischen Erkrankungen häufig deletiert ist (Sukhatme et al., 1988).

Der Krox-24 Promotor enthält fünf (humane, Sakamoto et al., 1991) oder vier (murine) Serum regulierte Elemente (SRE), ein Krox reguliertes Element (KRE), ein CRE (cyklisches AMP reguliertes) -ähnliches und ein AP-1 ähnliches Element (Christy et al., 1988; DeFranco et al., 1993). Krox-24 kann die eigene Transkription durch Bindung mit hoher Affinität an das KRE im Promotor autoregulieren. Die SRE stellen starke Regulatoren der Krox-24 Aktivität dar. Die Besetzung eines SRE ist ausreichend für die maximale Expression (McMahon et al., 1995). Die induzierbare Egr-1 Genexpression wird durch verschiedene Untergruppen der MAP-(mitogen activated protein) Kinasen, einschließlich der extrazellulären signal-regulierten Kinase (ERK) und der c-Jun amino-terminalen Kinase (JNK) sowie durch p38 vermittelt. Einmal aktiviert, führen diese Kinasen zu Interaktionen zwischen den ternären Komplex Faktoren (TCF) und den Serum Response Faktoren (SRF), die durch die Bindung an den SRE innerhalb des Promotors, die Egr-1 Transkription aktivieren (Treisman et al., 1995; Lim et al., 1998).

Die NGFI-A bindenden Proteine 1 und 2 (NAB1 und NAB2) unterdrücken die Egr-1 Aktivität. NAB1 bindet an eine inhibitorische Domäne von Egr-1, R1 genannt, die 5' von der Zinkfingerbindungsdomäne lokalisiert ist (Russo et al., 1995, Swirnoff et al., 1998). Die Deletion der R1 Domäne resultiert in einem starken Anstieg der Egr-1 Aktivität, während eine Überexpression von NAB1 zu einem starken Rückgang der transkriptionalen Aktivität führt. Das verwandte Protein NAB2 zeigt eine hohe Homologie zu NAB1 (Svaren et al., 1996) und funktioniert auch auf ähnliche Weise. Die zwei Proteine unterscheiden sich jedoch darin, dass NAB1 konstitutiv in fast allen Zellen

exprimiert wird, während NAB2 rasch und transient von denselben Stimuli, die auch Egr-1 aktivieren, induziert wird und außerdem stärker Gewebe-selektiv zu sein scheint. Die Expression des NAB2 Genes wird sogar durch Egr-1 kontrolliert (Ehrengruber et al., 2000), was darauf hinweist, dass Egr-1 seine eigene biologische Aktivität durch eine negative Feedback-Schleife reguliert.



Egr-1 Protein

Abb. 4 Schematische Darstellung des Egr-1 Proteins mit der Zinkfinger DNA-Bindungsdomäne zwischen AS 332-416. Die transkriptionale Aktivierungszone befindet sich in der amino-terminalen Region zwischen AS 1-281. Die Repressordomäne, an die die Proteine NAB1 und NAB2 binden, ist zwischen AS 281-314 positioniert. Am carboxy-terminalen Ende befindet sich ein schwacher transkriptionaler Aktivator. Mit Hilfe der Zinkfingerdomäne bindet das Egr-1 Protein an spezifische DNA-Stellen mit der Sequenz: GCG(G/T)GGGCG und setzt auf dieser Weise die Transkription von Zielgenen in Gang.

Andererseits kann das Egr-1 Protein auch an die Egr-1 Bindungsstelle (EBS) im eigenen Promotor binden und auf dieser Weise die eigene Transkription unterdrücken (Cao et al., 1993).

Welchem Mechanismus die Repression durch NAB1 und NAB2 unterliegt, ist noch nicht bekannt, es wird jedoch spekuliert, dass die Interaktion der Repressor-Proteine mit Egr-1 dazu führt, dass die Bindung zu den Koaktivatoren CBP (CREB bindendes Protein) und p300 gestört ist. Diese Interaktionen mit den Koaktivatoren sind relativ schwach im Vergleich zu denen mit sequenz-spezifischen Transkriptions-faktoren, aus diesem Grund bleibt ihre Rolle bei der Egr-1 vermittelten Genexpression eher unklar (Silverman et al., 1998). Egr-1 besitzt eine DNA-Bindungsdomäne, die aus drei Zinkfingern besteht (s. Abb. 4). Diese sind zwischen den Aminosäuren 332 und 416 lokalisiert. Mit Hilfe der Zinkfinger bindet Egr-1 spezifisch an DNA Sequenzen, die einen speziellen Konsensus (GCG(C/G)GGGCG und GCG(G/T)GGGC, Swirnoff et al., 1995) aufweisen. Eine starke transkriptionale Aktivierungszone wurde innerhalb der amino-terminalen Region des Proteins zwischen der Aminosäure 1 und 281 identifiziert (Gashler et al., 1995) während das Aminosäuresegment 281-314 eher repressive Effekte zeigt, da es die Bindungsstelle für die Repressoren NAB1 und NAB2 beinhaltet (Molnar et al., 1994, Svaren et al., 1996). Hinter der Repressordomäne wurde die für den Kerntransport notwendige Domäne identifiziert (AS 315-330), am carboxy-terminalen Ende befindet sich ein schwacher transkriptionaler Aktivator (Gashler et al., 1993).

1.5.2 Egr-1 regulierte Gene

Die Expression von Wachstumsfaktoren wie der PDGF-A Kette (platelet derived growth factor A) (Khachigian *et al.*, 1995; Silverman *et al.*, 1997) sowie der PDGF-B Kette (Khachigian *et al.*, 1996), des b-FGF (basic fibroblast growth factor) (Biesiada *et al.*, 1996) und des TGF- β (tissue growth factor, Kim *et al.*, 1989) werden von Egr-1 induziert. Weiterhin können Gene wie TNF α (Yao *et al.*, 1997), IL-2 (Skerka *et al.*, 1995), ICAM-1 (intracellular

adhesion molecule 1, Maltzman *et al.*, 1996a) M-CSF (macrophage colony-stimulating factor, Harrington *et al.*, 1991) und Superoxiddismutase (SOD1) von Egr-1 reguliert werden. All diese Gene enthalten eine oder mehrere Egr-1 Konsensus Bindungsstellen innerhalb ihrer Promotoren. Da einige dieser Genprodukte auch ihrerseits die Expression von Egr-1 stimulieren, sind autokrine und parakrine Schleifen möglich.

1.5.3 Die Egr-1 Rolle bei der Reifung von B- und T-Zellen

Egr-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung und Differenzierung der frühen B-Zellen (Dinkel *et al.*, 1997). Die Antigenerkennung durch den B-Zell-Antigen-Rezeptor (BCR) führt zur Aktivierung von immediate-early Genen, unter anderem von Egr-1 (Seyfert *et al.*, 1990; Mittelstadt *et al.*, 1993). Dinkel *et al.* konnten zeigen, dass nach stabiler Transfektion verschiedener B-Zelllinien mit Egr-1 die Expression von CD44, ein Protein das im Prozess der Lymphozytenmigration involviert ist, hochreguliert wird. Dagegen ist sowohl die CD23 (niedrige Affinität IgE Rezeptor) als auch die Fas (auch bekannt als CD95 oder Apo-1) Expression in den gleichen Zellen reprimiert worden. Durch die Inhibition der Fas Expression durch Egr-1 - nicht aber durch andere Familienmitglieder wie Egr-2 und Egr-3 - die die Fas Expression induzieren (Mittelstadt *et al.*, 1998, Mittelstadt *et al.*, 1999), könnten B-Zellen vor der Fas/Fas-Ligand vermittelten Apoptose geschützt sein. Dinkel *et al.*, (1998) berichten außerdem, dass Egr-1 zwei Schritte in der B-Zell Reifung unterstützt, einerseits die Progression zur prä-B-Zelle und andererseits die Progression zum reifen B-Zell Stadium (Dinkel *et al.*, 1998).

Auch an der Aktivierung der T-Zell Funktion ist Egr-1 beteiligt, da es nach Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) rasch exprimiert wird (Perez-Castillo *et al.*, 1993). Untersuchungen an transgenen Mäusen, die Egr-1 in unreifen Thymozyten überexprimierten, zeigten, dass Egr-1 an der frühen Thymozytenreifung beteiligt ist (Myazaki, 1997). Dabei umgehen die doppelt negativen Thymozyten ($CD4^-/CD8^-$) unter dem Einfluß von Egr-1 das $CD25^+CD44^-$ Reifestadium und reifen zu $CD8$ einzel-positiven (ISP) Zellen,

was zu einer Beschleunigung der Thymozytenreifung führt. Weil Nguyen et al. (1993) und Krishnaraju et al., (1995) dem Transkriptionsfaktor Egr-1 außerdem eine wichtige Rolle bei der Makrophagen Differenzierung aus den hämato-poetischen Zellen zuschreiben, scheint Egr-1 bei der Differenzierung von 3 wichtigen hämatopoetischen Zelllinien beteiligt zu sein.

1.5.4 Egr-1 Knock-out Mäuse

Egr-1 defiziente Mäuse sind phenotypisch normal, der einzige Defekt, der bei den weiblichen Knock-out Mäusen beobachtet wurde, war die Infertilität dieser Tiere (Lee et al., 1996a). Dies hing mit der gestörten Synthese des luteinisierenden Hormons β (LH- β) zusammen, für dessen Regulierung der Transkriptionsfaktor Egr-1 offensichtlich unabdingbar ist. Aus den Studien mit den Egr-1 Knock-out Mäusen ging hervor, dass die Gene für das luteinisierende Hormon β , den Gewebe Faktor (TF) und für Apoprotein A-I, die einzigen Gene sind, deren Expression ohne Egr-1 nicht nachweisbar sind (Lee et al., 1995). Lee et al. (1996b) konnten auch zeigen, dass in den Egr-1 Knock-out Mäusen die Reifung von Monozyten bzw. Makrophagen unbeeinträchtigt ist und die Makrophagen funktionell aktiv sind. Dieses Ergebnis war unerwartet, da Nguyen et al (1993) aus Differentierungsexperimenten nach Elektroporation mit Egr-1 anti-sense Oligonukleotiden folgerte, dass Egr-1 für die Differenzierung der Makrophagen essentiell sei.

1.5.5 Transkriptionsfaktoren und ihre Rolle bei der RA

Die physiologische Regulation der DNA Transkription ist essentiell für die Homöostase. Nukleäre Transkriptionsfaktoren wie das Aktivator-Protein 1 (AP-1) und der nukleäre Faktor κ B (NF κ B) regulieren die Intensität der Gentranskription und werden selber von zahlreichen intrazellulären Signalmechanismen moduliert. NF κ B ist ein Heterodimer bestehend aus NF κ B1 und RelA. Das inaktive NF κ B befindet sich komplexiert mit seinem inhibitorischen Protein I κ B im Zytoplasma. Nach der Spaltung des Inhibitors

I κ B, transloziert NF κ B in den Kern und bindet dort an die NF κ B Motive der Zielgene. Die Anzahl der bekannten Gene, die durch NF κ B reguliert werden, wächst ständig. Diese Gene schließen Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, zelluläre Liganden und Adhäsionsmoleküle ein. Viele dieser Gene spielen bei der Pathogenese der RA eine entscheidende Rolle.

Werden synoviale Fibroblasten mit TNF α induziert, führt dies zu einer gesteigerten Proliferation mit einer Abnahme der Kontaktinhibition der Zellen und gleichzeitig zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors Egr-1 (Grimbacher et al., 1998). Ähnlich stimuliert TNF α die NF κ B-Aktivität, indem es den NF κ B-Suppressor I κ B degradiert und den Stress-Kinase Mechanismus in Gang setzt (Fujisawa et al., 1996). Weiterhin können proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6 die DNA-Bindungsaktivität des Hitze-Schock Transkriptionsfaktors 1 erhöhen und die Expression des Hitze-Schock Proteins 70 in synovialen Fibroblasten aktivieren (Schett et al., 1998). Eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität des AP-1 Proteins wurde im Synovialgewebe von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten gefunden (Asahara et al., 1997). Wakisaka et al. konnte die Anwesenheit einiger Transkriptionsfaktoren einschließlich NF κ B, AP-1, CREB und OCT-1 im Synovialgewebe von RA-Patienten nachweisen (1998). Weiterhin demonstrierten die Autoren, dass IL-1 β die Translokation dieser Transkriptionsfaktoren in den Nukleus auslöst.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren ist grundlegend für den Phänotyp der Zellen. Induzierbare Transkriptionsfaktoren sind verantwortlich für die Expression vieler Gene, die in inflammatorischen Prozessen involviert sind u.a. Zytokine, matrix-degradierende Enzyme und Adhäsionsmoleküle. Möglicherweise spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.

Vorarbeiten von Aicher et al. (1994) und Grimbacher et al. (1998) zeigten, daß die Egr-1 Expression in Synoviozyten von RA Patienten erhöht ist. Diese Aktivierung war nicht mit einer gesteigerten Proliferation der RA-Fibroblasten assoziiert, im Gegenteil, die RA-Fibroblasten proliferierten viel langsamer als autologe Hautfibroblasten. Egr-1 Promotoruntersuchungen in Synoviozyten von RA Patienten zeigten, dass die Bindung der Serum regulierten Elemente zu einer starken Aktivierung der Egr-1 Expression führt, während die cAMP regulierte Elemente sowie die NF κ B (Nuklear Faktor kappa B) Bindungsstellen innerhalb des Promotors inhibitorische Elemente darstellen (Aicher et al., 1999).

Über die Egr-1 abhängige Genregulation bzw. über seine Rolle bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ist zur Zeit sehr wenig bekannt. Nachdem nun gezeigt worden war, dass dieser Transkriptionsfaktor in Synoviozyten von RA-Patienten überexprimiert wird und dessen Promotor näher untersucht worden war, soll mit den Experimenten aus der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung der Egr-1 gesteuerten zellulären Funktionen bei der rheumatoiden Arthritis erforscht werden. Zu diesem Zweck werden immortalisierte synoviale Fibroblasten von einem RA-Patient mit dem Maus-Egr-1 Gen stabil transfiziert. Mit Hilfe einer differentiellen Genexpressionsanalyse (RAP-PCR) sollen Gene ausfindig gemacht werden, die in den entsprechenden Klonen differentiell exprimiert werden. Die Expression der entsprechenden Genen soll auf Transkript- und Proteinebene näher untersucht werden. Dazu werden Änderungen auf

Transkriptebene quantitativ mit Hilfe der Echtzeit-PCR erfasst. Unterschiede auf Proteinebene lassen sich mit Western Blot/ELISA nachweisen. Um mögliche Artefakte im immortalisierten System auszuschließen, soll das Maus-Egr-1 auch in anderen Zelllinien transient zur Überexpression gebracht werden, um auch in diesen Expressionssystemen mögliche Egr-1 regulierte Gene untersuchen zu können. Für diese Experimente wird die Fibrosarkomzelllinie HT1080 sowie das Ecdyson-induzierbare System eingesetzt. Um einen besonders hohen Reinheitsgrad der transient transfizierten Zellen zu erzielen, werden die transfizierten Zellen aus der gemischten Zellpopulation herausselektiert, damit die Effekte der Transfektion nicht durch die zahlenmäßig überlegenen nicht transfizierten Zellen überdeckt werden. Die transient transfizierten Zellen werden dann ebenfalls auf Transkript- und Proteinebene näher charakterisiert. Zusätzliche Promotoruntersuchungen sollen dazu beitragen, den Regulationsmechanismus, über den Egr-1 diese Gene moduliert, aufzuklären. Die Aufklärung der detaillierten Signaltransduktionswegen, die spezifisch sind für das Krankheitsbild der RA, könnte in der Zukunft dazu führen, dass neue Therapieformen für die RA entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in 10%-igem DMEM (Gibco BRL Life Technologies) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das fötale Kälberserum (BioWhittaker) wurde für eine halbe Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert, für eine weitere halbe Stunde mit Aktiv-Kohle geschüttelt, anschließend steril filtriert und Aliquots von 50 ml bis zum Gebrauch bei –20°C eingefroren. Als Medienzusätze wurden Vitamine, Fungizone und Penicillin-Streptomycin in einer Endkonzentration von 200 U/ml bzw. 200 µg/ml (Gibco BRL Life Technologies) verwendet. Die Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt, indem sie nach dem Waschen mit PBS mit Hilfe von 0,25% Trypsin (Gibco BRL Life Technologies) vom Boden der Kulturflasche abgelöst wurden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen bei 1500 U/min, wurde das Zellpellet 1:5 bis 1:6 verdünnt und in eine frische Kulturflasche überführt. Für die Selektion von Zellen wurden Geneticin (G-418 Sulphate (Gibco BRL Life Technologies) und Zeocin (Invitrogen) verwendet. Für längere Aufbewahrungszeiten wurden die Zellen im speziellen Einfriermedium bestehend aus DMEM ohne Zusätze/ 20% FCS/ 10% DMSO in Flüssig-Stickstoff eingefroren.

2.1.1 Zelllinien

Folgende Zellen bzw. Zelllinien wurden verwendet: native synoviale Fibroblasten, immortalisierte synoviale Fibroblasten, stabil mit Egr-1 bzw. mit dem leeren Vektor transfizierte immortalisierte Fibroblasten, humane Fibrosarkom-Zellen (HT1080, ECACC, Salisbury, UK), humane embryonale Nierenzellen (EcR 293, Invitrogen).

2.2 Herstellung des LB-Mediums/der Agar-Platten

10 g Trypton/Pepton 140, 5 g Hefeextrakt (Gibco BRL Life Technologies) und 10 g NaCl wurden in Aqua dest. gelöst, mit 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Selektionsmedium wurde durch die Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) kurz vor dem Gebrauch hergestellt. Für die

Zubereitung der Agar-Platten wurden 15 g Agar/1L hinzugefügt, in der Mikrowelle erhitzt bis sich der Agar gelöst hatte und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurde Ampicillin (100 µg/ml) hinzugefügt und in sterile Petri-Schalen gegossen. Die gebrauchsfertigen Agar-Platten wurden für 2 bis höchstens 3 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1 Transformation von kompetenten Bakterien

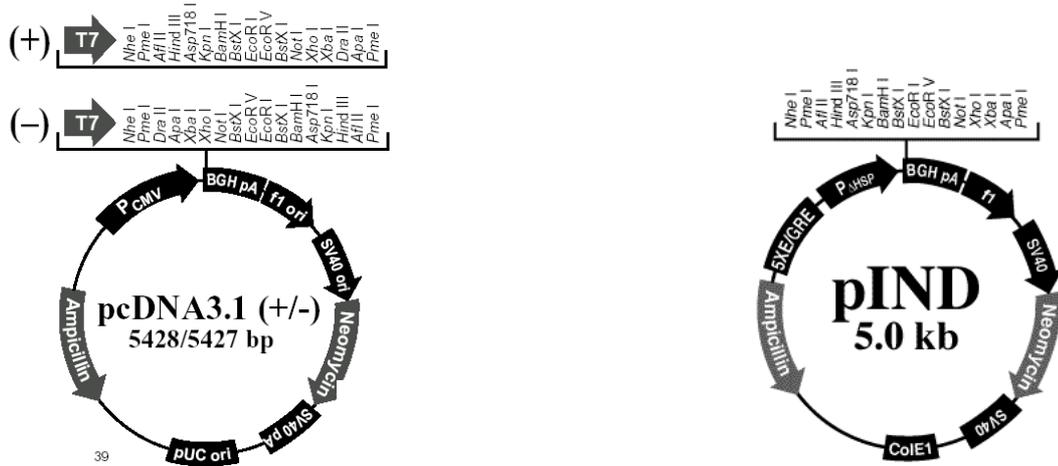
100 µl Aliquots von XL1 Blue MRF' ultrakompetenten (Stratagene) sowie DH5α kompetenten E.coli Bakterien (Library efficiency^R DH5^R, Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut. Zu den XL1 Blue MRF' ultrakompetenten Zellen wurde 1 µl Mercaptoethanol und 2 µl Plasmid hinzugefügt und 30 min. auf Eis inkubiert. Im Falle der DH5α Bakterien war nach Firmenangaben die Zugabe von Mercaptoethanol nicht erforderlich. Es folgte der Hitzeschock für 90 sec. (45 sec. für DH5α) im Wasserbad bei 42°C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Nach der Zugabe von 800 µl LB-Medium ohne Ampicillin ließ man die Bakterien entweder im Bakterien-schüttler oder im Thermoblock bei 37°C für 1 h schütteln. Die Bakterien-suspensionen wurden in der gekühlten Zentrifuge bei 6000 g für 5 Min. abzentrifugiert, das Pellet in 50-100 µl LB-Medium+Ampicillin. (50 µg/ml) aufgenommen und ein kleines Aliquot von 10-20 µl anschließend auf die Agar-Platte ausplattiert. Die Platten wurden für 16-18 h bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Mini- und Maxi-Präparationen

Von den ausplattierten Agar-Platten wurden einzelne Kolonien gepickt, in 15 ml Polypropylen Röhrchen in 2,5 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) aufgenommen und für 16-18 h bei 37°C im Bakterien-schüttler (225 U/Min.) inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation auf Eis für 20 min., wurden nach Einfrieren von kleinen Aliquots (1:1 mit Glycerin, -70°C), die Bakterien-suspensionen für 15 Min. bei 6000 g in der gekühlten Beckman Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterien-pellet in Lysepuffer aufgenommen. In den folgenden Schritten wurde die Plasmid-DNA nach Kitanleitung (Qiaprep^R Spin Miniprep Kit, Qiagen) extrahiert. Nach

entsprechenden Testverdaus der Plasmid-DNAs mit den dazu benötigten Restriktionsenzymen, wurde der geeignete Klon ausgesucht. 100 ml LB-Medium+Ampicillin (50 µg/ml) wurde mit 20-50 µl dieser Bakteriensuspension für die Maxi-Präparationen angeimpft. Nach einer Inkubation von 16-18 h bei 37°C im Bakterenschüttler (225 U/Min.), wurden die Bakterien für 20 min. auf Eis gekühlt. Aufgrund dessen, dass die aus den Maxi-Präparationen extrahierte DNA meistens anschließend für Zell-Transfektionen verwendet wurde, wurde für diesen Zweck der Endotoxin-freie EndoFree^R Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde durch weitere Testverdaus überprüft, anschließend sequenziert und kurz vor dem Einsatz für die Transfektionen für 15 min. bei 65°C erhitzt.

2.2.3 Verwendete Vektoren



Invitrogen

Multiple Klonierungsstelle pcDNA3.1(+)

enhancer region (3' end)

689 CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCC

749 TAACAACCTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGCTATATAT

3' end of hCMV putative transcriptional start

809 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC

T7 promoter/primer binding site

869 GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC

BamHI BstX I* EcoR I EcoR V BstX I* Not I Xho I

929 GGATCCACTA GTCCAGTGTG GTGGAATTCT GCAGATATCC AGCACAGTGG CGGCCGCTCG

Xba I Apa I Pme I pcDNA3.1/BGH reverse priming site

989 AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC

1049 CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCGTGCCTT CTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG

BGH poly (A) site

1109 TCCTTTCCTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT

Multiple Klonierungsstelle pcDNA3.1(-)

enhancer region (3' end)

689 CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCC

749 TAACAACCTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGCTATATAT

3' end of hCMV putative transcriptional start

809 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC

T7 promoter/primer binding site

869 GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC GGGCCCTCTA GACTCGAGCG

BstX I* EcoR V EcoR I BstX I* BamHI

929 GCCGCCACTG TGCTGGATAT CTGCAGAAAT CCACCACACT GGACTAGTGG ATCCGAGCTC

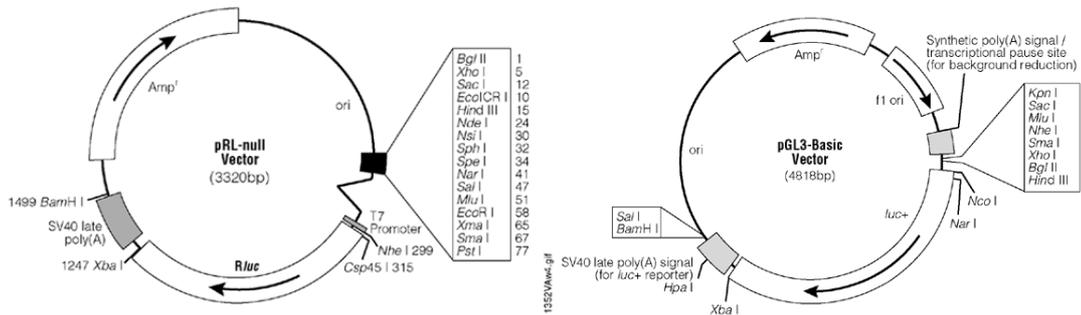
Asp718 I Kpn I Hind III Afl II Pme I pcDNA3.1/BGH reverse priming site

989 GGTACCAAGC TTAAGTTTAA ACCCGTATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCAGCC

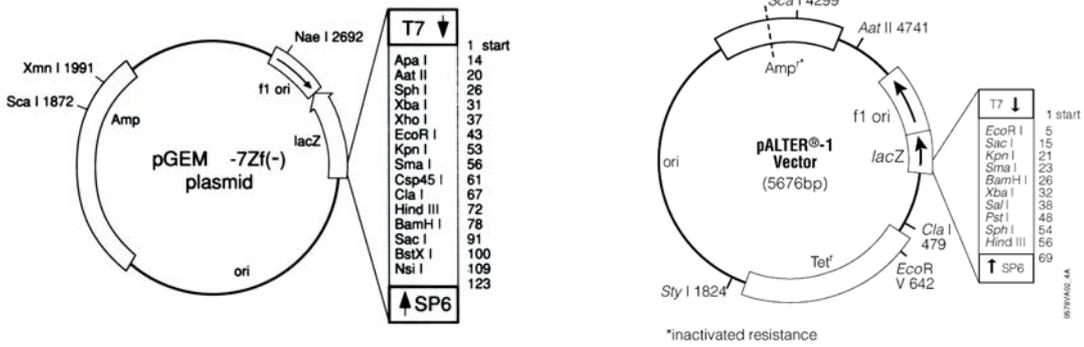
1049 ATCTGTTGTT TGCCCCTCC CCGTGCCTT CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT

BGH poly (A) site

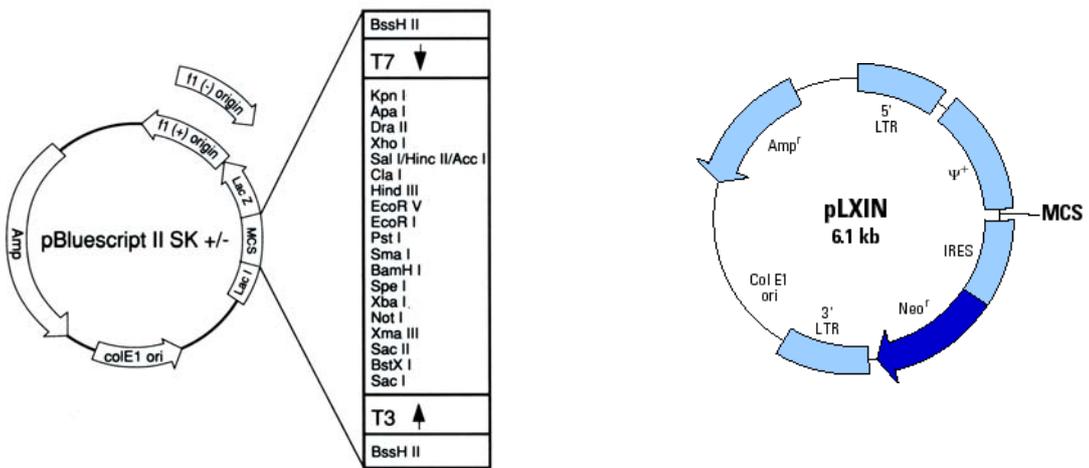
1109 CCTTTCCTAA TAAAATGAGG AAATTGCATC



Promega



Promega



Stratagene

Clontech

2.3 Prinzip der Transfektion mittels kationischer liposomaler Reagenzien

Liposomale Transfektionsreagenzien bestehen aus positiv geladenen Lipiden mit einem wässrigen Zentrum und mit einem Durchmesser von 100-400 nm.

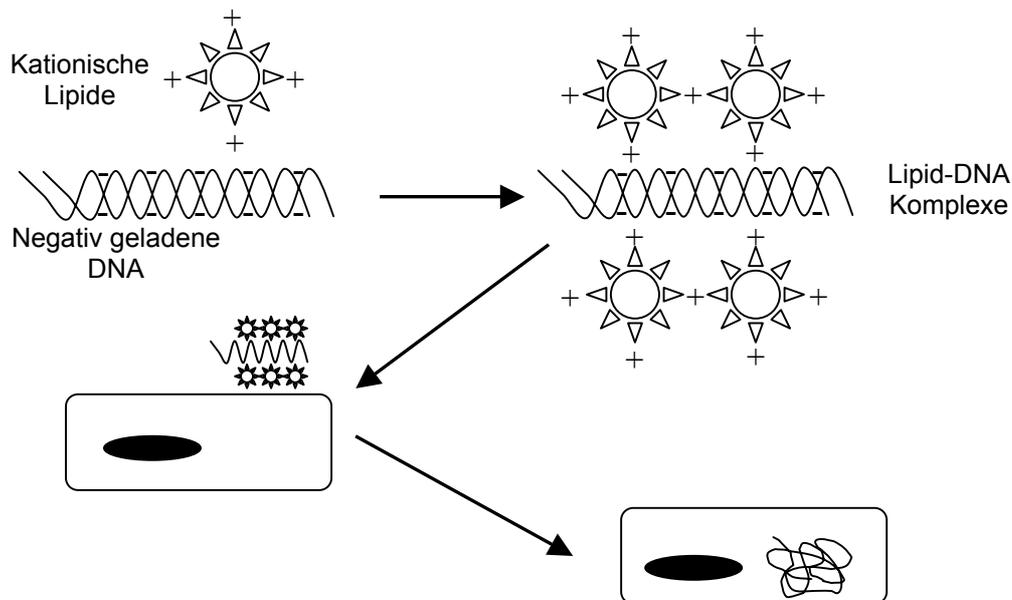


Abb. 5 Kationische Lipid-Reagenzien vermittelte Transfektion

Die kationischen Lipide interagieren spontan mit der negativ geladenen DNA oder RNA, die hinzugegeben wird und bildet mit dieser Komplexe. Die Komplexe wiederum interagieren mit der negativ geladenen Zellmembran und fördern das Makromolekül durch die Membran. Von hier aus gelangt die DNA in den Nukleus, wo sie transkribiert und anschließend im Zytoplasma translatiert wird.

2.4 Immortalisierung synovialer Fibroblasten

Synoviale Fibroblasten wurden aus der Synovialis eines Rheuma-Patienten gewonnen und mit dem großen SV40 T-Antigen, das in das pGEM 7 zf Plasmid subcloniert wurde, transfiziert. Dafür wurde das von einer EcoR V

und BamH I Restriktionsstelle flankierten SV40 T-Antigen in das Sma I/BamH I geschnittene pGEM 7 zf Plasmid hineinligiert. Das große SV40 T-Antigen bindet an die Proteinprodukte zweier wichtiger Tumorsuppressor-Gene (Rb-Protein und p53) der Wirtszelle und setzen sie außer Gefecht. Dadurch wird die „Notbremse“ der Zellvermehrung deaktiviert, die Zelle teilt sich. Diese zwei Tumorsuppressorgene sind an der Entstehung vieler Krebstypen beteiligt.

Am Tag vor der Transfektion wurden in 6-Loch Platten 2×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Für die Transfektion wurde ein liposomales Transfektions-Reagenz verwendet (DOTAP, Roche). Eine DOTAP/DNA Präparation wurde hergestellt, indem $5 \mu\text{g}$ der mit Sca I linearisierte DNA (zu einem Endvolumen von $50 \mu\text{l}$ mit HBS-Puffer verdünnt) mit $30 \mu\text{l}$ DOTAP (zu einem Endvolumen von $100 \mu\text{l}$ mit HBS-Puffer verdünnt) gemischt und 15-20 Minuten bei RT inkubiert wurden. Das serumhaltige Medium (10%) aus den am Tag davor angesetzten 6-well Platten wurde durch serumreduziertes DMEM (0,5%) ersetzt und die DOTAP/DNA Präparation vorsichtig hineinpipettiert. Nach einer 5-6 stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Transfektionsmedium wieder durch serumhaltiges Kulturmedium ersetzt. Nachdem die Zellen 5-8mal passagiert wurden, waren z.T. Zellhaufen sichtbar, die schneller proliferierten als andere. Durch weiteres, häufiges Passagieren der Zellen, wurden die schneller proliferierenden Zellen herausselektioniert, sodaß man nach 10-15 Passagen eine nahezu uniforme Population von SV40-transformierten Zellen erhielt. Diese zeigten Veränderungen, nicht nur bezogen auf das Wachstum, sondern auch auf die Morphologie: die Zellen wurden eher klein und wiesen nicht mehr die langen Zellfortsätze, die typisch sind für Fibroblasten, auf.

2.5 Herstellung des rekombinanten murinen Egr-1

Das murine Egr-1 Gen wurde aus einer genomischen Bank als ein Xba I flankiertes, 6,6 kb langes Fragment isoliert. Die 2,5 kb lange von Nru I und Avr II flankierte, für Egr-1 kodierende Region wurde zur Mutagenese in pAlter (Promega) subkloniert (Dinkel A., Promotionsarbeit Universität Freiburg,

1997). Dadurch wurden 2 ATTTA RNA Instabilitätssignale des Egr-1 Gens entfernt. 5' von Exon I wurde eine Hind III Schnittstelle und 3' von Exon II eine EcoR I Schnittstelle eingefügt. Zusätzlich wurde ein ATTTA Motiv im Exon II konservativ an Position 2922 mutiert.

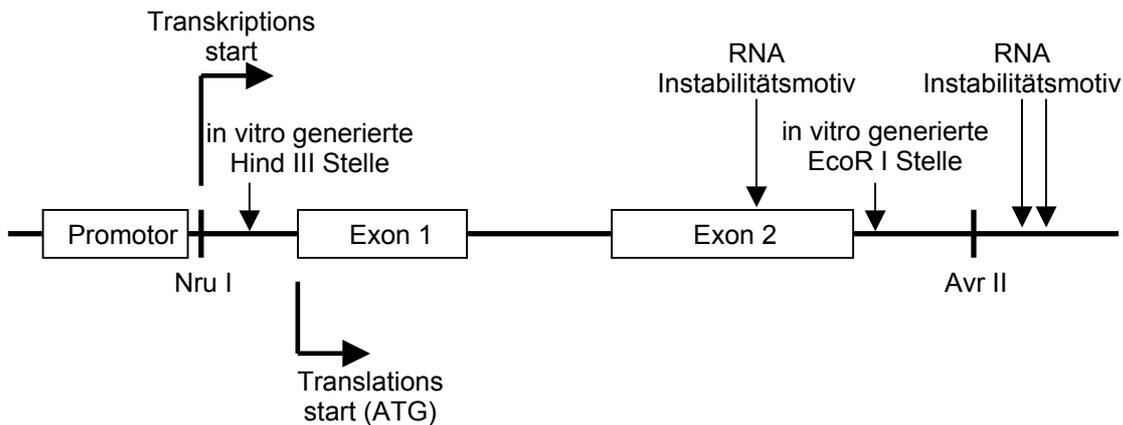


Abb. 6 Mutagenese des murinen Egr-1 Gens zur Herstellung stabil exprimierender Egr-1 mRNA

Für die unten beschriebenen Experimente zur stabilen bzw. transienten Transfektion von Zellen, wurde das resultierende Hind III/EcoR I Fragment jeweils in verschiedene Vektoren kloniert (pCNA3.1 (+/-), pIND (Invitrogen), pLXIN (Clontech)).

2.5.1 Stabile Transfektion immortalisierter Fibroblasten mit dem rekombinanten murinen Egr-1

Zur Herstellung stabiler, Egr-1 überexprimierender Klone, wurden in einer ersten Transfektionsserie die immortalisierten synovialen Fibroblasten mit einem linearisierten pCR-Egr-1-Neo Vektor transfiziert. Dafür wurden die immortalisierten Zellen in 6-well Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/well ausgesät. Die Transfektion wurde wie oben beschrieben mit Hilfe des liposomalen Transfektions-Reagenz DOTAP durchgeführt. Nach der Transfektion wurde das serumreduzierte durch serumhaltiges Medium ersetzt und 16 h später mit der Neomycin-Selektion begonnen. Die Selektion

erstreckte sich über zwei Wochen, die Selektionsdosis betrug 500 µg/ml Neomycin. Nach dieser Zeit blieben nur vereinzelt Zellen übrig, die die Neomycin-Resistenz stabil in ihr Genom eingebaut hatten. Einzelne Klone wurden vorsichtig abtrypsiniert und in frische 6-Loch Platten überführt. Diese Klone wurden dann solange im Neomycin-Medium (Erhaltungsdosis = 200µg/ml) weiterkultiviert, bis genügend Zellen (1×10^6) jeweils für den Proteinnachweis und für die RNA-Extraktion zur Verfügung standen.

Ähnlich wurde bei der zweiten Transfektionsserie vorgegangen mit dem einzigen Unterschied, dass die immortalisierten synovialen Fibroblasten mit einem linearisierten pcDNA3.1(+)-Egr-1-Neo bzw. pcDNA3.1(-)-Egr-1-Neo Vektor stabil transfiziert worden sind. Hierbei wurde beabsichtigt sense und anti-sense Klone zu erhalten, aufgrund der unterschiedlichen Orientierung der multiplen Klonierungsstelle. Nach der Selektion wurden die sense und anti-sense Klone solange kultiviert, bis 1×10^6 Zellen jeweils für den Western Blot und für die RNA-Extraktion zur Verfügung standen.

2.5.2 Transiente Transfektion von humanen Fibrosarkomzellen (HT1080)

Humane Fibrosarkomzellen (ECACC) wurden in 4 6-Loch Platten in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Nach einer 16-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit dem zirkulären pMACS K^k.II- (Miltenyi Biotec) und dem im zweifach molarem Überschuß zugegebenen pcDNA3.1(+)-Egr-1Neo Vektor kotransfiziert. Die zwei Plasmide wurden im serumfreiem Medium mit dem zur DNA-Gesamtmenge dreifachem Volumen an liposomalem Reagenz FuGENE (Roche) für 15-20 min. bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig in das Zellkulturmedium hineinpipettiert. Die Transfektion wurde für 5 h bei 37°C im 10%-igem Kulturmedium ohne Antibiotika-Zusätze durchgeführt. Das Transfektions-Medium wurde durch frisches Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 46 h kultiviert.

Nach dieser Zeit exprimierten die kotransfizierten Zellen den Maus-Oberflächenmarker. Durch Zugabe von Antikörpern gegen den Maus Oberflächenmarker, die zusätzlich kleine Magnetkügelchen trugen, war es möglich in einem magnetischen Feld die kotransfizierten Zellen von der nicht

transfizierten Fraktion zu trennen. Die Trennsäule wurde dann aus dem magnetischen Feld entfernt, die positive Fraktion mit dem PBE-Puffer eluiert. Die positive, stark angereicherte Egr-1 überexprimierende Fraktion, sowie die Durchfluß-Fraktion und die nicht transfizierten Fibrosarkomzellen wurden für die RNA-Extraktion verwendet. Nach anschließender c-DNA Synthese standen die Proben für die quantitativen RT-PCR Analysen zur Verfügung.

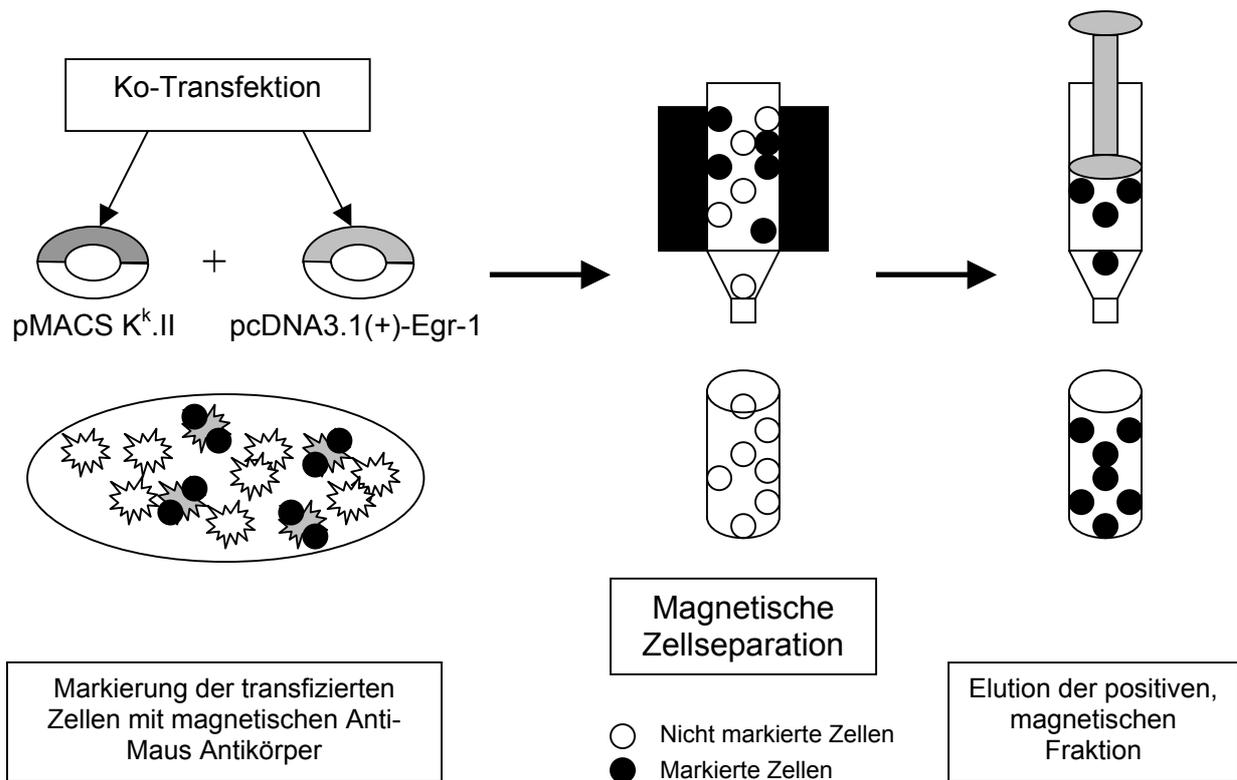


Abb. 7 Transiente Ko-Transfektion mit anschließender Zell-Separation am Beispiel der Fibrosarkom-Zellen. Nach der Ko-Transfektion wurden die transfizierten Zellen mit Antikörpern gegen den Maus-Oberflächenmarker, die zusätzlich kleine Magnetkügelchen tragen, markiert und im magnetischen Feld separiert. Die Durchfluß-Fraktion enthält die nicht transfizierten Zellen. Nach dem Entfernen der Trennsäule aus dem magnetischen Feld kann die angereicherte, positive Fraktion eluiert werden.

2.5.3 Transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (EcR-293)

Humane embryonale Nierenzellen (EcR-293, Invitrogen) exprimieren stabil die Untereinheiten des funktionalen Ecdyson-Rezeptors (RXR und VgEcR) und enthalten die Zeocin-Resistenz. Nachdem das rekombinante Egr-1 in den pIND Vektor, der den Ecdyson-induzierbaren Promotor beinhaltet, subkloniert wurde, wurden die EcR-293 Zellen mit diesem Plasmid transient transfiziert. Um eine anschließende Magnet-Separation der transfizierten Zellen zu ermöglichen, wurde zusätzlich mit dem pMACS K^k.II Plasmid ko-transfiziert. Dabei wurde ähnlich wie bei der transienten Transfektion von Fibrosarkomzellen vorgegangen: das pIND-Egr-1 Plasmid wurde im zweifach molaren Überschuß zum pMACS K^k.II Plasmid zugegeben, mit dem liposomalen Transfektions-Reagenz FuGENE 15 min. inkubiert und zu den EcR-293 Zellen zugegeben. Nach einer 5-stündigen Inkubation wurde das Transfektionsmedium durch frisches, Zeocin-haltiges (400 µg/ml) Medium ersetzt. 24 Stunden später wurde Ponasteron A (2,5µM), ein Ecdyson-Analogon, das die Untereinheiten des Ecdyson-Rezeptors zur Bindung an das Ecdyson-response Element und dadurch zur Aktivierung des Ecdyson-induzierbaren Promotors ($P_{\Delta HSP}$) stimuliert, dem Kulturmedium zugefügt. In der Abwesenheit des Inducers (Ponasterone A) interagieren die zwei Untereinheiten des Rezeptors nicht mit dem Ecdyson-response Element und die Expression des Drosophila Hitze-Schock Promotors ($P_{\Delta HSP}$) ist vernachlässigbar. Nach weiteren 24 h wurden die transfizierten Zellen mit Hilfe des Zell-Separations-Systems von der nicht transfizierten Fraktion separiert, anschließend erfolgte die RNA-Extraktion und c-DNA Synthese.

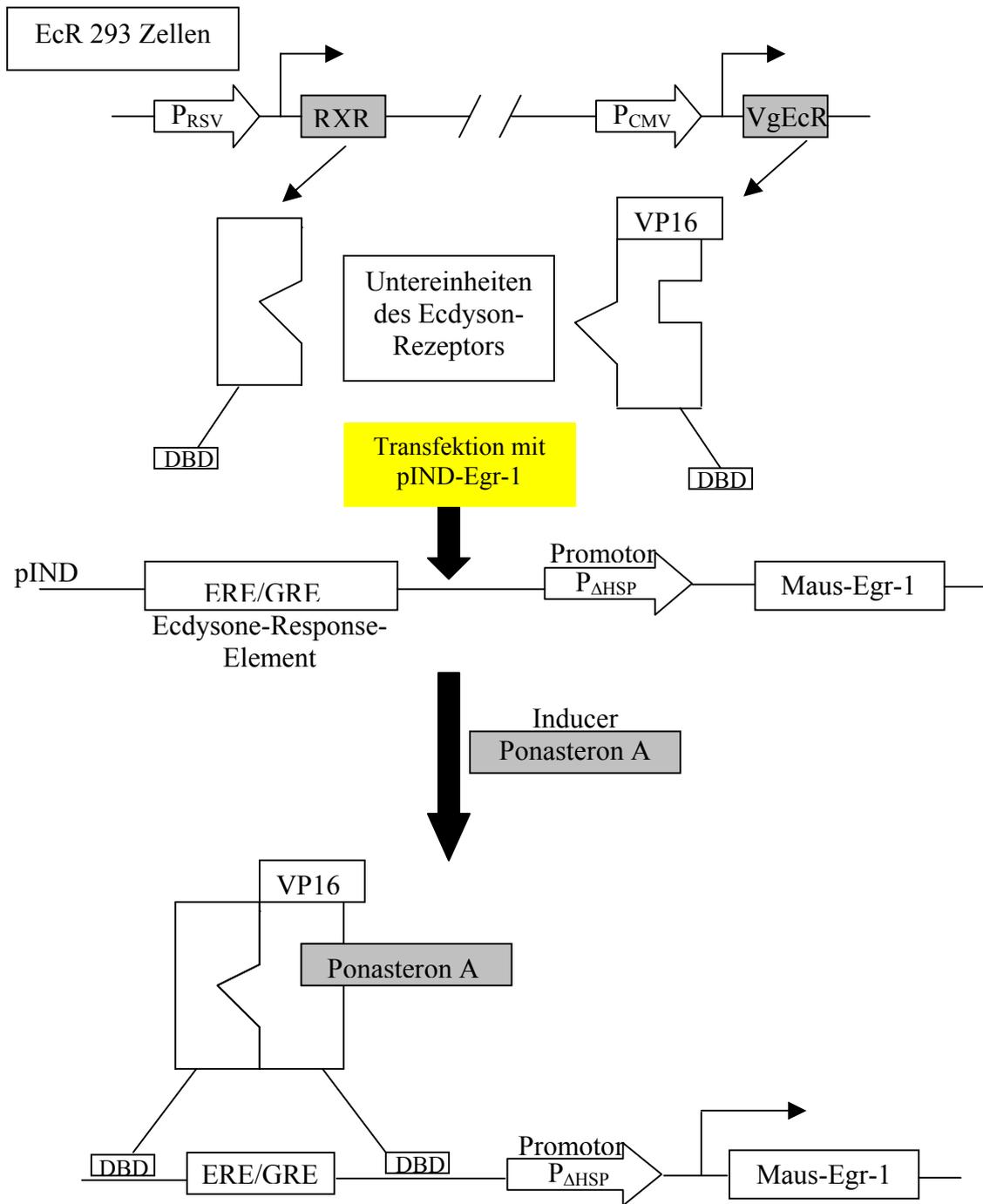


Abb.8 Ecdyson-Induzierbares Expressions-System.

Die humanen embryonalen Nierenzellen (EcR-293) exprimieren konstitutiv die 2 Untereinheiten des Ecdyson-Rezeptors (RXR, VgEcR). Durch die Zugabe des pIND-Plasmids, das den Ecdyson-induzierbaren Promotor sowie das Egr-1 Gen enthält, und des Inducers (Ponasteron A), binden die 2 Untereinheiten mit ihren DNA-Bindungsdomänen (DBD) an das Ecdyson-response Element und aktivieren somit den Promotor, der die Transkription des Egr-1 Gens in Gang setzt.

2.6 RNA-Extraktion und c-DNA Synthese

Nach Abtrypsinieren und Waschen der Zellen, wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des Rneasy^R Mini Kits (Qiagen) nach den Instruktionen des Herstellers extrahiert. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des GeneQuant *pro* (Pharmacia) photometrisch bestimmt und eine Gesamtmenge von 2µg RNA für die c-DNA Synthese eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe der Oligo dT Primer (2µl) die m-RNA gebunden (bei 70°C für 2 Min.). Nach Abkühlen auf Eis und Zugabe von 8µl 5x Reaktionspuffer, 1µl rekombinantem Inhibitor, 2µl dNTP-Mix und 2µl MMLV reverser Transkriptase in einem Endvolumen von 40µl pro Ansatz, wurde die c-DNA Synthese bei 42°C für 60 min. im Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Zum Schluß wurde die c-DNA für 10 Min. auf 95°C erhitzt und nach Abkühlen auf 4°C auf ein Gesamtvolumen von 200µl verdünnt. Jeweils 0,02 µg c-DNA wurde für die quantitative RT-PCR eingesetzt.

2.7 RAP-PCR

Drei verschiedene RNA-Konzentrationen (100 ng, 250 ng und 500 ng) wurden als Vorlage für jedes Experiment eingesetzt. Die Erststrang (=cDNA)-Synthese erfolgte mit Hilfe der zufälligen Primer (2 µM): US6 (5'-GTGGTGACAG-3'), US9 (5'-GTGACAGACA-3') und Nuklear 1+ (5'-ACGAA GAAGAG-3'). Für die Zweitstrang-Synthese setzte man die Primerkonzentration höher an (4 µM), außerdem radioaktiv markierte Desoxy-Cytosin-Triphosphate ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) für 35 Zyklen bei niedriger Stringenz. Zufällige Primer für die Zweitstrang-Synthese waren: OPN21 (5'-GTGACAGACA-3'), Kin A2+ (5'-GAGGGTGCCTT-3'), OPN23 (5'-CAGGG GCACC-3') und Nuklear 1+ (s.o.). Die PCR-Amplifikation wurde mit Kombinationen aus beiden Primergruppen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf die Sequenziergele (8 M Harnstoff / 6% Polyacrylamid) geladen und die Elektrophorese wurde für 2-3 h bei 50 W in 1x Tris-Borsäure EDTA Puffer durchgeführt. Die Gele wurden auf Whatman Paper transferiert, bei 80°C unter Vakuum getrocknet und dem Röntgenfilm (BioMax TM, Kodak) bei RT

für 12-72 h exponiert, je nach Intensität der Radioaktivität der amplifizierten Fragmente. Die Gelbanden, die das Ziel-Fragment enthielten, wurden aus dem Gel herausgeschnitten, in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und zum Eluieren bei 65°C für 3 h inkubiert. Die Eluate verwendete man für die Reamplifikation der Genfragmente unter den oben beschriebenen Bedingungen für nur 20 Zyklen. Um Kontaminationen mit nicht differenziell regulierten PCR-Produkten von gleicher Größe auszuschließen, wurden die PCR-Produkte in einer zweiten Runde in SSCP Gelen aufgereinigt. Nach der Identifizierung des Gensegments erfolgte nach dem Ausschneiden der Bande aus dem SSCP-Gel eine zweite Reamplifikation.

Nachdem die richtige Größe und die Reinheit im 1%-igem Gel überprüft wurde, konnten die reamplifizierten Produkte aus dem SSCP-Gel in PCR[®]-II Topo mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning[®] Kits DUALPromoter (Invitrotrogen) kloniert werden. Nach der sogenannten blau-weiss Selektion der Klone mittels der α Komplementation des β -Galaktosidase Enzyms, wurden 10 weisse und eine blaue Kolonie gepickt und in 50 µl Wasser aufgenommen. Aliquots dieser Bakteriensuspensionen wurden durch hohe-Stringenz-PCRs mit den absteigenden Sequenzier-Primern T7 und M13 (oder M20) auf die korrekte Länge ihrer Inserts überprüft. Die entsprechenden Klone mit den richtigen Inserts wurden in 5 ml LB-Medium+Ampicillin (50 µg/ml) aufgenommen, Übernacht geschüttelt und nach der Plasmid Isolation mit Hilfe des Perkin Elmer (Norwalk, CT) Hat sequencing Kits sequenziert (Applied Biosystems 373 automatic sequencer).

2.8 Quantitative Echtzeit (real-time) PCR

Um Veränderungen der aus den Zellkulturen gewonnenen m-RNA exakt quantifizieren zu können, wurde die Echtzeit (real-time) PCR mit Hilfe des LightCycler Systems (Roche Diagnostics) eingesetzt. Diese PCR basiert auf die Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffes SYBR Green I an doppelsträngige DNA. Während der abwechselnden PCR-Schritte, können unterschiedliche Fluoreszenz-Intensitäten detektiert werden, abhängig von den aktuellen

Mengen an doppelsträngiger DNA. Die Fluoreszenzmenge wird jeweils am Ende der Elongationsphase bei 530 nm gemessen und auf dem Monitor angezeigt, sodaß die zunehmenden Mengen an PCR-Produkt von Zyklus zu Zyklus verfolgt werden können.

Für die einzelnen PCR Reaktionen fügte man in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µl cDNA (generiert von 0,02 µg RNA), 3 mM MgCl₂, 0,5 µM Primergemisch und 2 µl DNA Master Sybr Green I mix (Roche Molecular Biochemicals) hinzu. Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte nach dem folgendem PCR-Protokoll: nach einem ersten 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C folgten 35-40 Zyklen mit den Schritten: 95°C für 15s, 62°C (bzw. 65, 67, 71°C, je nach Zielgen) für 5s und 72°C für 10s, die Temperaturveränderungsrate betrug 20°C/s. Die Analysen der Schmelzkurven von Primerdimeren bzw. spezifischen PCR Produkten erfolgten bei 95°C 0s, 65°C 15s, 95°C 0s, die Temperatur-Veränderungsrate betrug 0,1°C/s. Die amplifizierten PCR Produkte wurden anschließend im 1,5%-igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf die richtige Länge überprüft. Als externen Standard wurde ein Haushaltsgen, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), von dem angenommen wird, dass es in relativ konstanten Mengen exprimiert wird, gewählt. Die Kopienzahl des untersuchten Gens wurde auf die Kopienzahl des Haushaltsgens (GAPDH) bezogen, sodaß die Quantifizierung als das Verhältnis Zielgen/Haushaltsgen ausgedrückt wurde. Für die Erstellung der Standardkurve dienten ebenfalls GAPDH-Standards (Search LC) mit bekannter Kopienzahl, aus denen man jeweils 3 Verdünnungsreihen herstellte (1:10 bis 1:1000). Folgende Primer-Paare wurden verwendet:

Primer Name	Sequenz	Fragment Länge
Maus Egr-1 upper	5' –GGGGAGCCGAGCGAACAACC– 3'	290 bp
Maus Egr-1 lower	5' –GAGGCAGAGGAAGACGATGAAGCAG–3'	

Primer Name	Sequenz	Fragment Länge
Human Egr-1 upper	5' –ACAAGAAAGCAGACAAAAGTG- 3'	531 bp
Human Egr-1 lower	5' –GGGAAGTGGGCAGAAAGGATT- 3'	
Kollagen Typ I (α 1) upper	5' –AGCGCTGGTTTCGACTTCAGCTTCC- 3'	466 bp
Kollagen Typ I (α 1) lower	5' –CATCGGCAGGGTCCGAGCCCT- 3'	
Kollagen Typ I (α 2) upper	5' –CTGGTCCTTCTGGTCCTGTTG- 3'	544 bp
Kollagen Typ I (α 2) lower	5' –GTGCGAGCTGGGTTCTTTCTA- 3'	
TIMP-1 upper	5' –TGCACCTGTGTCCCACCCCACCCACAG ACG- 3'	515 bp
TIMP-1 lower	5' –GGCTATCTGGGACCGCAGGGACTGCCA GGT- 3'	
TIMP-2 upper	5' –CGCTCGGCCTCCTGCTGCT- 3'	399 bp
TIMP-2 lower	5' –AGGCTCTTCTTCTGGGTGGTGCTCA- 3'	
TIMP-3 upper	5' –CAAGGTGGTGGGGAAGAAGC- 3'	426 bp
TIMP-3 lower	5' –CGGATGCAGGCGTAGTGTTT- 3'	

Primer Name	Sequenz	Fragment Länge
TIMP-4 upper	5' –ACAGCCAGAAGCAGTATC- 3'	446 bp
TIMP-4 lower	5' –CCAGAGGTCAGGTGGTAA- 3'	
PDGFβ1 upper	5' –CTGTCCAGGTGAGAAAGATCGAGATTGT GCGG- 3'	253 bp
PDGFβ1 lower	5' –GCCGTCTTGTCATGCGTGTGCTTGAATT TCCG- 3'	
Kollagen Typ II (α1) upper	5' –CTGGCTCCCAACACTGCCAACGTC- 3'	414 bp
Kollagen Typ II (α1) lower	5' –TCCTTTGGGTTTGCAACGGATTGT- 3'	

Für weitere Gene wurden die für den Light Cycler optimierten Primer Kits von Search LC (Heidelberg) verwendet.

2.9 Herstellung der Agarosegele

Sowohl die PCR-Produkte als auch die klonierten Plasmide wurden auf die richtige Größe im Agarosegel überprüft. Für die meistens relativ kurzen PCR-Produkte (bis zu 1 Kb) eigneten sich 1,5%-ige Gele, für die längeren Plasmide bzw. Plasmid-Fragmente die 1%-igen Agarosegele. Dafür wurden 6 g Agarose (SeaKem^R LE Agarose, Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland) abgewogen und auf 400 ml 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle solange erhitzt bis sich die Agarose gelöst hatte. Durch die Zugabe von 30 µl (0,001%-ig) einer gebrauchsfertigen

Ethidiumbromid-Lösung konnten die DNA-Banden unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. 20x TBE Puffer wurde hergestellt, indem 121 g Trizma Base (Sigma, Endkonzentration 1 M), 61,7 g Borsäure (Merck, Endkonzentration 1 M) und 7,14g Titriplex III (Merck, Endkonzentration 20 mM) auf 1 l A.dest. aufgefüllt und autoklaviert wurde.

2.10 Egr-1 Proteinanalysen mittels Western Blotting

Im nächsten Schritt wurden die zahlreichen Klone auf ihre Egr-1 Protein-Expression mittels Western Blotting getestet.

Beim Western Blotting werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch nach Molekülgröße aufgetrennt.

Von den jeweiligen Klonen wurden aus 1×10^6 Zellen Zellysate hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, abtrypsiniert, dann im Vollmedium aufgenommen und für 7 Minuten bei 4°C und 1200 U/min abzentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift mit kaltem PBS, wurde das Zellpellet in 60 µl Lysis-Puffer aufgenommen und bei -70°C ÜN eingefroren.

Die Lysate wurden dann bei 4°C und 15000 U/min abzentrifugiert. Die Zelltrümmer blieben als Zellpellet zurück, der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 20 µl Probenpuffer versetzt. Die Zellysate wurden bei 95°C für 10 min. erhitzt. Jeweils 20 µl Probe wurden anschließend in die Geltaschen pipettiert. Nach einer Laufzeit von 90 min. bei 100 V, wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Hybond™ ECL™ Nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia). Nach einer Laufzeit von 90 min. bei 100 V, wurde die Membran für 3x10 min. mit PBS gewaschen, anschließend mit PBS/0,1% Tween/5% Milchpulver 1 h bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindestellen zu blockieren. Die Inkubation mit den spezifischen Primär-Antikörper (Egr-1 (C-19), polyklonale Kanninchen IgG-Fraktion, Santa Cruz Biotechnology, 1:2000 verdünnt) erfolgte entweder für 1 St. bei RT oder ÜN bei 4°C in PBS/5% Milchpulver. Nach intensivem Waschen der Membran (3x15 Min. mit PBS/0,1% Tween und 1x10 Min. mit PBS), erfolgte die Inkubation mit dem POD-konjugiertem Sekundär-Antikörper (Affini Pure Ziege Anti-Kanninchen

IgG, Dianova, 1:4000 verdünnt) für 1 St. bei RT. Nach erneutem Waschen der Membran, wurden die Proteine mit Hilfe der ECL-Chemilumineszenz Methode (Amersham Pharmacia) sichtbar gemacht. Dabei wird Luminol durch die Peroxidase in Anwesenheit von Enhancern oxidiert, was eine Licht-Emission zur Folge hat. Die Nitrocellulosemembran wurde für 2 min. mit den ECL-Lösungen inkubiert, in die Filmkassette gelegt und mit einer Klarsichtfolie luftblasenfrei bedeckt. Der Röntgenfilm (Kodak, Biomax ML, 13x18 cm) wurde in der Dunkelkammer für 1 min. exponiert, anschließend fixiert und entwickelt.

2.10.1 Kollagen Typ I Proteinanalysen mittels Western Blotting

Um die Proteinexpression von Kollagen Typ I in Überständen von mit Egr-1 stabil transfizierten Zellen zu bestimmen, wurden 5×10^5 Zellen/Loch einer 6-Loch Platte ausgesät. 16 h später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 ml serumfreies Kulturmedium, das Ascorbinsäure (50 $\mu\text{g/ml}$) und β -Aminopropionitril (100 $\mu\text{g/ml}$) enthielt, dazugegeben. Durch die Zugabe dieses Lathyrogens kann die Bildung von Quervernetzungen der Kollagen-Fibrillen, die mit Hilfe der Peptidyl-Lysin-Oxidase katalysiert wird, reduziert werden. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde serumfreies Kulturmedium verwendet, da das fötale Kälberserum per se hohe Typ I Kollagen Mengen enthält. Nach 48 h Inkubation wurden 300 μl Überstand abgenommen und eine Fällung der Proteine mit 9 Volumen Ethanol abs. bei -20°C Übernacht vorgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (36670 g, 4°C , 20 min.) wurden die Überstände verworfen und das Proteinpellet in 30 μl Probenpuffer aufgenommen. Die folgende Proteindetektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Primärantikörper verwendete man eine gegen Kollagen Typ I ($\alpha 2$) C(18) polyklonale Ziegen IgG-Fraktion (Santa Cruz, Biotechnology, 1:2000 verdünnt) und als Sekundärantikörper dementsprechend POD markierte Kanninchen Anti-Ziege Antikörper (Dianova, 1:4000 verdünnt).

2.10.2 Proteinanalysen mittels ELISA

Die TIMP-1 Proteinexpression in Überständen von stabil transfizierten Zellen wurde mittels eines kommerziellen ELISAs (Amersham Pharmacia), das spezifisch für freies und mit MMP's komplexiertes TIMP-1 ist, gemessen. Die Messbereich lag zwischen 3,13 und 50 ng/ml, die Sensitivität betrug 1,25 ng/ml.

Die Kollagen Typ I Proteinexpression wurde mit Hilfe des kommerziellen ELISAs gegen das C-terminale Propeptid des Typ I Kollagens (Metra Biosystems, Heidelberg) mit einem Nachweisbereich zwischen 1 und 80 ng/ml, ermittelt.

2.11 Herstellung von Promotor-Konstrukten

Aus synovialen Fibroblasten der zweiten Subkultur wurde die genomische DNA mit Hilfe des DNeasy^R Tissue Kits (Qiagen) extrahiert.

Die Sequenz des Kollagen Typ I ($\alpha 1$) Gens ist in der Gen-Bank unter der Nummer X98705 veröffentlicht. Das TATA-Signal ist angegeben zwischen Position 2456 und 2460. Für das Designen der Primer wurde ein erster Genabschnitt (2640), der offensichtlich die Sequenz des Promotors enthält, gewählt. Die Primer wurden so generiert, dass der upper-Primer eine Kpn I Restriktionsstelle und der lower-Primer eine Bgl II Schnittstelle enthält mit folgender Sequenz:

Upper-Primer

5' AAA **GGT ACC** GCC AAG CGT TTT AAG TCG AA 3'

lower-Primer

5' TTT **AGA TCT** GTC TAG ACC CTA GAC ATG TAG ACT CTT 3'

Die Amplifizierung des Kollagen Typ I ($\alpha 1$) Promotorfragments (2598 bp) aus der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe der Platinum^R Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Proofreading) besitzt. In einem Gesamtansatz von 50 μ l wurden 5 μ l des 10x HiFi PCR Puffers, 1 μ l des 10 millimolaren dNTP-Gemisches (jeweils 0,2 mM Endkonzentration), 2 μ l der 50 millimolaren MgSO₄-Lösung (2 mM Endkonzentration), 1 μ l Primer-Mix (0,2 mM Endkonzentration), 0,2 μ l HiFi

Taq Polymerase und 2,5 µl DNA hinzupipettiert. Für die Amplifizierung wurde im Thermocycler (Biometra) ein PCR-Programm mit 30 Zyklen bestehend aus jeweils 45 sec. bei 94°C, 60 sec. bei 65°C, 120 sec. bei 72°C und einer finalen Elongation von 5 min. bei 72°C, gewählt. Aufgrund dessen dass das PCR-Produkt unter diesen Bedingungen sehr schwach amplifiziert wurde, stellte man aus diesem eine 1:100 Verdünnung her und amplifizierte das PCR-Produkt nochmals, diesmal mit 35 Zyklen. Nach der Überprüfung des PCR-Produkts im 1,5%-igem Agarosegel erfolgte die Gelextraktion mit Hilfe des QiaQuick™ Gel Extraction Kits (Qiagen). Nach der DNA-Ausfällung mit 2,5 Volumen Ethanol abs. und 1/10 NaAc 3M, pH 6,2 ÜN bei -70°C, konnte die DNA in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen und photometrisch gemessen werden. Anschließend erfolgte zuerst der Verdau mit Kpn I (12 µl H₂O, 2 µl low Puffer, 2 µl Kpn I, 0,2 µl BSA (Stock 20 mg/ml), 4 µl DNA) für 2 h bei 37°C. Nach der 10-minütigen Hitzeinaktivierung bei 65°C wurden 2 µl Bgl II, 2 µl high Puffer und 16 µl H₂O hinzugefügt und für 1.30 h bei 37°C inkubiert. Nach einer erneuten Gelextraktion konnte das Kollagen I Promotor-Fragment für die Ligation in den pGL3 Vektor, der auf gleicher Weise geschnitten wurde, verwendet werden.

Für das TIMP-1 Promotor-Konstrukt erhielten wir freundlicherweise von Herrn Dr. Hiroshi Sato (Krebs Forschungs-Institut, Kanazawa Universität, Japan) ein CAT-Plasmid, das ein 550 bp Promotor-Fragment enthielt. Nachdem das Fragment mit Sac I und Xba I aus dem Vektor herausgeschnitten und aus dem Agarosegel extrahiert wurde, fand die Ligation mit dem pBluescript SK (+) Vektor, der vorher mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und aus dem Agarosegel extrahiert wurde, statt. Da das TIMP-1 Promotor-Fragment selber eine Sma I Schnittstelle besaß, konnte nicht mit Sac I und Sma I geschnitten und in den pGL3 basic Vektor ligiert werden. Der pGL3 basic Vektor besitzt keine Xba I Restriktionsstelle im Polylinker, sodaß es auch nicht möglich war mit Sac I und Xba I das Promotor-Fragment aus dem pBluescript Vektor herauszuschneiden und in den pGL3 basic Vektor hineinzuligieren. Aus diesem Grund wurde der pBluescript Vektor zuerst mit Xba I geschnitten, durch die Zugabe des

Klenow-Fragments (Roche) erhielt der Vektor glatte Enden, anschließend wurde der Vektor mit Sac I geschnitten, die Promotorbande aus dem Gel extrahiert und in den pGL3 basic Vektor, der vorher mit Sac I und Sma I geschnitten und aus dem Gel extrahiert wurde, ligiert.

Für die Herstellung der TIMP-1 Promotor-Mutante wurde ein Stu I/Eco47 III flankierter Abschnitt (etwa 60 bp lang), der eine klassische Egr-1 Bindungsstelle enthielt, aus dem Promotor-Fragment entfernt. Für diesen Zweck wurde das pGL3 basic/TIMP-1 Promotor Plasmid in zwei getrennten Ansätzen mit Restriktionsenzymen geschnitten. Im ersten Ansatz wurde der Vektor mit Xba I und Stu I geschnitten. Daraus resultierten 2 Fragmente: ein 3,5 kb und ein 1,8 kb langes Vektorstück, das das Stu I/Eco47 III flankierte Fragment enthielt. Im zweiten Ansatz wurde das pGL3 basic/TIMP-1 Promotor Plasmid mit Eco47 III und Xba I geschnitten, aus dem 3 Fragmente resultierten. Das 2,7 kb lange Vektorstück enthielt das Stu I/Eco47 III flankierte Fragment, das 1,8 kb lange Vektorstück enthielt die andere Seite des Vektors bis zur Eco47 III Schnittstelle und das dritte 400 bp lange Fragment war in dem 3,5 kb langem Vektorstück aus dem ersten Ansatz enthalten. Zum Schluß konnte das 3,5 kb lange Fragment aus dem ersten Ansatz mit dem 1,8 kb langen Vektorfragment aus dem zweiten Ansatz zum vollständigen pGL3 basic/TIMP-1 Promotor Plasmid, dem die Stu I/Eco47 III flankierte Stelle fehlte (Δ Egr-1), ligiert werden.

2.11 Ligationsansätze

Bei allen Ligationen wurde ähnlich vorgegangen. Dafür wurden 4 Ansätze jeweils hergestellt, darunter eine reine Vektor- und eine Insert-Kontrolle (jeweils 100 ng), weiterhin eine Ligation mit gleichen Vektor- und Insert-Mengen und schließlich eine Ligation mit dem Vektor und der zwei- bis dreifachen Insert-Menge (100 ng Vektor + 200-300 ng Insert, je nach Insertlänge). Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 1 μ l Ligations-Puffer, 1 μ l ATP, 0,5 μ l Ligase pipettiert. Die Ansätze wurden für 24 h bei 14°C im Thermocycler (Biometra) inkubiert. Mit jeweils 5 μ l aus diesen Ansätzen wurden kompetente E.coli transformiert, auf Agar-Platten

ausplattiert und bei 37°C für 16-18 h inkubiert. Mit einzelnen Kolonien wurden Mini-Präparationen und nach entsprechenden Testverdaus Maxi-Präparationen angesetzt.

2.13 Promotor-Reporter Assays

Promotor-Reporter Assays wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega) durchgeführt. Dafür wurden in 6-Loch Platten 2×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Um die experimentellen Variabilitäten, verursacht durch die unterschiedliche Vitalität bzw. Transfektions-Effizienz in den einzelnen Zellen zu normalisieren, wurde der pRL \emptyset Vektor, der konstitutiv Renilla Luziferase exprimiert, als interne Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden mit äquimolaren Mengen der zirkulären pRL \emptyset und pGL3 basic Plasmide mit Hilfe des Transfektions-Reagenz FuGENE für 5 h transient ko-transfiziert. 43-46 h später erfolgte eine aktive Zellyse durch die Zugabe von 300 μ l Lysepuffer und das Abschaben der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers. Der Zellrasen aus jeweils drei Vertiefungen einer 6-Loch Platte wurde pro Ansatz zusammengepoolt. Für die komplette Zellyse wurden die Zellen zweier Einfrier-/Auftau-Zyklen ausgesetzt. Die Aktivitäten der Firefly- und Renilla-Luziferasen wurden aus derselben Probe (20 μ l) mit Hilfe eines Luminometers (Lumat LB 9507, Berthold Technologies) gemessen. Die Firefly-Lumineszenz wurde nach Zugabe von 100 μ l Luciferase Assay Reagent II (LARII) quantifiziert. Durch die anschließende Zugabe vom Stop&Glo Reagenz, wurde die Firefly-Reaktion gestoppt und die Renilla-Luziferase Reaktion initiiert und quantifiziert.

2.14 Transduktion der murinen embryonalen Fibroblasten Zelllinie (NIH3T3)

Für die Transduktion von murinen embryonalen Fibroblasten wurde ein bicistronisches retrovirales Konstrukt (pLXIN, Clontech), das ein IRES Element zwischen der multiplen Klonierungsstelle und der Neomycin-Resistenz enthält, ausgewählt. Der 5' gelegene virale LTR Promotor

kontrolliert folglich die Expression des untersuchten Gens, sowie die der Neomycin-Resistenz.

Für diesen Zweck wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl das pcDNA3.1(+)-Egr-1-Neo Plasmid mit Hind III und EcoR I verdaut und die DNA mit 2,5 Volumen Ethanol abs. und 1/10 NaAc 3M pH 6,2 bei -70°C Übernacht ausgefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 min. bei 15000 U/min. wurde der Überstand verworfen und die DNA in 20 µl H₂O aufgenommen. Da die zwei Restriktionsenzyme 5'-Überhänge produzieren, erfolgte anschließend mit Hilfe vom Klenow Fragment (1 µl) für 15 min. bei 37°C das Einfügen der glatten Enden, nachdem 3 µl 10x Polymerase Puffer, 3 µl 10 mM DTT, 3 µl dNTPs (je 0,5 mM) hinzugefügt wurden. Der pLXIN Vektor wurde mit Hpa I geschnitten, durch das Hinzufügen der alkalischen Phosphatase für 30 min. bei 37°C dephosphoryliert und für 10 min. bei 65°C hitzeinaktiviert. Nach dem Auftragen beider Vektoren auf das 1%-ige Agarosegel, wurde die pLXIN-Vektorbande sowie das Hind III/EcoR I Fragment herausgeschnitten und miteinander ligiert. Nach entsprechenden Testverdaus wurde eine transiente Transfektion der Fibrosarkomzellen (HT1080) mit dem pLXIN-Egr-1 Vektor bzw. der Vektorkontrolle durchgeführt, um die Funktionalität des retroviralen Systems zu testen. Die Zellen wurden mit Hilfe des MACS-Zellsortierungssystem selektiert, aus den entsprechenden Fraktionen wurden Zellysate hergestellt.

Die mit dem pLXIN-Egr-1 Vektor transient transfizierten Zellen brachten im Western Blot ein sehr starkes Egr-1 Signal (80 KD), sodaß das retrovirale System für die folgende Transfektion der Verpackungszelllinie (RetroPackTM PT67, Clontech, Heidelberg) eingesetzt wurde. Die folgenden Experimente erfolgten wegen der erforderlichen Sicherheitsstufe 2 im Labor von Dr. T. Pap in Magdeburg. Der pLXIN-Egr-1 Vektor enthält nicht die Strukturgene, die für die Virus-Partikelformation und die Replikation erforderlich sind, sondern sie sind im Genom der Verpackungszelllinie stabil integriert.

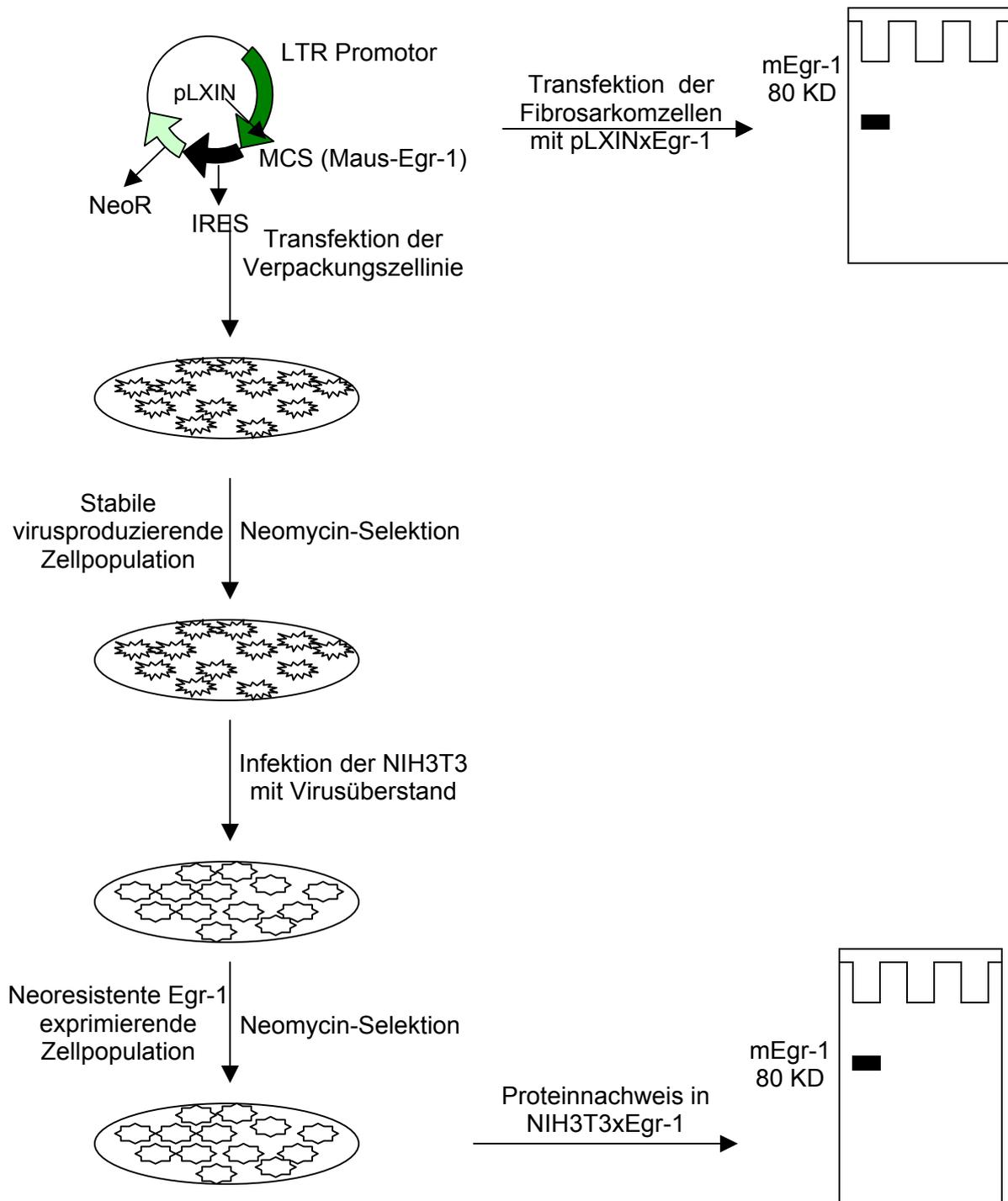


Abb. 9 Retrovirus-vermittelter Gen-Transfer. Die Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem pLXINxMaus-Egr-1 Vektor und die anschließende Neomycin-Selektion führt zur Entstehung einer stabil virusproduzierender Zellpopulation. Der Virusüberstand wird für die Infektion der Zielzelllinie (NIH3T3) verwendet. Nach der Neomycin-Selektion erfolgt der Egr-1 Proteinnachweis per Western Blotting.

Das Einführen des pLXIN-Egr-1 Vektors und des alleinigen pLXIN Vektors in die Verpackungszelllinie führt dementsprechend zur Produktion von hoch-titrigen, Replikations-inkompetenten infektiösen Viruspartikel.

Im nächsten Schritt wurden die embryonalen Maus-Fibroblasten (NIH3T3) mit dem Zellkulturüberstand der Verpackungszelllinie, der die retroviralen Partikel enthielt (pLXIN-Egr-1 vs. Kontrolle), infiziert und mit Neomycin selektioniert. Die Neomycin-Resistenz korreliert dann mit der Expression vom rekombinanten Egr-1. Nach einer 2-3-wöchigen Neomycinselektion erfolgte der Egr-1 Proteinnachweis per Western Blotting, um die erfolgreiche Transduktion zu bestätigen.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung des rekombinanten murinen Egr-1 auf Proteinebene nach der stabilen Transfektion immortalisierter Fibroblasten

In Vorarbeiten wurden immortalisierte synoviale Fibroblasten mit dem pCMV-Egr-1-Neo Vektor stabil transfiziert. Aus dieser Transfektionsserie ergab sich ein Egr-1 überexprimierender Klon (Klon 10), der sowohl unter serumreduzierten als auch unter normalen Kulturbedingungen (0,5 oder 10% FCS) ein starkes Egr-1 Signal auf der Höhe von 80 kD im Western Blot brachte. Um die Stabilität des Klon zu überprüfen wurde die Proteinexpression verschiedener Passagen getestet. Als Kontrolle wurde ein Klon ausgesucht, der mit demselben Vektor transfiziert wurde, der aber in der RT-PCR kein Maus-Egr-1 zeigte und der aus diesem Grund als Mock-Kontrolle bezeichnet wurde (Klon 6). Im Western Blot brachte der Kontrollklon ein sehr schwaches Egr-1 Signal (Abb. 10).

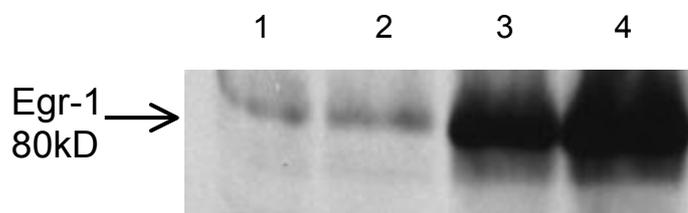


Abb. 10 Egr-1 Proteinnachweis mittels Western Blotting in Klonen aus einer ersten Transfektionsserie, die mit dem pCMV-Egr-1-Neo Vektor transfiziert wurden. Die Proteinexpression wurde unter verschiedenen Kulturbedingungen (0,5 und 10 % FCS) untersucht.

1=Klon 6 0,5% FCS

2=Klon 6 10% FCS

3=Klon 10 0,5% FCS

4=Klon 10 10% FCS

Für eine zweite stabile Transfektionsserie von immortalisierten synovialen Fibroblasten mit dem murinen rekombinanten Egr-1, wurde das Hind III und EcoR I flankierte Fragment in den pcDNA3.1(+) bzw. (-) hineinligiert.

Aufgrund der genau umgekehrt positionierten Hind III und EcoR I Restriktionsstellen in der multiplen Klonierungsstelle des pcDNA3.1(-) Plasmids (s.o.), dürfte das eingefügte Egr-1 Fragment nicht gelesen werden, da es entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung eingefügt wurde. Die Klone, die aus der Transfektion mit dem pcDNA3.1(+) Plasmid stammten, wurden dementsprechend als sense Klone und diejenigen, die aus der Transfektion mit dem pcDNA3.1(-) Plasmid stammten, als anti-sense Klone bezeichnet. Alle Klone wurden Restriktionsverdau unterzogen, um den Erfolg der Ligation zu bestätigen. Mit Hind III und EcoR I wurde das Maus-Egr-1 Fragment wieder herausgeschnitten, mit Sca I wurde der Vektor linearisiert. Der Schnitt mit Pvu I ergab zwei Banden, da das Enzym einmal im Insert und einmal im Vektor schneidet, allerdings unterschieden sich diese Banden je nach der Orientierung des Inserts im Vektor. Der Restriktionsverdau der sense Klone resultierte in eine 3,2 und eine 4,5 Kb große Bande. Die anti-sense Klone zeigten, wie erwartet eine 5,6 und eine 2,1 Kb große Bande (Abb. 11).

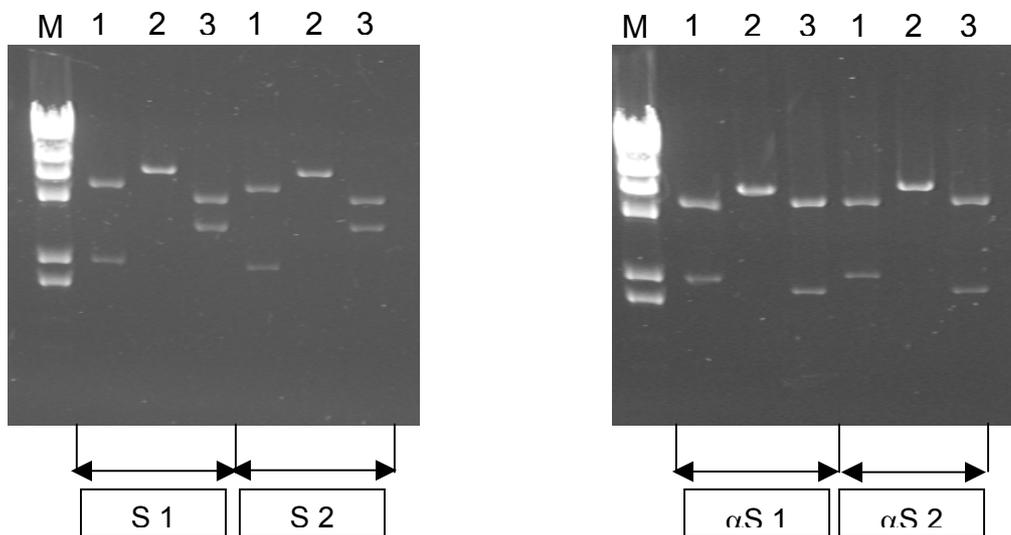


Abb. 11 Restriktionsverdau zweier sense (S1 und S2) und zweier anti-sense Klone (α S 1 und α S 2) mit Hind III/EcoR I (1), Sca I (2) und Pvu I (3). Der Schnitt mit Hind III/EcoR I oder mit Sca I ergab bei sense und anti-sense Klonen gleiche Banden. Der Restriktionsverdau mit Pvu I jedoch resultierte je nach Orientierung des Inserts in ein unterschiedliches Bandenmuster.

Nach dieser Kontrolle wurde die Plasmid-DNA eines sense Klons sequenziert. Die Sequenz-Homologie zum Maus-Egr-1 wurde im Bereich beider Exons bestätigt (Abb. 12). Der unterbrochene Bereich der Diagonale stellt das 700 Bp lange Intron dar, das im pcDNA3.1(+)*xEgr-1* enthalten ist, aber in der Genbanksequenz (NM_007913) fehlt. Anschließend konnte die Transfektion der immortalisierten Fibroblasten mit dem pcDNA3.1(+)*xEgr-1* Plasmid bzw. dem pcDNA3.1(-)*xEgr-1* Plasmid erfolgen.

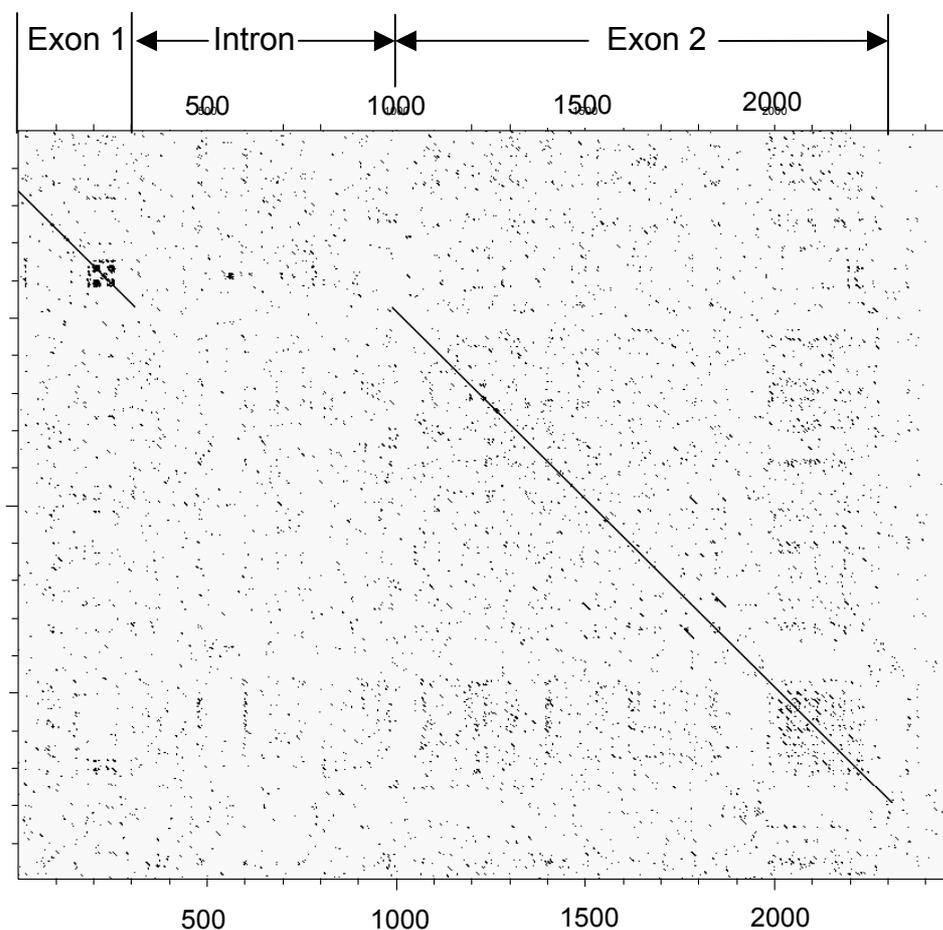


Abb. 12 Sequenzhomologie (Stringenz 7, Fenster 9, DNA Strider®) zwischen der Genbank-Sequenz der murinen *m-RNA* NM_007913 und der Plasmid-DNA pcDNA3.1(+)*xEgr-1*. Der Sequenzvergleich ergibt eine hohe Homologie im zwei kodierenden Bereichen (Exon 1 und Exon 2). Der unterbrochene Bereich der Diagonale stellt das etwa 700 Bp lange Intron dar, das im pcDNA3.1(+)*xEgr-1* Vektor enthalten ist, das aber in der Genbanksequenz fehlt.

Einzelne sense und anti-sense Klone wurden nach der Neomycin-Selektion gepickt und weiterkultiviert. Sobald genügend Zellen zur Verfügung standen, wurden Zellysate hergestellt und die Klone wurden auf ihre Egr-1 Proteinexpression im Western Blot überprüft. Von den zahlreichen sense Klonen wiesen jedoch nur drei eine starke Egr-1 Expression auf. Zwei von diesen schienen keine stabile Egr-1 Klone zu sein, denn sie verloren das Maus-Egr-1 im Laufe folgender Passagen. Ein sense Klon war besonders stabil (3+/85), die wiederholte Kontrolle über mehrere Passagen ergab eine starke Proteinbande auf der Höhe von 80 Kd (Abb. 13). Als Kontrollklon wurde sowohl ein anti-sense Klon (3-/76) als auch ein Klon ausgewählt, der mit dem leeren pcDNA3.1(+) Vektor stabil transfiziert wurde (VK 3).

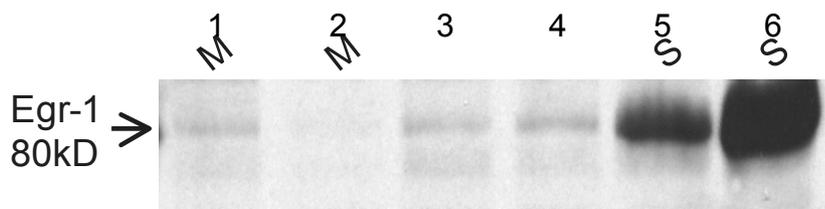


Abb. 13 Egr-1 Proteinnachweis mittels Western Blotting in der Vektor-Kontrolle (VK 3, Geltasche 1 und 2), die mit dem leeren Vektor transfiziert wurde, in einem anti-sense Klon (3-/76, Geltasche 3 und 4) und einem stabilen sense Klon (3+/85, Geltasche 5 und 6). Da die Expression des Transkriptionsfaktors Egr-1 vom fötalen Kälberserum induziert wird, wurde in den Klonen die Egr-1 Expression auch unter serum-reduzierten Medienbedingungen (0,5% FCS) untersucht.

1=VK 3 0,5% FCS

2=VK 3 10% FCS

3=3-/76 0,5% FCS

4=3-/76 10% FCS

5=3+/85 0,5% FCS

6=3+/85 10% FCS

3.2 Untersuchung des rekombinanten murinen Egr-1 auf Transkript-ebene nach der stabilen Transfektion immortalisierter Fibroblasten

Nachdem die Klone aus beiden Transfektionsserien im Western Blot auf ihre Egr-1 Proteinexpression getestet wurden, erfolgte die quantitative Analyse der m-RNA Transkripte mit Hilfe der LightCycler PCR. Der Kontrollklon aus der ersten Transfektionsserie (Klon 6) brachte kein Signal, während bei dem Egr-1 überexprimierenden Klon (Klon 10) ein Quotient (m-Egr-1/GAPDH) von 144 errechnet werden konnte (Abb. 14).

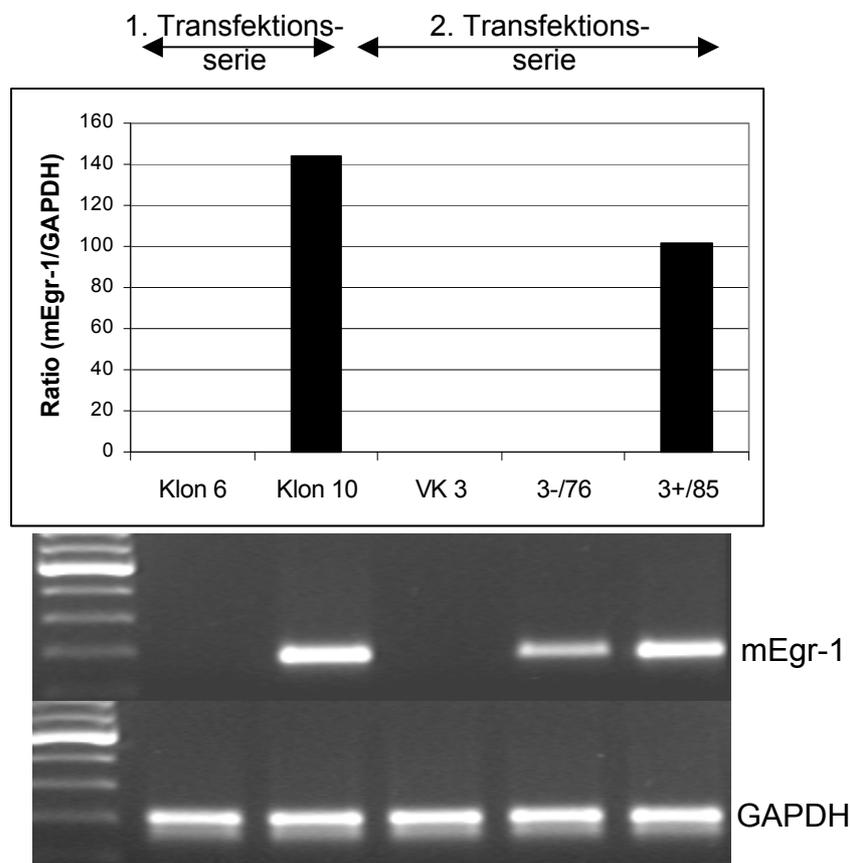


Abb 14 Quantitative Analyse der m-Egr-1 Transkripte in Klonen aus zwei voneinander unabhängigen Transfektionsserien mit Hilfe der LightCycler PCR. Dargestellt ist der Quotient zwischen der m-Egr-1 und der GAPDH Kopienzahl. Der errechnete Quotient wurde anschließend mit dem Faktor 100 multipliziert. Die im Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte entsprechen den im oberem Diagramm dargestellten Klonen.

Die Vektorkontrolle aus der zweiten Transfektionsserie (VK 3) zeigte, wie erwartet, ebenfalls kein spezifisches Signal, während die anti-sense Kontrolle (3-/76) eine im Agarosegel schwach sichtbare Bande aufwies, der errechnete Quotient (m-Egr-1/GAPDH) blieb allerdings wegen der sehr niedrigen Kopienzahl bei nur 0,2.

Die quantitative Analyse der m-Egr-1 Transkripte im sense Klon (3+/85) ergab einen um 30% niedrigeren Quotienten (101) als der im Klon 10 errechneten, allerdings blieb der Unterschied zur Kontrolle noch sehr hoch.

3.3 Untersuchung der Proliferation von stabil transfizierten Fibroblasten

Eine interessante Beobachtung konnte in Bezug auf die Proliferation der sense und anti-sense Klone gemacht werden. Während der sense-Klon (3+/85) sehr schwach proliferierte, mussten anti-sense Klone viel häufiger passagiert werden. Nach der Durchführung von Proliferations-/Vitalitätstests bestätigte sich diese Beobachtung. Wie in der Abb.15 zu sehen ist, zeigte der sense Klon (3+/85) nach 24 h nur einen schwachen Anstieg der optischen Dichte um 12,5%, während beim anti-sense Klon 3-/76 eine 43%-ige und dem anti-sense Klon 3-/97 eine 77%-ige Zunahme der optischen Dichte zu sehen war. Der anti-sense Klon 3-/76 proliferierte demnach dreimal so schnell und anti-sense Klon 3-/97 etwa sechsmal so schnell als der Egr-1 überexprimierende Klon 3+/85.

Die gleiche Beobachtung hinsichtlich der Proliferationsrate konnte auch bei Klonen aus der ersten Transfektionsserie gemacht werden. Der Egr-1 überexprimierende Klon 10 proliferierte ebenfalls langsamer als die Mock-Kontrolle Klon 6 (Daten nicht gezeigt).

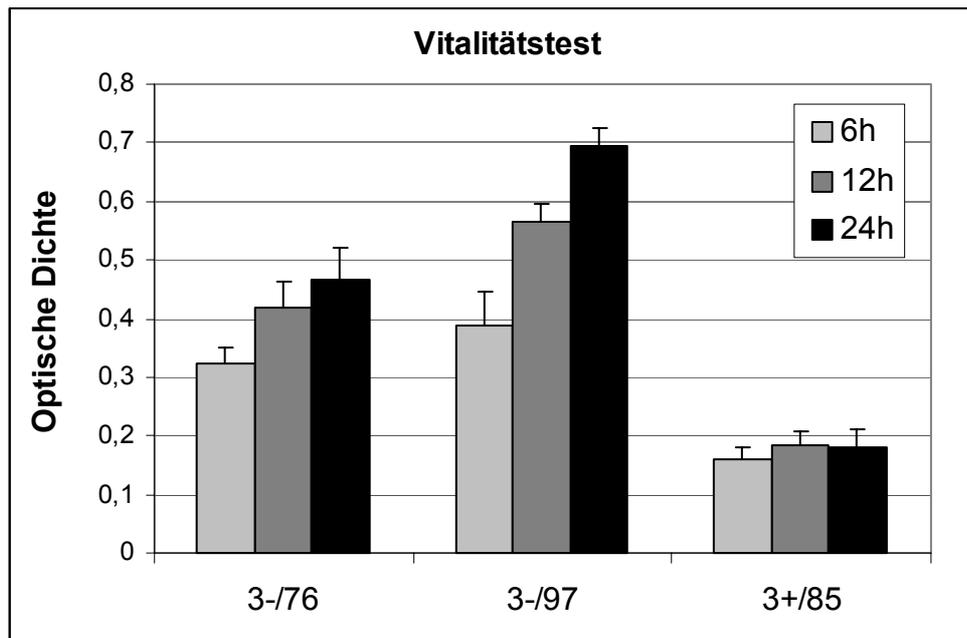


Abb 15 Analyse der Proliferation/Vitalität des Egr-1 überexprimierenden sense Klons (3+/85) im Vergleich zu den anti-sense Klons 3-/76 und 3-/97 mittels des kolorimetrischen Vitalitätstest (EZ4U, Biozol) anhand der mitochondrialen Aktivität.

3.4 Untersuchung differentiell exprimierter Gene mit Hilfe der RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)

Der Einsatz von zufälligen Primern bei der RAP-PCR sowie die stark gesenkte Annealingtemperatur führt dazu, dass die Primer auch an nur teilweise komplementäre Sequenzen hybridisieren können, sodaß eine hohe Anzahl an Banden unterschiedlicher Größe entsteht. Amplifiziert man die DNAs unter gleichen Bedingungen, können durch den Vergleich des Bandenmusters Unterschiede zwischen Spezies nachgewiesen werden.

Mit der Absicht differentiell exprimierte Gene in den Klons aus der ersten Transfektionsserie (Klon 6=Mock-Kontrolle, Klon 10=Egr-1 überexprimierender Klon) zu finden, die möglicherweise mit der starken Egr-1 Expression zusammenhängen, wurden diese der RAP-PCR unterzogen. Nach dem Auftragen der RAP-PCR Produkte auf das Sequenziergel wurden 16 in den zwei Klons differentiell exprimierte Banden gefunden, die anschließend sequenziert und mit den Daten aus der Genbank verglichen wurden.

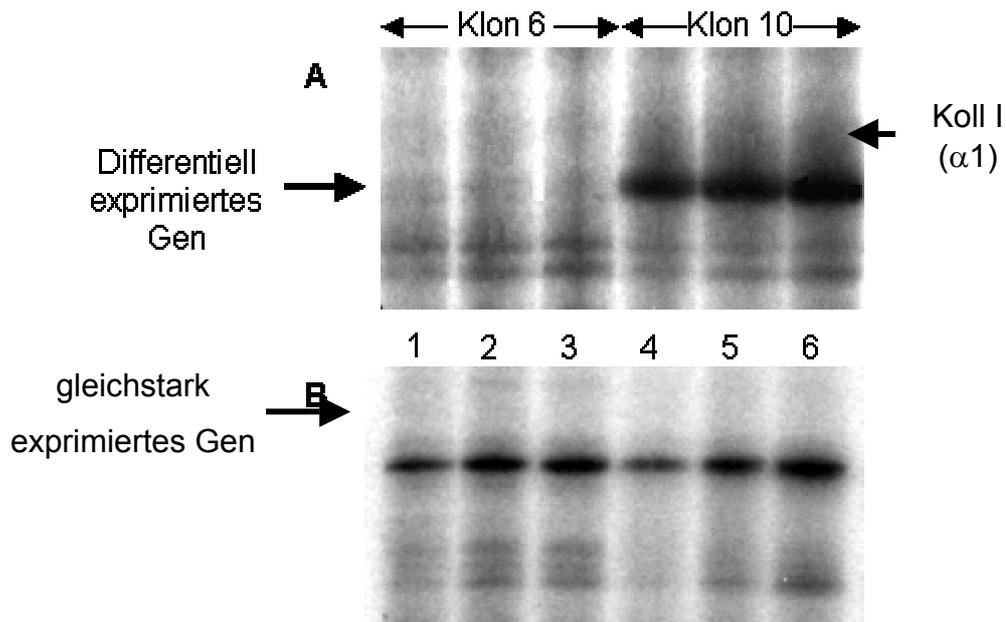


Abb. 16 Ausschnitt aus dem Sequenziergel, auf das die RAP-PCR Produkte aufgetragen wurden. A. Beispiel eines Gens, das in Klon 6 und 10 unterschiedlich exprimiert wird. B. Beispiel eines Gens, das in beiden Klonen etwa gleich stark exprimiert wird. Für die RAP-PCR wurden steigende RNA-Mengen vorgelegt (1 und 4=100 ng, 2 und 5=250 ng, 3 und 6=500 ng).

Eine von diesen Banden zeigte eine 100%-ige Homologie mit der $\alpha 1$ Kette des Typ I Kollagens (Abb. 16). Auf dieses Ergebnis basierend, wurde im nächsten Schritt die m-RNA und die Proteinexpression des Typ I Kollagens in den aus beiden Transfektionsserien stammenden Klonen eingehend untersucht.

3.5 Bestätigung der Kollagen I ($\alpha 1$ Kette) Genexpression mittels quantitativer Echtzeit PCR

Die quantitative Analyse der Kollagen I Transkripte erfolgte mit Hilfe der LightCycler PCR. Im Egr-1 überexprimierenden Klon (Klon 10) aus der ersten Transfektionsserie wurden mehr als 100-fach höhere Transkriptniveaus der $\alpha 1$ Kette des Typ I Kollagens gefunden als in der aus derselben Transfektionsserie stammenden Mock-Kontrolle (Abb. 17, oben).

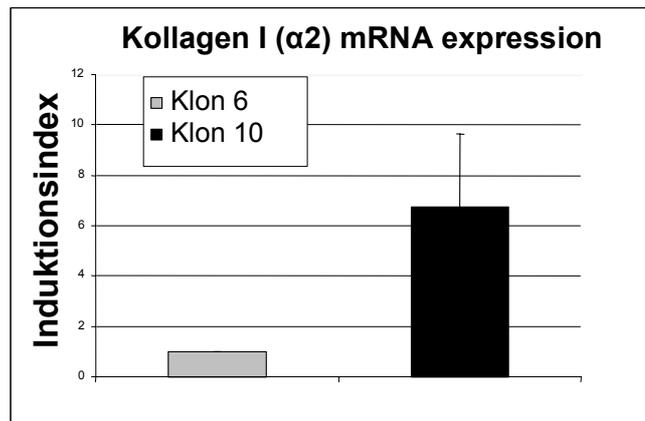
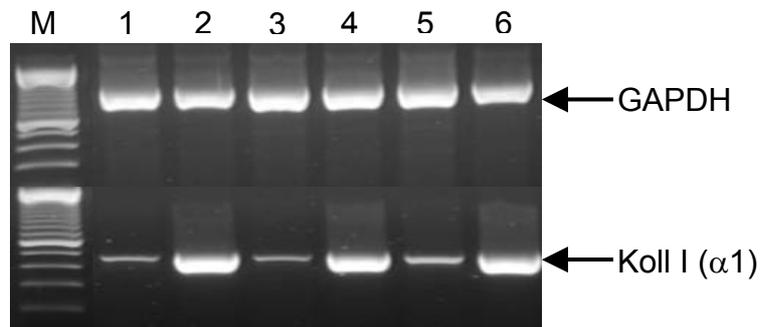
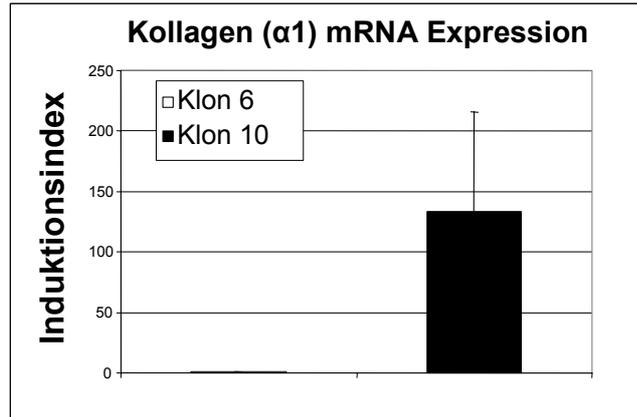


Abb. 17 Quantitative PCR-Analyse der Kollagen I mRNA Expression mit Hilfe des LightCyclers in immortalisierten Fibroblasten, die mit dem pCMV-Egr-1-Neo Vektor stabil transfiziert wurden. Untersucht wurde die Expression der $\alpha 1$ und der $\alpha 2$ Kette. Im mittleren Teil der Abbildung wird der Unterschied in der Koll I ($\alpha 1$) Expression in Klon 6 versus Klon 10 im Agarosegel deutlich sichtbar. Abgebildet sind die Amplifikate aus drei verschiedenen Passagen. Der Induktionsindex stellt das x-fache an Induktion in dem Egr-1 überexprimierenden Klon (Klon 10) im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Klon 6).

M=Marker

1=Klon 6 1.Passage

3=Klon 6 2.Passage

5=Klon 6 3.Passage

2=Klon 10 1.Passage

4=Klon 10 2.Passage

6=Klon 10 3.Passage

Dieser erhebliche Unterschied in der Expression bestätigte sich erneut nach der Überprüfung in cDNAs aus verschiedenen Passagen und war im 1,5%-igem Agarosegel deutlich sichtbar (Abb. 17, Mitte).

3.6 Bestätigung der Kollagen I ($\alpha 2$ Kette) Genexpression mittels quantitativer Echtzeit PCR

Eine Triple Helix von Kollagen I besteht normalerweise aus zwei $\alpha 1$ Ketten und einer $\alpha 2$ Kette. Nach der Bestimmung der Transkripte für die $\alpha 1$ Kette, war es nun von Interesse auch das Expressionsniveau der $\alpha 2$ Kette zu untersuchen. Im Klon 10 ergab sich im Vergleich zur Mock-Kontrolle eine 6,7-fache Induktion der $\alpha 2$ Kette von Kollagen I (Abb. 17, unten).

Die quantitative Analyse der Kollagen I Expression auf Transkriptebene in Klonen aus der zweiten Transfektionsserie ergab die gleiche Tendenz jedoch blieben die Expressionsniveaus um einige Zehnerpotenzen unter den Transkriptlevels, die in den Klonen aus der ersten Transfektionsserie gefunden wurden. Im Egr-1 überexprimierenden Klon (3+/85) ergab sich eine 3,2-fache Induktion der $\alpha 1$ Kette im Vergleich zum anti-sense Klon (3-/76) und 2,5-fach höhere Transkriptionsniveaus der $\alpha 2$ Kette (Abb. 18).

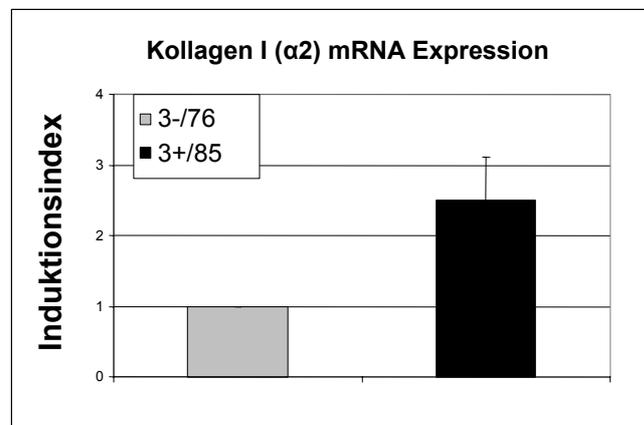
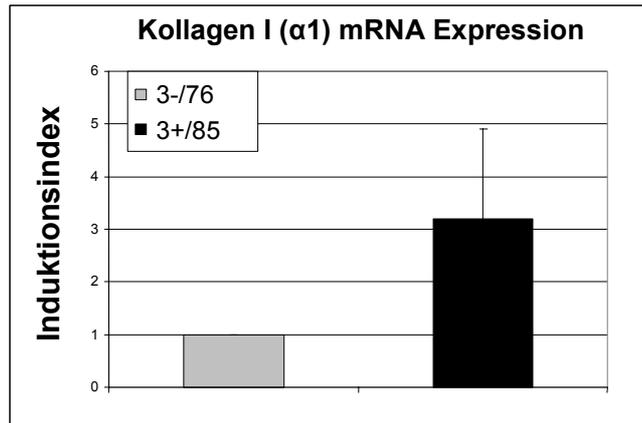


Abb. 18 Quantitative PCR-Analyse der Kollagen I mRNA Expression mit Hilfe des LightCyclers in immortalisierten Fibroblasten aus der zweiten Transfektionsserie. Der sense Klon (3+/85) wurde mit dem pcDNA3.1(+) Vektor, der anti-sense Klon (3-/76) mit dem pcDNA3.1(-) Vektor stabil transfiziert. Untersucht wurde die Expression der $\alpha 1$ und der $\alpha 2$ Kette. Der Induktionsindex stellt das x-fache an Induktion in dem sense Klon im Vergleich zur anti-sense Kontrolle.

3.7 Untersuchung der Kollagen I Expression auf Proteinebene

Nach der Bestimmung der Kollagen I Expression auf Transkriptebene erfolgte der Proteinnachweis in Überständen von Klonen aus beiden Transfektionsserien nach Zugabe von β -Aminopropionitril, ein Lathyrogen, das die Peptidyl Lysin Oxidase, die für die Bildung von Quervernetzungen der Kollagenfibrillen verantwortlich ist, inhibiert. Mittels ELISA konnte eine 5-fache Induktion des C-terminalen Propeptids des Typ I Kollagens in

Überständen von klon 10 im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Klon 6) bestimmt werden (Abb 19, oben).

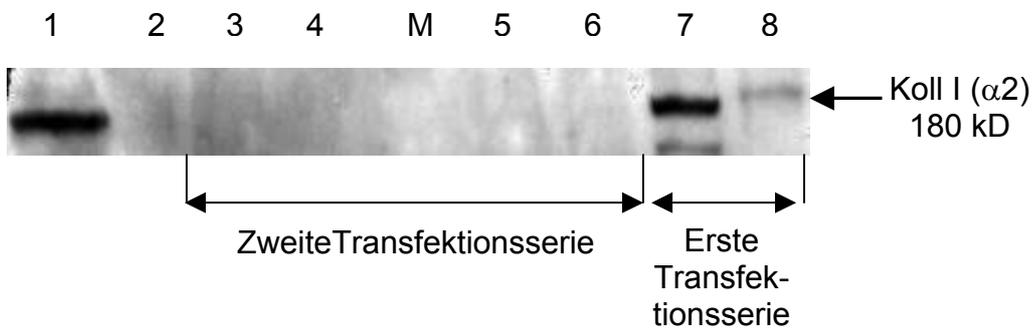
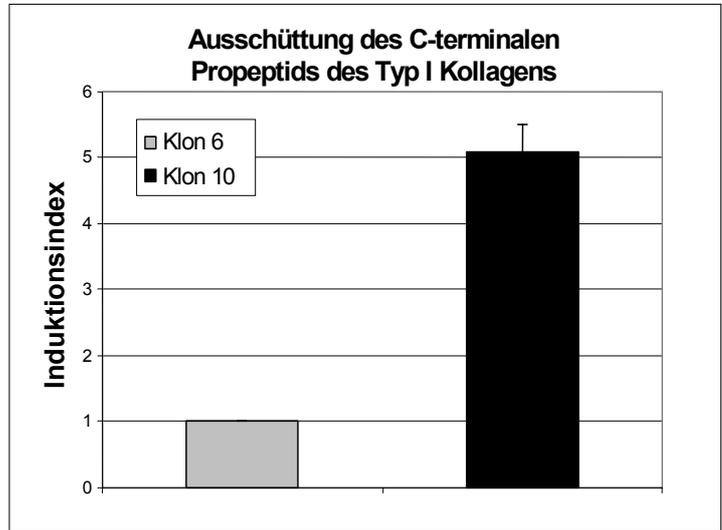


Abb. 19 Kollagen Typ I Protein-Expression in Klonen aus beiden Transfektionsserien. Das obere Diagramm zeigt eine 5-fach höhere Proteinausschüttung des C-terminalen Propeptids des Typ I Kollagens ($\alpha 1$ Kette) in Überständen von Klon 10 im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Klon 6) mittels ELISA nach Zugabe von β -Aminopropionitril. Das untere Bild zeigt die Detektion des Typ I Kollagens ($\alpha 2$ Kette) in Überständen von Klonen aus beiden Transfektionsserien mittels Western Blotting nach Zugabe von β -Aminopropionitril.

M=Protein-Marker

4=Anti-sense Kontrolle (3-/76)

1=Positiv Kontrolle (DMEM/10% FCS)

5,6=Sense Klon (3+/85)

2=Negativ Kontrolle (DMEM/0% FCS)

7=Klon 10

3=Vektor Kontrolle 3 (VK 3)

8=Klon 6

Die Proteinexpression in Überständen aus der zweiten Transfektionsserie lag jedoch unter der Nachweisgrenze des kommerziellen ELISAs. Um die Identität des Typ I Kollagens, das im ELISA detektiert wurde zu bestätigen, wurde die Proteinexpression mittels Western Blotting zusätzlich bestimmt. Ein starkes Signal der $\alpha 2$ Kette des Typ I Kollagens auf der Höhe von 180 kD konnte in Überständen von Klon 10 nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigte die Mock-Kontrolle eine viel schwächere Proteinexpression (Abb. 19, unten). In Überständen von Klonen aus der ersten Transfektionsserie konnte trotz Behandlung mit β -Aminopropionitril, ähnlich wie im ELISA, kein spezifisches Signal detektiert werden.

3.8 Untersuchung der Kollagen II ($\alpha 1$ Kette) und PDGF Genexpression

Die Expression der $\alpha 1$ Kette des Typ II Kollagens wurde ebenfalls untersucht. Auch hier ergab sich eine Korrelation zwischen einer Egr-1 Überexpression und erhöhten Transkriptniveaus des Typ II Kollagens. Klon 10 zeigte eine 3-fache Induktion dieses Gens im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Klon 6) (Abb. 20 A), der sense Klon aus der zweiten Transfektionsserie (3+/85) wies 4,7 höhere Transkriptlevels im Vergleich zum anti-sense Klon (3-/76) (Abb. 20 B), auf.

Ein bekanntes durch den Transkriptionsfaktor Egr-1 reguliertes Gen ist PDGF β (platelet derived growth factor). Um die biologische Aktivität des rekombinanten murinen Egr-1 anhand eines in der Literatur beschriebenen, von Egr-1 modulierten Gens zu testen, wurde die quantitative Analyse der PDGF β 1-Transkripte in den entsprechenden Klonen vorgenommen. 3,9-fach höhere Expressionsniveaus des PDGF β 1 wurden in Klon 10 versus Klon 6 gefunden und 2,8-fach höhere Transkriptlevels im sense Klon (3+/85) im Vergleich zum anti-sense Klon (3-/76).

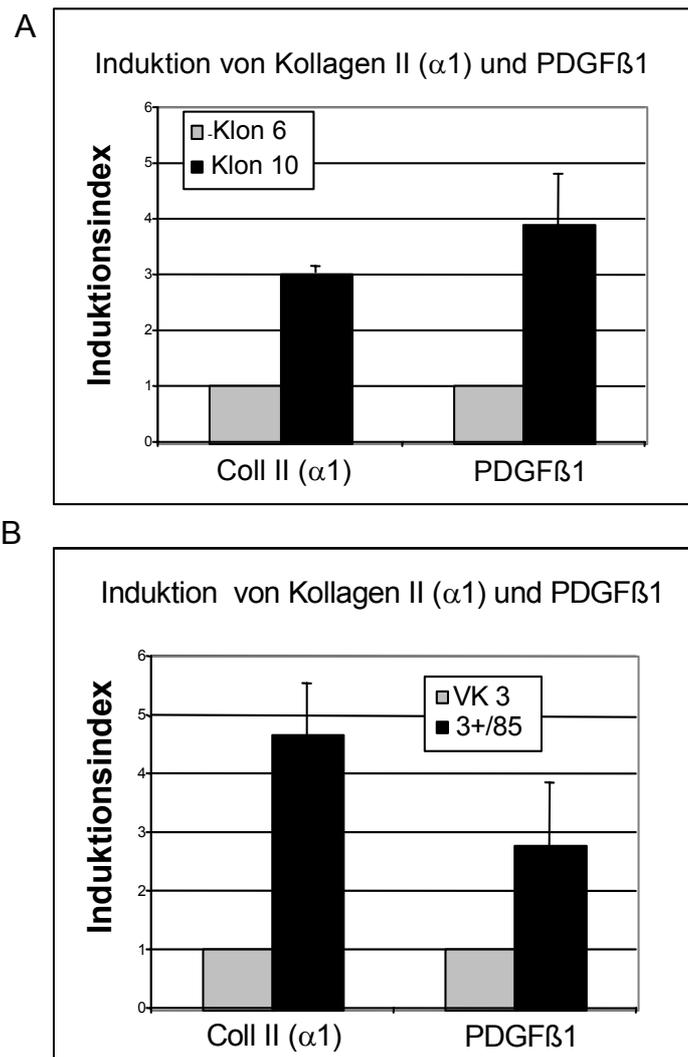


Abb. 20 Quantitative PCR-Analysen der Kollagen II ($\alpha 1$ Kette) und PDGF β 1 mRNA Expression mit Hilfe des LightCyclers in immortalisierten Fibroblasten aus zwei Transfektionsserien. Der Induktionsindex stellt das x-fache an Induktion in dem Egr-1 überexprimierenden Klon (Klon 10, 3+/85) im Vergleich zur Mock- bzw. anti-sense Kontrolle (Klon 6, 3-/76).

3.9 Untersuchung der TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) Genexpression

In Vorarbeiten verdichtete sich der Hinweis darauf, dass der Transkriptionsfaktor Egr-1 die Expression des Inhibitors der Metalloproteinasen TIMP-1 induziert. Aus diesem Grund erfolgte eine genaue Quantifizierung der vier

bekannten TIMP-Gene in cDNAs von Egr-1 überexprimierenden Klonen vs. Kontrollen aus beiden Transfektionsserien. Der Egr-1 überexprimierende Klon aus der ersten Transfektionsserie (Klon 10) zeigte eine 3,37-fache Induktion der TIMP-1 Expression, eine 3,35-fache Induktion der TIMP-2 Expression und 4-fach höhere TIMP-3 Transkriptniveaus (Abb. 21, oben).

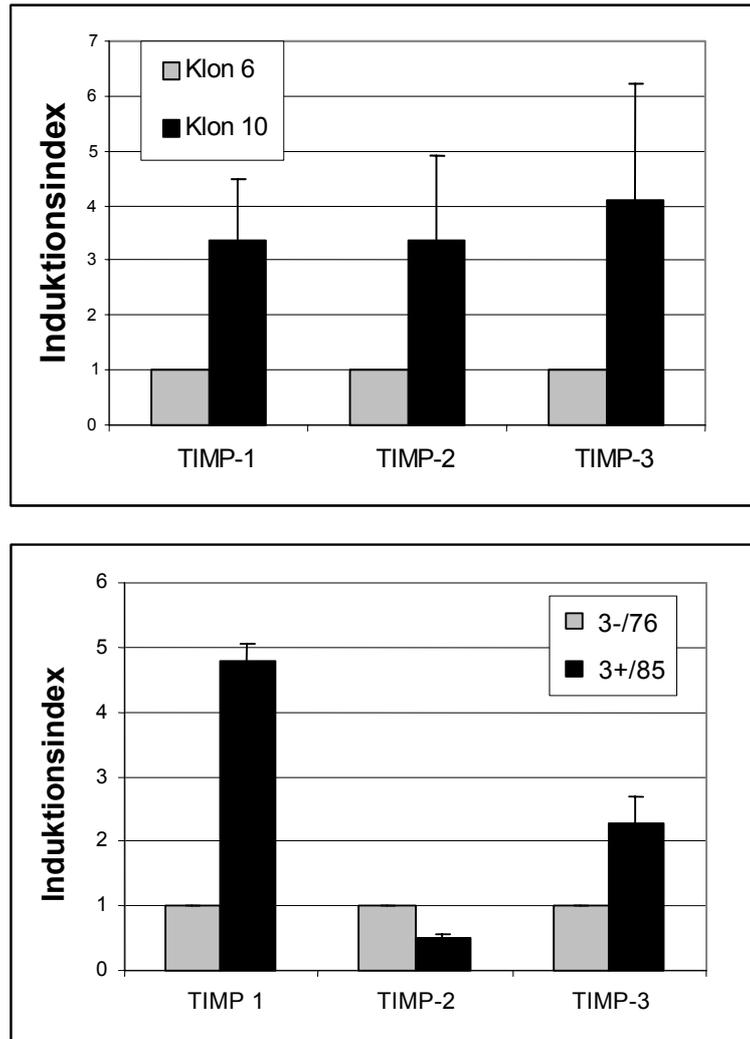


Abb. 21 Quantitative PCR-Analysen der TIMP-1, -2, -3 mRNA Expression mit Hilfe des LightCyclers in immortalisierten Fibroblasten aus zwei Transfektionsserien. Der Induktionsindex stellt das x-fache an Induktion in dem Egr-1 überexprimierenden Klon (Klon 10, 3+/85) im Vergleich zur Mock- bzw. anti-sense Kontrolle (Klon 6, 3-/76).

Der Egr-1 überexprimierende Klon aus der zweiten Transfektionsserie (3+/85) zeigte eine 4,8-fache Induktion der TIMP-1 Expression und eine 2,3-fach erhöhte TIMP-3 mRNA Expression im Vergleich zur anti-sense Kontrolle (3-/76) (Abb. 21, unten).

Die TIMP-2 mRNA Expression war jedoch um 50% reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression des TIMP-4 Gens konnte weder in den Klonen der ersten noch in den Klonen der zweiten Transfektionsserie quantifiziert werden.

3.10 Untersuchung der TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) Proteinexpression

Die Untersuchung der TIMP-1 Expression mittels ELISA ergab in den Egr-1 überexprimierenden Klonen stets höhere TIMP-1 Levels als in den entsprechenden Kontrollen. Im Klon 10 konnte zum ersten abgenommenen Zeitpunkt nach 6h eine 2,1-fache, nach 12h eine 2,6-fache, nach 24h eine 1,8-fache und nach 48h eine 1,7-fache Induktion detektiert werden (Abb 22A). Im Egr-1 überexprimierenden Klon aus der zweiten Transfektionsserie (3+/85) wurde zum ersten abgenommenen Zeitpunkt nach 6h eine 4,97-fache Induktion der TIMP-1 Proteinexpression gemessen, die nach 12h auf das 4,3-fache, nach 24h auf das 4-fache und nach 62h auf das 2,6-fache zurückging (Abb.22B).

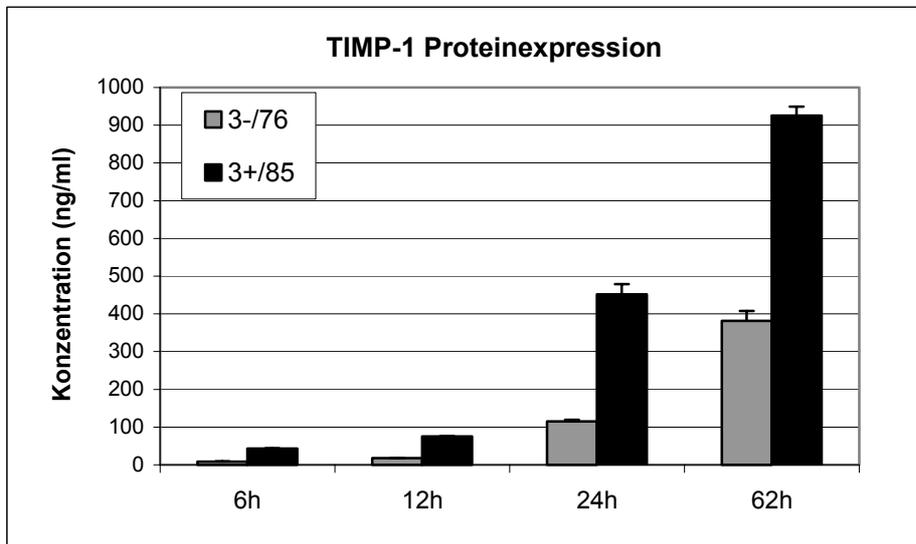
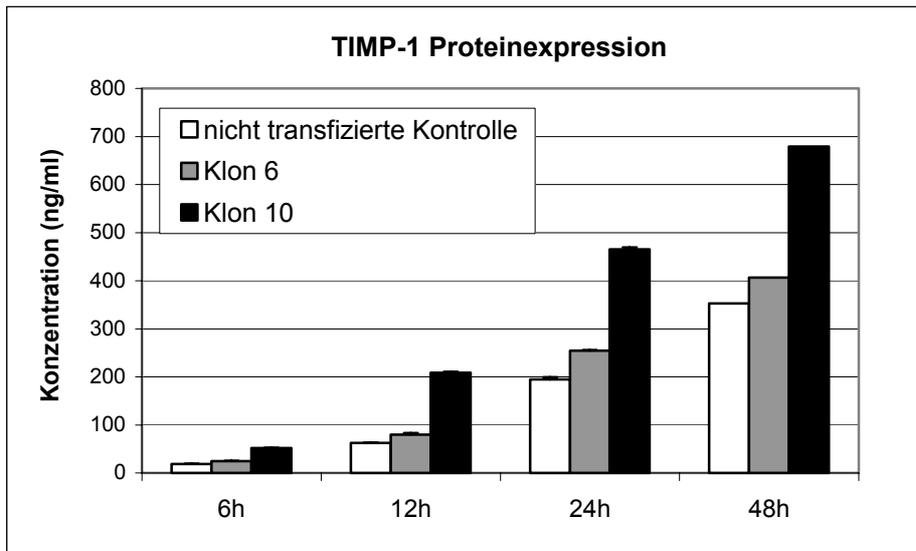


Abb. 22 Zeitabhängige quantitative Bestimmung der TIMP-1 Proteinexpression mittels ELISA in immortalisierten Fibroblasten aus der ersten Transfektionsserie (A, Klon 6/10) und aus der zweiten Transfektionsserie (B, 3+/85 vs. anti-sense Kontrolle 3-/76).

3.11 Transiente Transfektion von humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) mit dem pcDNA3.1(+)*x*Egr-1 Vektor

Um auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen der stabilen Transfektion um Mutationen oder Klonierungsartefakte handelt, wurde eine transiente Transfektionsmethode etabliert. Dafür wurden humane Fibrosar-

komzellen (HT1080) mit dem pcDNA3.1(+) \times Egr-1 Vektor und dem pMACS K^k.II Plasmid für eine anschließende Zellsortierung ko-transfiziert. In Vorversuchen konnte mittels Fluoreszenzfärbung eine Transfektionseffizienz von 15-20% ermittelt werden. Damit die Zellzahl nach der Sortierung mit dem MACS-System für die RNA-Extraktion bzw. für die Herstellung von Zellysaten für die Proteinextraktion ausreicht, wurden 4 6-Loch Platten mit 10⁵ Zellen/Loch zusammengepoolt. Im Gegensatz dazu ergab eine Ko-Transfektion mit dem pMACS K^k.II Plasmid und dem Kontrollplasmid pMACS 14.1 Transfektionseffizienzen bis zu 60%. Dies lässt vermuten, dass die schlechtere Transfektionseffizienz darauf zurückzuführen ist, dass das murine Egr-1 die Proliferation der Fibrosarkomzellen hemmt, was auch nach der stabilen Transfektion mit dem Maus-Egr-1 bei den immortalisierten Fibroblasten beobachtet werden konnte.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den stabilen Transfektionsserien in einem transienten Transfektions-System zu testen, wurde die Expression verschiedener Gene nach der Zellsortierung der Fibrosarkomzellen mittels Echtzeit-PCR ermittelt. Für diese Untersuchungen wurden cDNAs von nicht transfizierten Kontrollzellen, von der stark angereicherte Egr-1 Fraktion und von der Durchfluß Fraktion quantitativ erfasst. Im Vergleich zur Durchfluß Fraktion konnte in der angereicherten Egr-1 Fraktion eine 157,9-fach höhere Maus-Egr-1 Expression beobachtet werden (Abb. 23, links oben).

Die nicht transfizierte Kontrolle erbrachte, wie erwartet, kein Signal. Im Gegensatz zur Durchfluß Fraktion, die keine Induktion zeigte, war die Kollagen I (α 1) Expression in der angereicherten Egr-1 Fraktion 32,5-fach erhöht im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle. Eine 53-fache Induktion der Kollagen II (α 1) Expression wurde in der Egr-1 Fraktion gefunden im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle (Abb. 20, links Mitte). In der Durchfluß Fraktion schien die Kollagen II (α 1) Expression eher reduziert zu sein im Vergleich zur Kontrolle, was im 1,5%-ige Agarosegel auch sichtbar wurde (Abb. 23, rechts), allerdings kann aufgrund der extrem niedrigen Kopienzahl keine deutliche Aussage gemacht werden. Die hohe Egr-1

Expression in den Fibrosarkomzellen korrelierte außerdem mit einer 5,78-fachen Induktion der PDGF β 1 Expression (Abb. 23, links unten).

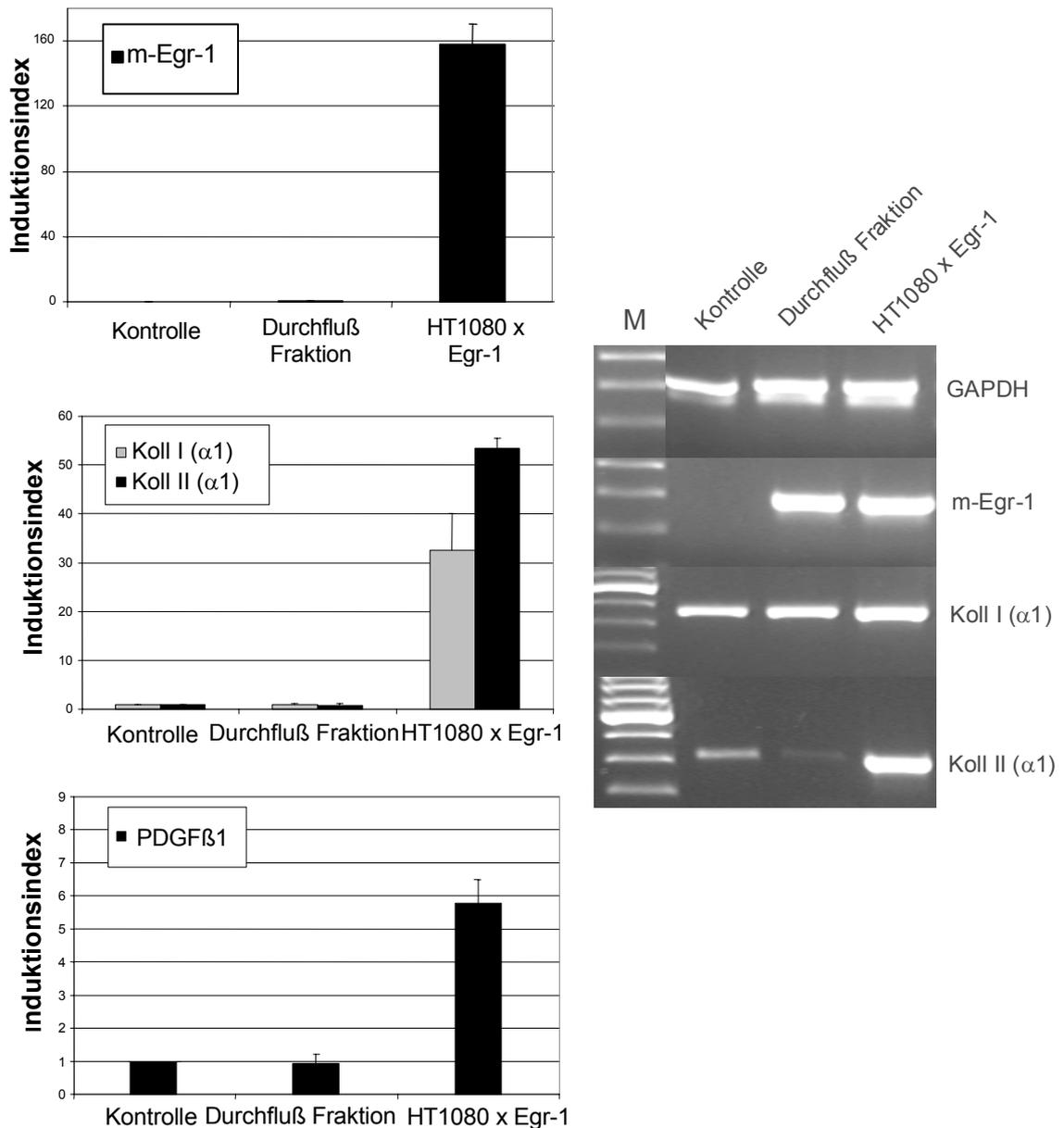


Abb. 23 Quantitative PCR-Analysen mit Hilfe des LightCyclers in transient transfizierten Fibrosarkomzellen. Die positive, stark angereicherte Egr-1 Fraktion (HT1080xEgr-1) zeigt im Vergleich zur Durchfluß Fraktion und zur nicht transfizierten Kontrolle eine erhöhte Expression von Kollagen I und II und PDGF β 1. Der Unterschied der Kollagen-Expression ist im Agarosegel deutlich sichtbar (rechts).

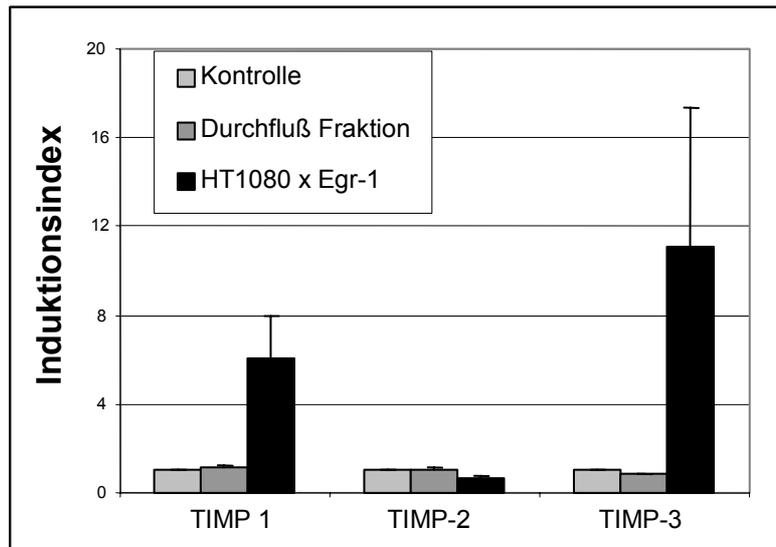


Abb. 24 Quantitative PCR-Analysen der TIMP-1, -2, -3 mRNA Expression mit Hilfe des LightCyclers in transient transfizierten Fibrosarkomzellen. Die positive, stark angereicherte Egr-1 Fraktion (HT1080 x Egr-1) zeigte eine 6-fache Induktion der TIMP-1 Expression und 11-fach höhere Transkriptniveaus der TIMP-3 Expression im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle. Der Induktionsindex stellt das x-fache an Induktion in dem Egr-1 überexprimierenden Fraktion (HT1080 x Egr-1) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die quantitativen Analysen der TIMP-Gene ergaben eine 6-fache Induktion der TIMP-1 mRNA Expression und 11-fach höhere Transkriptniveaus des TIMP-3 Gens in der angereicherten Egr-1 Fraktion im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle. Die TIMP-2 Expression war jedoch in der Egr-1 überexprimierenden Zellfraktion um 35% reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Die Durchfluß Fraktion zeigte keine nennenswerten Änderungen der Genexpression (Abb. 24).

Insgesamt ergab sich in den transient mit Maus-Egr-1 transfizierten HT1080-Zellen ein sehr ähnliches Genmuster wie in den stabil transfizierten Zelllinien mit dem Unterschied, dass die Expression der untersuchten Gene in den Fibrosarkomzellen um einige Zehnerpotenzen unter dem Expressionsniveau der immortalisierten Zellen lag und dass die TIMP-2 Expression in diesen Zellen nicht induziert wurde.

In einem getrennten Ansatz wurden die Fibrosarkomzellen auf gleicher Weise ko-transfiziert und selektiert. Anschließend wurden aus der angereicherten Egr-1 Fraktion, der Durchfluß Fraktion und der nicht transfizierten Kontrolle Zellysate für den Proteinnachweis im Western Blot hergestellt. Wie in der Abbildung 25 zu sehen ist, zeigt die angereicherte Fraktion (HT1080 x Egr-1) ein sehr starkes Signal im Vergleich zur Durchfluß Fraktion, die eine schwache spezifische Bande bringt und zur nicht transfizierten Kontrolle, die kein Signal zeigt.

In einem weiteren getrennten Ansatz wurden die Fibrosarkomzellen nach der Zellsortierung erneut ausgesät um Überstände für den Kollagennachweis im Western Blot sammeln zu können. Trotz der Behandlung mit β -Aminopropionitril war ein Proteinnachweis nicht möglich.

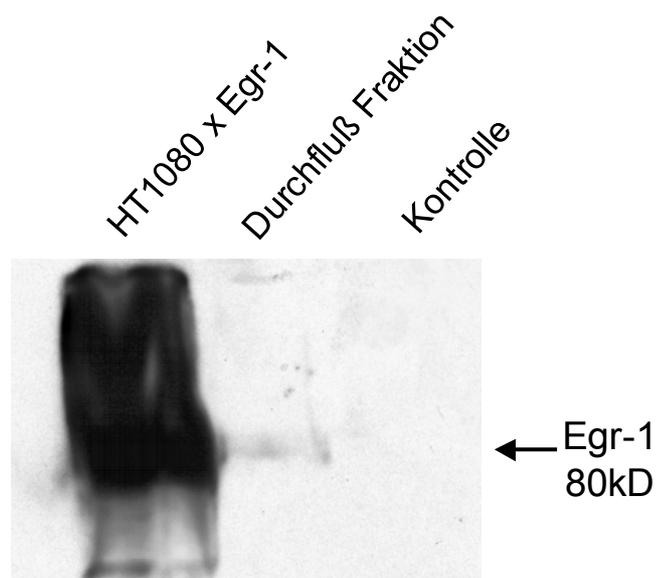


Abb. 25 Maus-Egr-1 Proteinnachweis in Fibrosarkomzellen, die mit dem pcDNAxEgr-1 und dem pMACS K^x II Vektor transient ko-transfiziert und anschließend selektiert wurden, mittels Western Blotting.

3.12 Transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (EcR-293)

Die Folgen einer Egr-1 Überexpression wurden weiterhin anhand eines induzierbaren Expressionssystems getestet.

Für dieses System wurden humane embryonale Nierenzellen (EcR293), die konstitutiv die zwei Untereinheiten des Ecdyson-Rezeptors exprimieren, transient mit dem pIND Vektor, der den Ecdyson-induzierbaren Promotor, das Ecdyson-Response Element und das rekombinante murine Egr-1 trägt, transfiziert. Nach der Ligation der Hind III/EcoR I flankierten Egr-1 kodierenden Region (2,3 Kb) in den pIND Vektor (5 Kb), wurde die aus Mini-Präparationen stammenden Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen getestet.

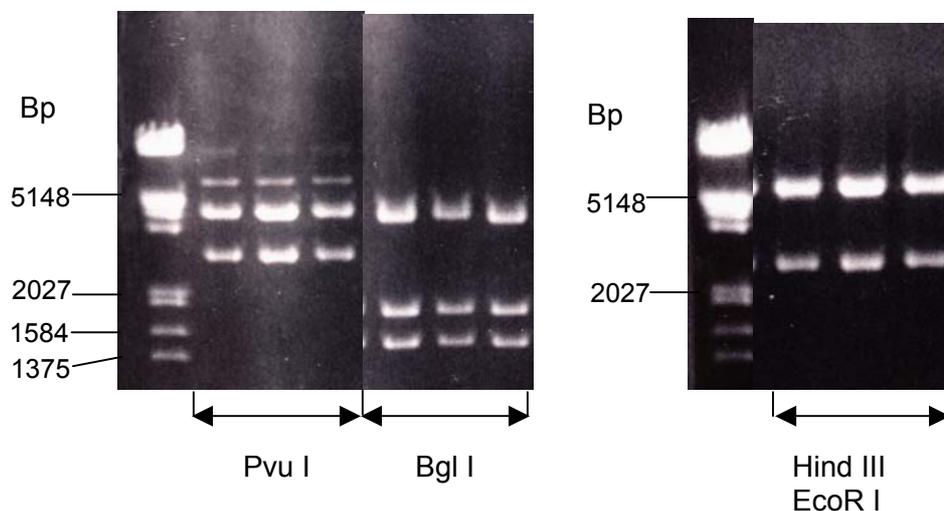


Abb. 26 Restriktionsverdau des pINDx Egr-1 Vektors. Der Verdau mit Pvu I, das einmal im Vektor und einmal im Insert schneidet, ergibt eine 4,5 und eine 2,8 Kb große DNA-Bande. Bgl I schneidet zweimal im Insert und einmal im Vektor, es resultieren 3 Banden (1,4; 1,8 und 4 Kb lang). Der Schnitt mit Hind III und EcoR I ergibt den 5 Kb großen Vektor und das 2,3 Kb große Insert.

Einerseits konnte das Insert mit Hind III und EcoR I herausgeschnitten werden, andererseits konnten mit Bgl I, das zweimal im Insert und einmal im Vektor schneidet und mit Pvu I, das einmal im Vektor und einmal im Insert schneidet, weitere Testverdaus durchgeführt werden (Abb. 26).

Die Restriktionsverdaus ergaben die erwarteten Banden, sodaß der pINDxEgr-1 Vektor zusammen mit dem pMACS K^k.II Plasmid (für die spätere Zellsortierung) für die transiente Transfektion der EcR-293 Zellen eingesetzt wurde. Nach der Zellselektierung wurde aus der positiven Zellfraktion, aus der Durchfluß-Fraktion und aus nicht transfizierten Zellen die RNA extrahiert und anschließend die cDNA-Synthese durchgeführt. Der quantitative Nachweis der Expression verschiedener Gene erfolgte mit Hilfe des Light Cyclers.

In Vorversuchen wurden die EcR-293 Zellen mit Ponasteron-Konzentrationen zwischen 1 und 10 µM (1, 2,5, 5, 10 µM) induziert. Eine von unterschiedlichen Ponasteron A Konzentrationen regulierte Egr-1 Expression konnte jedoch nicht beobachtet werden, die unten beschriebenen Experimente wurden mit einer Ponasteron A Konzentration von 2,5 µM durchgeführt. Während die nicht transfizierten embryonalen Nierenzellen (EcR-293), wie erwartet, kein Maus-Egr-1 exprimierten, konnte bei der Durchflußfraktion ein Quotient (m-Egr-1/GAPDH) von 124,9, bei der positiven angereicherten Egr-1 Fraktion von 1578 errechnet werden (Abb.27, links oben). Diese Ergebnisse zeigen, dass während der Zellsortierung einige mit Egr-1 transfizierte Zellen verloren gingen, allerdings ist ein 12,6-facher Unterschied zwischen den beiden Zellfraktionen in der Expression von Maus-Egr-1 noch relativ groß. Um die Ergebnisse aus den Experimenten mit den immortalisierten Fibroblasten und mit den transient transfizierten Fibrosarkomzellen auch in diesem System zu bestätigen, wurde die Kollagen-Expression untersucht.

Eine 77-fache Induktion der Kollagen I (α 1) Expression wurde in der angereicherten Egr-1 Fraktion gefunden im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle, die konstitutiv eine sehr niedrige Kollagen Typ I Expression aufwies (Abb. 27, links unten). Die Durchfluß Fraktion zeigte eine 43-fach

erhöhte Kollagen I ($\alpha 1$) Expression im Unterschied zur nicht transfizierten Kontrolle, was auf eine Dosis-Wirkung von Maus-Egr-1 hinweisen könnte.

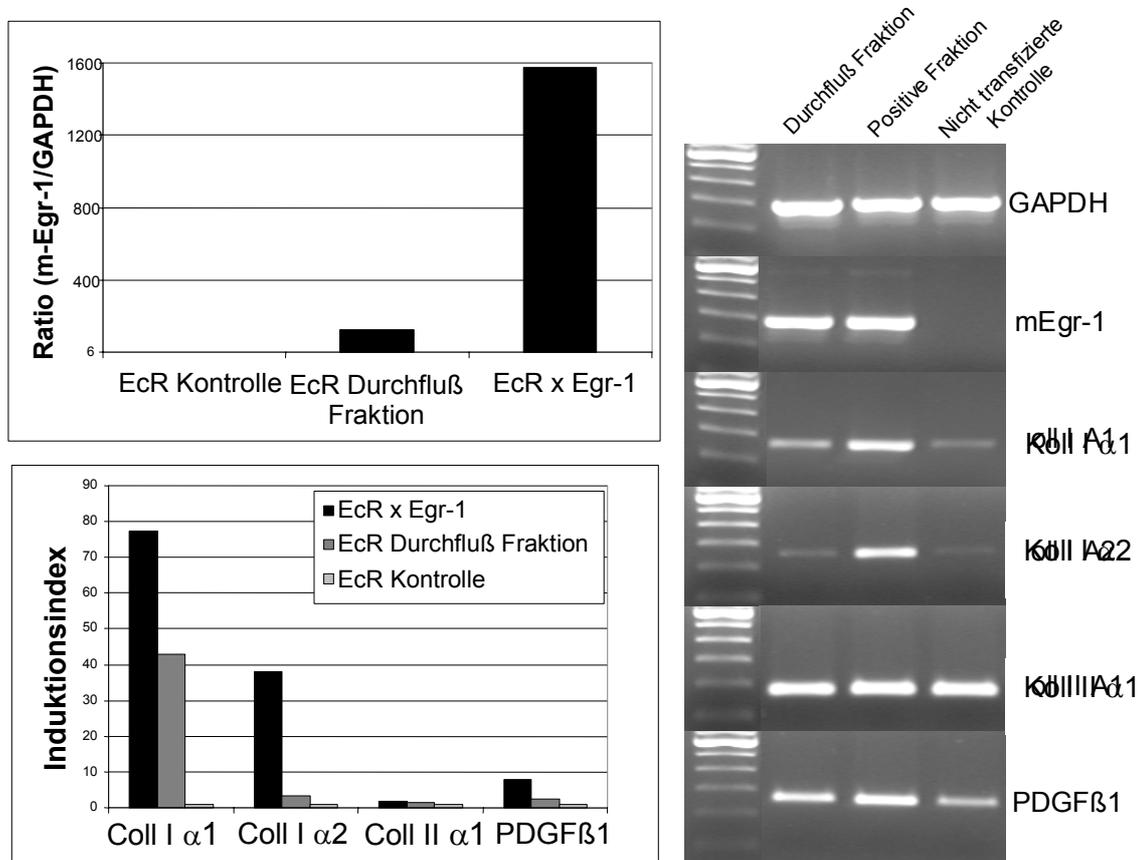


Abb. 27 Quantitative PCR-Analysen mit Hilfe des LightCyclers am Beispiel des Ecdysson-induzierbaren Expressions-Systems. EcR-293 Zellen wurden mit dem pINDxEgr-1 und dem pMACSK^K II Vektor ko-transfiziert und mit Ponasteron A induziert. Die Expression von Maus-Egr-1, Kollagen I ($\alpha 1$), Kollagen I ($\alpha 2$), Kollagen II ($\alpha 1$) und PDGF β 1 wurden in der nicht transfizierten Kontrolle, in der Durchfluß Fraktion und der angereicherten Egr-1 Fraktion untersucht.

Die $\alpha 2$ Kette von Kollagen I wurde in den embryonalen Nierenzellen noch schwächer exprimiert, eine transiente Transfektion mit Egr-1 brachte jedoch eine 38-fache Induktion im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle. In der Durchfluß Fraktion konnte nur eine 3-fach erhöhte Expression beobachtet werden. Bezogen auf die Kollagen Typ II ($\alpha 1$) Expression, zeigte die angereicherte Egr-1 Fraktion eine 1,9-fache und die Durchfluß Fraktion eine

1,4 fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle. Durch die zusätzliche Untersuchung der PDGF β 1 Expression sollte auch in diesem System die biologische Aktivität des rekombinanten Maus-Egr-1 getestet werden.

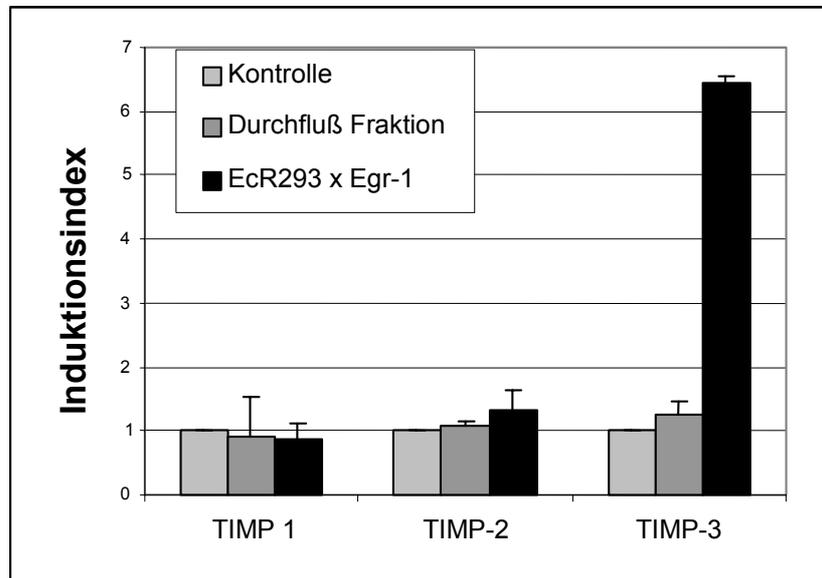


Abb. 28 Quantitative PCR-Analysen der TIMP-1, -2, -3 mRNA Expression mit Hilfe des LightCyclers in transient transfizierten EcR 293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen). Die positive, stark angereicherte Egr-1 Fraktion (EcR 293 x Egr-1) zeigte eine 6,5-fache Induktion der TIMP-3 Expression im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle. Der Induktionsindex stellt das x-fache an Induktion in dem Egr-1 überexprimierenden Fraktion (EcR 293 x Egr-1) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Eine 7,7-fach höhere PDGF β 1 Genexpression wurde in der angereicherten Egr-1 Fraktion gefunden, die Durchfluß Fraktion wies 2,4-fach höhere Transkriptlevels als die nicht transfizierte Kontrolle auf.

Die quantitative Untersuchung der TIMP-Gene ergab in diesem Expressionssystem eine 6,5-fache Induktion der TIMP-3 Expression in den Egr-1 überexprimierenden EcR 293 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 28).

Eine Egr-1 Überexpression korrelierte in diesen Zellen jedoch nicht mit einer Induktion der TIMP-1 und TIMP-2 Gene.

3.13 Funktionelle Analysen des TIMP-1 Promotors in Egr-1 über-exprimierenden Klonen

Wie oben beschrieben, korrelierte die Egr-1 Überexpression mit einer erhöhten TIMP-1 Expression. Diese Korrelation konnte nicht nur in den stabil transfizierten immortalisierten Fibroblasten sondern auch in transient transfizierten Fibrosarkomzellen gefunden werden. Diese Genregulation kann entweder direkt über die Promotor-Aktivierung oder indirekt über die Aktivierung anderer Faktoren erfolgen.

Das TIMP-1 Promotor-Fragment (551 Bp) wurde nach dem Klonieren in den pGL3 Vektor sequenziert. Es erfolgte der Sequenzvergleich mit der Genbank-Sequenz Y09720 (H. sapiens TIMP-1 Gen, Promotorsequenz und Exon 1 und 2). Der Sequenzvergleich ergab eine hohe Sequenzhomologie, dargestellt durch die durchgehende Diagonale (Abb. 29).

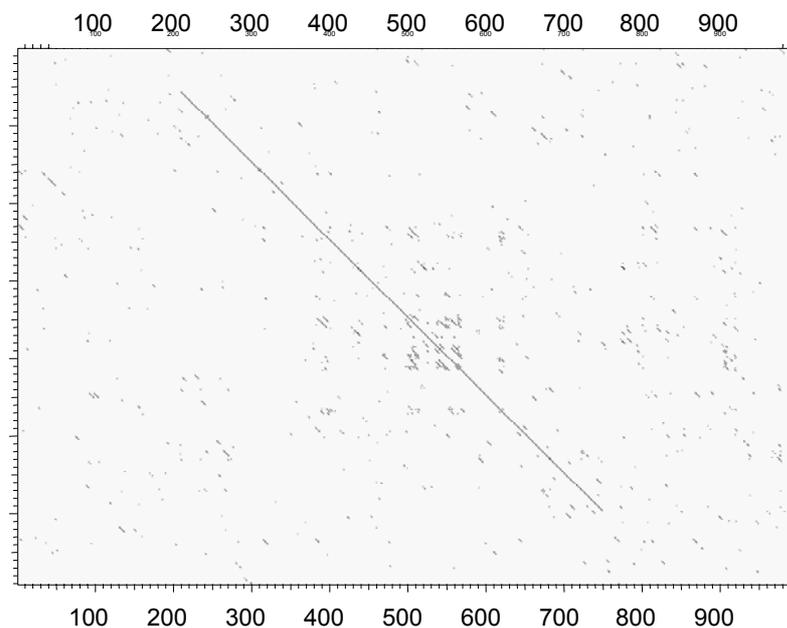


Abb. 29 Sequenzhomologie (Stringenz 7, Fenster 9, DNA Strider®) zwischen dem für die Luziferaseassays verwendeten TIMP-1 Promotor-Fragment und der Genbank-Sequenz Y09720 (H.sapiens TIMP-1 Gen, Promotorsequenz und Exon 1 und 2). Der Sequenzvergleich ergibt eine hohe Homologie im gesamten kodierenden Bereich von 551 Bp, dargestellt durch die durchgehende Diagonale.

Um herauszufinden, ob der Transkriptionsfaktor Egr-1 die TIMP-1 Expression durch die direkte Bindung an seinen Promotor induziert, wurden Egr-1 überexprimierende Zellen aus beiden Transfektionsserien und die entsprechenden Kontrollen transient mit dem TIMP-1 Wildtyp-Promotor bzw. mit der Promotor-Mutante (s. Material/Methoden) und dem pRL ϕ Vektor als Kontrollplasmid ko-transfiziert. Durch das Abgleichen der Renilla-Luziferase Aktivität auf die Firefly Luziferase Aktivität, konnten Variabilitäten, die durch eine unterschiedliche Vitalität der Zellen bzw. durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen verursacht wurden, minimiert werden.

In einer ersten Serie von Experimenten wurde die TIMP-1 Promotoraktivität in Klonen aus der ersten Transfektionsserie untersucht. Durch die Transfektion des Egr-1 überexprimierenden Klons (Klon 10) mit dem TIMP-1 Wildtyp-Promotor, ergab sich eine statistisch signifikante 2,6-fache Induktion der Promotoraktivität im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Klon 6), die mit dem gleichen Vektor transfiziert wurde (Abb. 30A). Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 Messungen, die mit Hilfe des ungepaarten t-Testes ermittelt wurden. Die Transfektion von Klon 10 mit der Promotor Deletions-Mutante brachte eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) der TIMP-1 Promotoraktivität um 38%. In einem wiederholt durchgeführten Experiment konnte durch die Transfektion mit dem TIMP-1 Wildtyp-Promotor erneut eine 3,7-fache Induktion der Promotoraktivität im Klon 10 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 30B). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Messungen. Die Deletion der Egr-1 Bindungsstelle reduzierte auch diesmal die Promotorstärke um 37%, dies war jedoch wegen der hohen Schwankungen im t-Test nicht signifikant. Die transiente Transfektion der Kontrolle (Klon 6) mit der TIMP-1 Promotor-Mutante führte jedoch zu keiner Veränderung im ersten Ansatz bzw. zu einem minimalen Anstieg der TIMP Promotoraktivität im zweiten Ansatz.

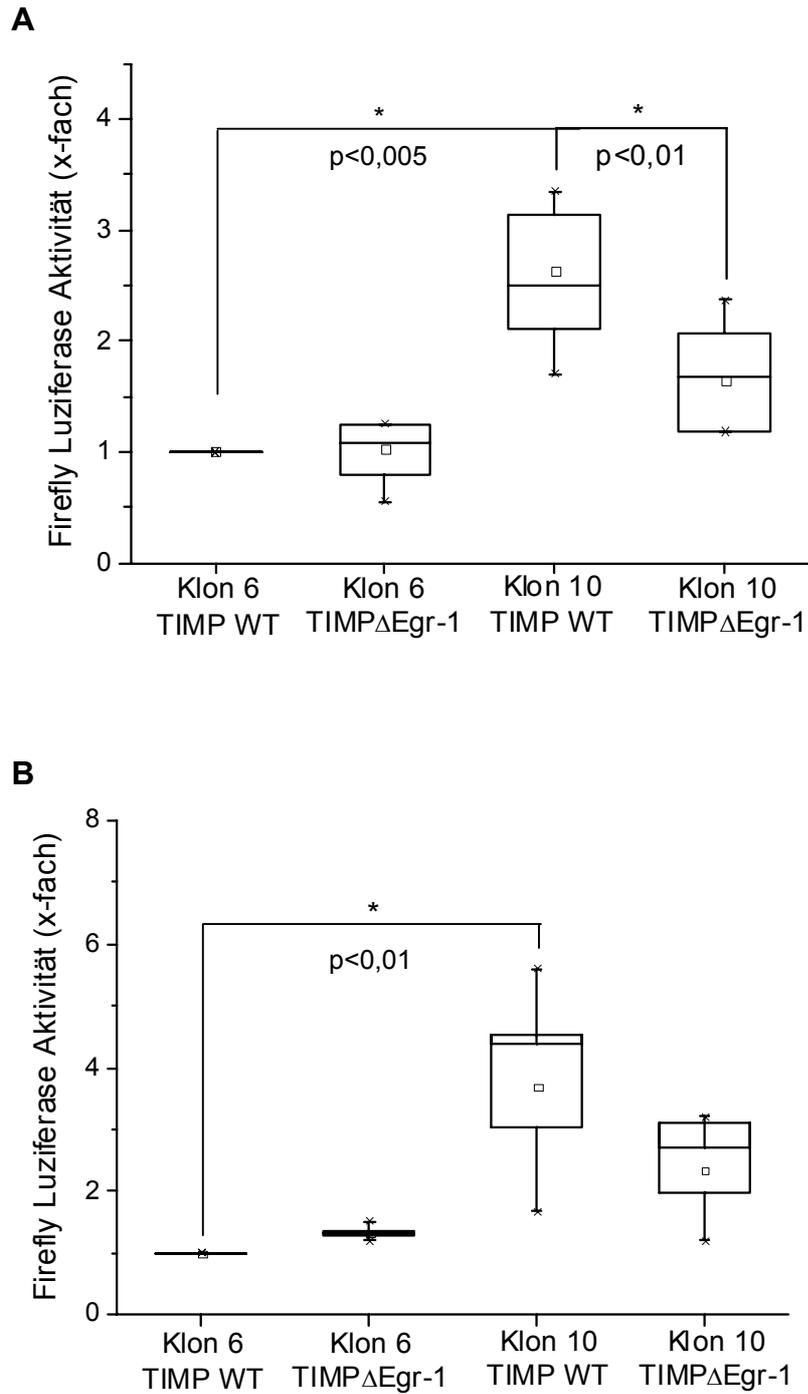


Abb. 30 TIMP-1 Promotoranalysen in Klonen aus der ersten Transfektionsserie. Im ersten Ansatz wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 Messungen (A), im zweiten Ansatz von 5 Messungen (B) dargestellt. Die Promotorstärke wurde jeweils zu der mit dem Wildtyp Promotor transfizierten Kontrolle (Klon 6 TIMP WT) in Relation gesetzt. Die Veränderung der Promotoraktivität wurde im ungepaarten t-Test auf die statistische Signifikanz untersucht.

In einer zweiten Serie von Experimenten wurde die TIMP-1 Promotoraktivität in Klonen aus der zweiten Transfektionsserie untersucht. Die Promotoranalysen wurden auch mit diesen Zellen in 2 Ansätzen durchgeführt.

Im ersten Ansatz brachte die Transfektion mit dem TIMP-1 Wildtyp-Promotor eine statistisch signifikante, 1,7-fache Induktion der TIMP-1 Promotoraktivität im Klon 3+/85 im Vergleich zur anti-sense Kontrolle (3-/76), die mit dem gleichen Vektor transfiziert wurde. Die Transfektion mit der Promotor-Mutante brachte eine Reduktion der Promotoraktivität um 32% (Abb. 31A).

Im wiederholt durchgeführten Ansatz zeigte sich nach der Transfektion mit dem TIMP-1 Wildtyp Promotor eine 1,6-fache, statistisch signifikante Induktion der Promotoraktivität im Egr-1 überexprimierenden Klon (3+/85) im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (3-/76). Die transiente Transfektion mit der Promotor-Mutante brachte eine signifikante ($p < 0,01$) Reduktion der Promotoraktivität um 26% (Abb. 31B). Auch in diesen Ansätzen führte die Transfektion der Kontrolle (3-/76) mit der Promotor-Mutante nicht zu einer Reduktion sondern eher zu einem kleinen Anstieg der Promotoraktivität.

Zusammenfassend ergab sich anhand der Luziferaseassays, dass eine transiente Transfektion beider Egr-1 überexprimierenden Klone mit dem TIMP-1 Wildtyp Promotor zu einer statistisch signifikanten gesteigerten Promotoraktivität, führte. Die transiente Transfektion mit der Deletions-Mutante brachte bis auf einen Ansatz jeweils eine statistisch signifikante Reduktion der TIMP-1 Promotoraktivität, im Gegenteil zu den Kontrollen, bei denen die Promotoraktivität durch die Transfektion mit der Promotor-Mutante eher leicht angestiegen oder gleich geblieben war.

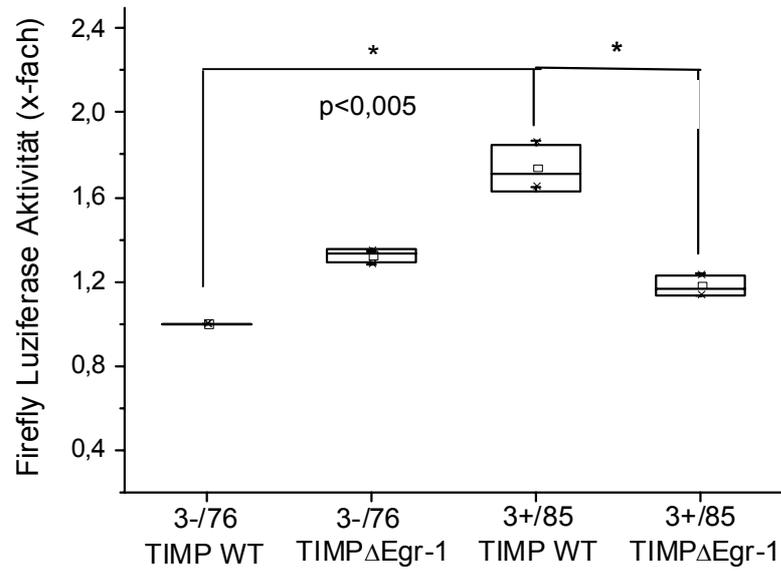
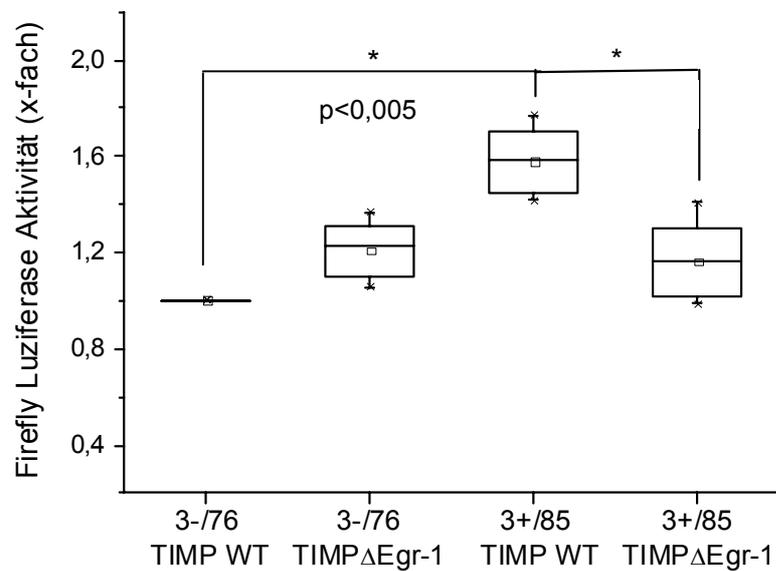
A**B**

Abb. 31 TIMP-1 Promotoranalysen in Klonen aus der zweiten Transfektionsserie. Im ersten Ansatz wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Messungen (A), im zweiten Ansatz von 6 Messungen (B) dargestellt. Die Promotorstärke wurde jeweils zu der mit dem Wildtyp Promotor transfizierten Kontrolle (3-/76 TIMP WT) in Relation gesetzt. Die Veränderung der Promotoraktivität wurde im ungepaarten t-Test auf die statistische Signifikanz untersucht.

3.14 Transduktion der murinen embryonalen Fibroblasten Zelllinie (NIH3T3)

Eine weitere Methode um ein bestimmtes Gen stabil in das Genom der Wirtszelle zu integrieren ermöglicht die Transduktion mit Retroviren. Für diesen Zweck wurde das retrovirale bicistronische Expressionssystem (pLXIN) ausgewählt. Nach der Ligation der von Hind III und EcoR I flankierten, für Maus-Egr-1 kodierende Region (2,3 Kb) in den pLXIN Vektor (6,1 Kb), wurde die Integration durch Testverdaus und die richtige Orientierung durch eine kurze Ansequenzierung überprüft.

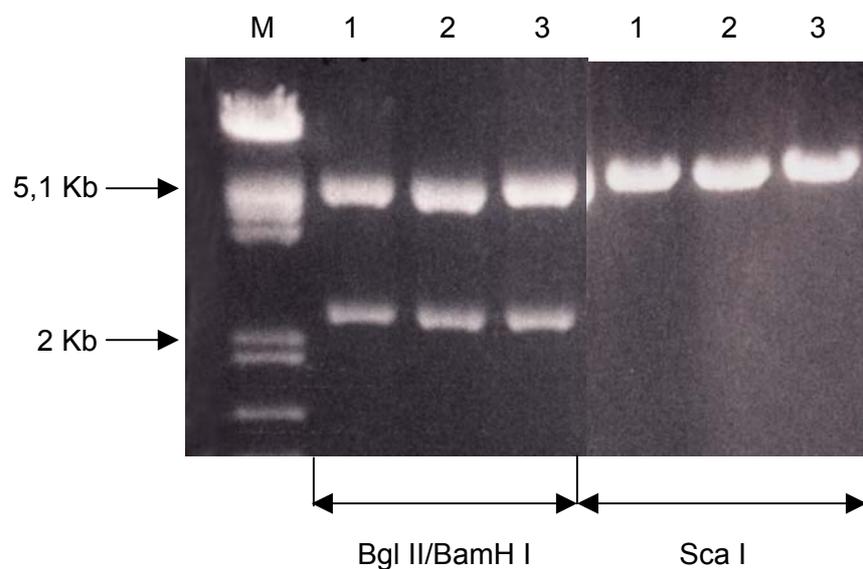


Abb. 32 Restriktionsverdau der aus drei Kolonien gewonnenen Plasmid-DNA.

Der pLXINx*Egr-1* Vektor wurde mit *Bgl II* und *BamH I* geschnitten. Dieser Probeverdaus ergab zwei Banden: die Vektorbande (6,1 Kb) und die Insert Bande (2,3 Kb). Mit *Sca I* wurde der 8,4 Kb große pLXINx*Egr-1* Vektor linearisiert.

Aufgrund dessen, dass die Hind III und EcoR I Restriktionsstellen durch das Einfügen von glatten Enden verloren gegangen sind, wurde der Testverdaus mit *Bgl II*, das im *Egr-1* Gen an Position 61 schneidet und im pLXIN Vektor keine Schnittstelle hat, und mit *BamH I*, das im pLXIN Vektor an Position 1486 schneidet und im *Egr-1* Gen keine Schnittstelle besitzt, durchgeführt.

Auf dieser Weise konnte das eingefügte Egr-1 Fragment, jetzt etwa 55 Bp kleiner, im 1%-igem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Außerdem wurden die Plasmide mit Sca I linearisiert (Abb. 32).

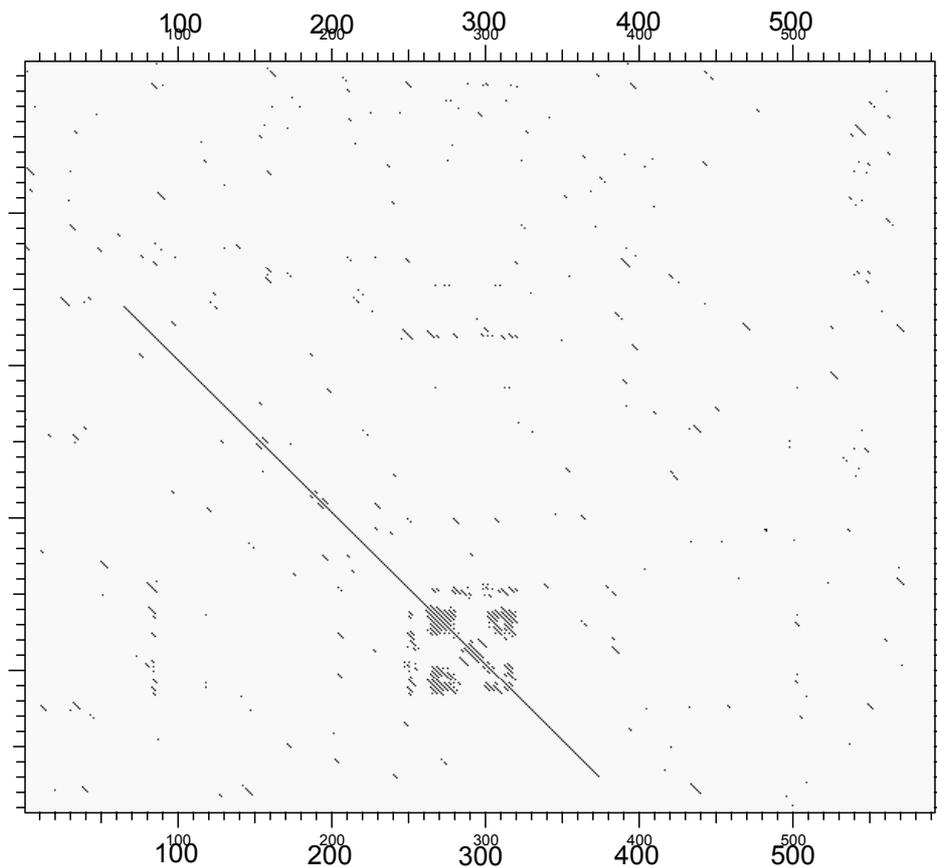


Abb. 33 Sequenzhomologie (Stringenz 7, Fenster 9, DNA Strider®) zwischen der Genbank-Sequenz der murinen m-RNA (NM_007913) und der Plasmid-DNA pLXINxEgr-1 (Kolonie 3) nach einer kurzen Ansequenzierung der ersten 350 Basenpaare. Durch die kurze Ansequenzierung konnte die richtige Orientierung der eingefügten DNA überprüft werden.

Nach der Sequenzierung der aus Mini-Präparationen stammenden Plasmid-DNAs, zeigte die DNA aus der Kolonie 3 die richtige Orientierung des Inserts sowie eine starke Sequenzhomologie zum Maus-Egr-1 Gen (Abb. 33). Um die Funktionalität des in den pLXIN Vektor eingefügten Egr-1 Gens im Western Blot zu überprüfen, wurden Fibrosarkomzellen (HT1080) mit diesem Vektor transient transfiziert und anschließend mit dem MACS-

Sortierungssystem selektiert. Die positive, angereicherte pLXINxEgr-1 Zellfraktion wurde im SDS-Gel aufgetragen und zeigte ein deutlich starkes Signal auf der Höhe von 80 Kd gegenüber der nicht transfizierten Kontrolle, die kein spezifisches Signal ergab (Abb. 34).

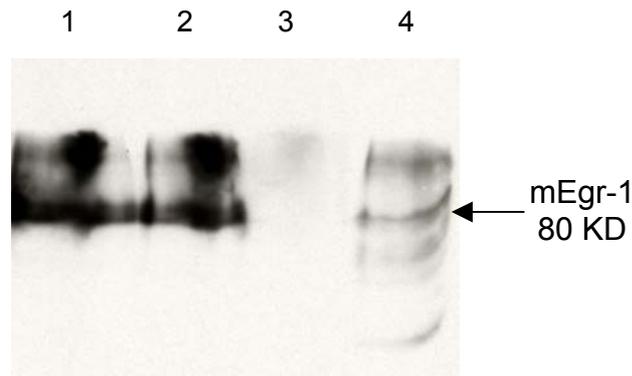


Abb. 34 Maus-Egr-1 Proteinnachweis in mit dem pLXINxEgr-1 Vektor transient transfizierten Fibrosarkomzellen (Geltasche 1 und 2). Die nicht transfizierte Kontrolle brachte kein spezifisches Signal (Geltasche 3). Als Negativkontrolle wurde ein Zellysat der immortalisierten Fibroblastenzelllinie (HSESV40) aufgetragen (Geltasche 4).

Die Transfektion der Verpackungszelllinie (RetroPackTM PT67) mit dem pLXINxEgr-1 Vektor sowie die folgenden Selektionsschritte und die Infektion der embryonalen Maus-Fibroblasten mit Virusüberständen erfolgte, wie im Teil Material/Methoden schon erwähnt, im S2 Labor von Dr. T. Pap in Magdeburg. Nach einer 2-3-wöchigen Neomycin-Selektion der mit Virusüberständen infizierten Maus-Fibroblasten (NIH3T3), erfolgte der quantitative Nachweis der Egr-1 m-RNA mit Hilfe des LightCyclers und die Proteindetektion im Western Blot. Abb. 35 zeigt die 50-fache Induktion der Maus-Egr-1 m-RNA in Maus-Fibroblasten, die mit pLXINxEgr-1 transduziert wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Wie in der Abb. 36 zu sehen ist, exprimierten die nicht transfizierten embryonalen Maus-Fibroblasten wie erwartet das Maus-Egr-1 Protein. Die transduzierten Maus-Fibroblasten zeigten jedoch ein deutlich stärkeres

Protein-Signal. Bei der Vektor-Kontrolle wurde nur ein schwaches Egr-1-Signal gefunden.

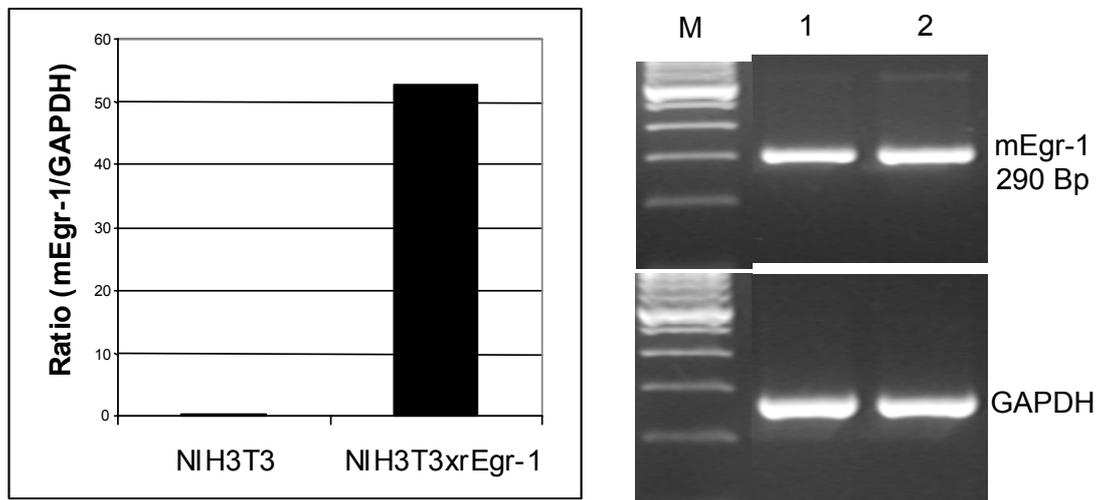


Abb. 35 Quantitativer Egr-1 mRNA Nachweis mittels LightCycler in unbehandelten Maus-Fibroblasten (NIH3T3) und in Zellen, die mit pLXINxEgr-1 transduziert wurden. Die zwei PCR-Produkte wurden auf das 1,5%-ige Agarosegel aufgetragen (M=Marker, 1= NIH3T3 Kontrolle, 2=NIH3T3xpLXINEgr-1).

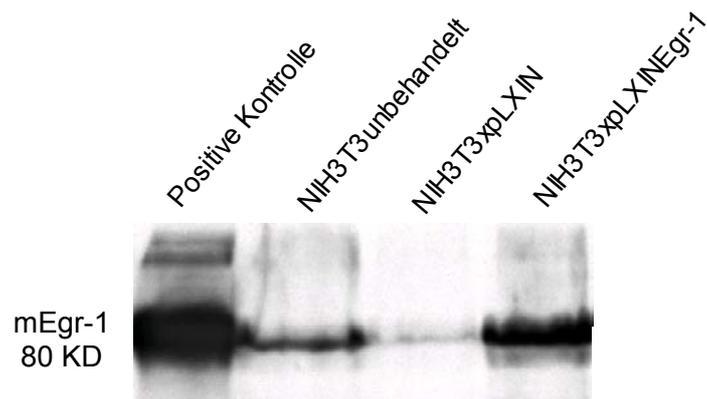


Abb. 36 Egr-1 Proteinnachweis mittels Western Blotting in unbehandelten Maus-Fibroblasten (NIH3T3) und in Zellen, die mit Retroviren, die entweder den pLXIN Vektor oder den pLXINxEgr-1 Vektor trugen, infiziert wurden. Als positive Kontrolle diente die mit Egr-1 stabil transfizierte Fibroblastenzelllinie.

3.15 Funktionelle Analysen des Kollagen Typ I Promotors in transduzierten Maus-Fibroblasten

Eine Egr-1 Überexpression korrelierte in den oben beschriebenen Experimenten sowohl in stabil als auch transient transfizierten Zellen mit einer erhöhten Expression des Typ I Kollagens. Um zu untersuchen, ob diese Genregulation über eine direkte Promotor-Aktivierung vonstatten geht, wurden Promotoranalysen durchgeführt.

Die aus humanen synovialen Fibroblasten amplifizierte Promotorregion des Typ I Kollagens ($\alpha 1$) wurde nach dem Klonieren in den pGL3 Basic Vektor sequenziert. Diese Sequenz wurde mit der Genbank-Sequenz X98705 (Homo sapiens DNA-Sequenz des Kollagen I ($\alpha 1$) Gens, fusioniert mit Intron 1 des PDGF-B Gens) verglichen. Es ergab sich über dem gesamten kodierenden Bereich eine hohe Sequenzhomologie, dargestellt durch die durchgehende Diagonale (Abb.37).

Die mit Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten, sowie die nicht transduzierte Kontrolle wurden transient mit dem Kollagen I Promotorkonstrukt transfiziert. Nach dem Abgleichen auf die Renilla-Luziferaseaktivität ergab sich in der nicht transduzierten Kontrolle (NIH3T3) eine 13-fache Induktion der Kollagen I Promotoraktivität. In den Egr-1 überexprimierenden Maus-Fibroblasten (NIH3T3xEgr-1) stieg die Kollagen I Promotoraktivität jedoch auf das 45-fache, was eine 3,3-fach höhere Induktion im Vergleich zur nicht transduzierten Kontrolle bedeutete (Abb. 38). Diese Tendenz konnte in einem wiederholt durchgeführten Ansatz bestätigt werden.

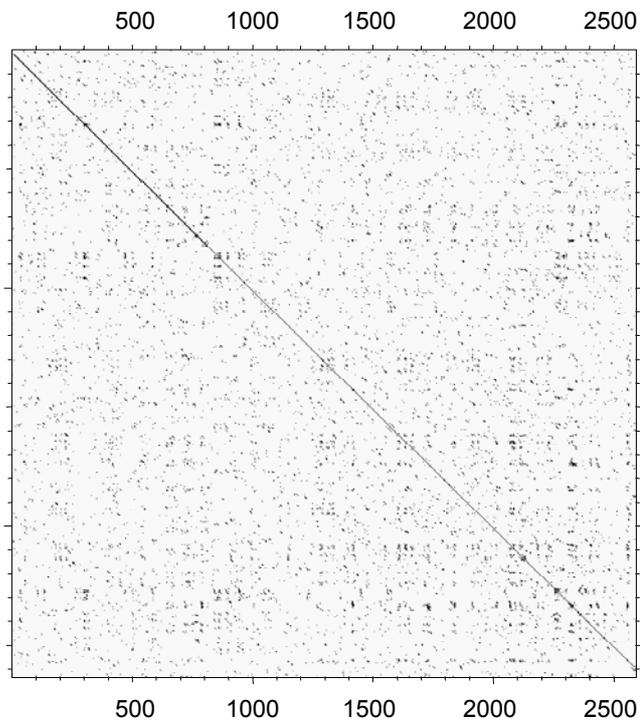


Abb. 37 Sequenzhomologie (Stringenz 7, Fenster 9, DNA Strider®) zwischen dem für die Luziferaseassays verwendeten Kollagen I ($\alpha 1$) Promotor und der Genbank-Sequenz X98705 (*H.sapiens* DNA Sequenz des Kollagen I ($\alpha 1$) Gens fusioniert mit Intron 1 des PDGF-B Gens). Der Sequenzvergleich ergibt eine hohe Homologie im gesamten kodierenden Bereich (2599 Bp), dargestellt durch die durchgehende Diagonale.

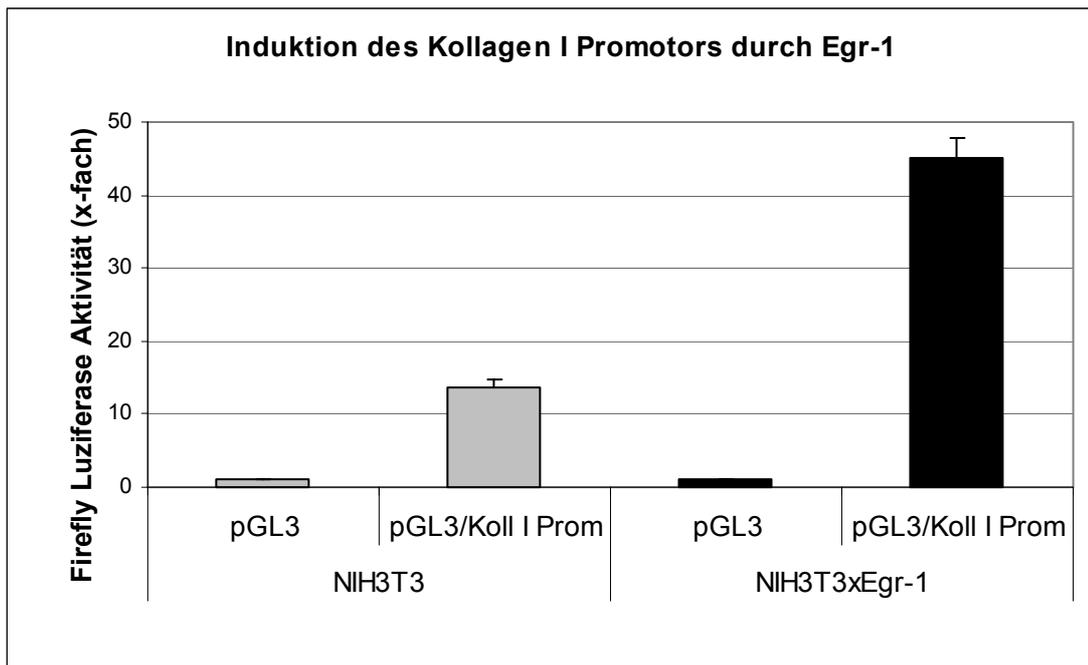
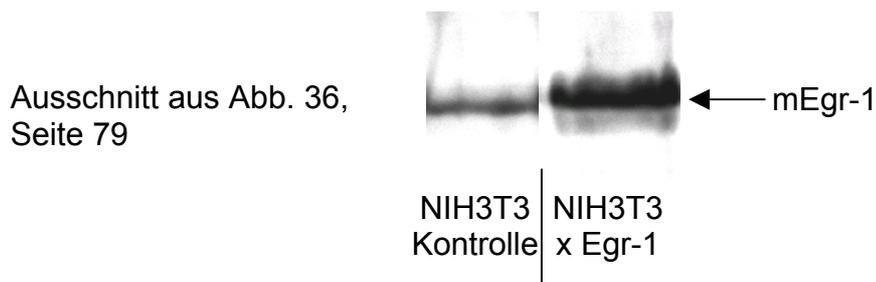


Abb. 38 Kollagen I Promotoranalysen in murinen embryonalen Fibroblasten. Die mit Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten (NIH3T3xEgr-1) sowie die nicht transduzierte Kontrolle (NIH3T3) wurden transient mit dem Kollagen I Promotorkonstrukt transfiziert. Nach dem Abgleichen auf die Renilla Luziferaseaktivität wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 Messungen dargestellt. In den Egr-1 überexprimierenden Zellen ergab sich eine 3,3-fach höhere Induktion der Promotoraktivität.

Diese Promotoruntersuchungen wurden kurze Zeit nachdem die embryonalen Maus-Fibroblasten mit Egr-1 transduziert wurden, durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ergab sich, wie im Kapitel davor erwähnt, eine 50-fach höhere Egr-1 Transkription in den transduzierten Zellen und auf Proteinebene ein viel stärkeres Signal als in der nicht transduzierten Kontrolle (siehe Ausschnitt aus Abbildung 36).



Zu einem viel späteren Zeitpunkt wurden durch verschiedene Restriktionsschnitte 3 Kollagen I Promotormutanten hergestellt (Δ 1-453; Δ 1671-2599; Δ 453-2599). Die mit Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten sowie die nicht transduzierte Kontrolle, die sich immer noch in Kultur befanden, wurden erneut, diesmal mit dem Wildtyppromotor und mit den 3 Promotormutanten, transient transfiziert. In der nicht transduzierten Kontrolle ergab sich eine 45-fache Induktion der Promotoraktivität durch die transiente Transfektion mit dem Wildtyppromotor (Abb. 39).

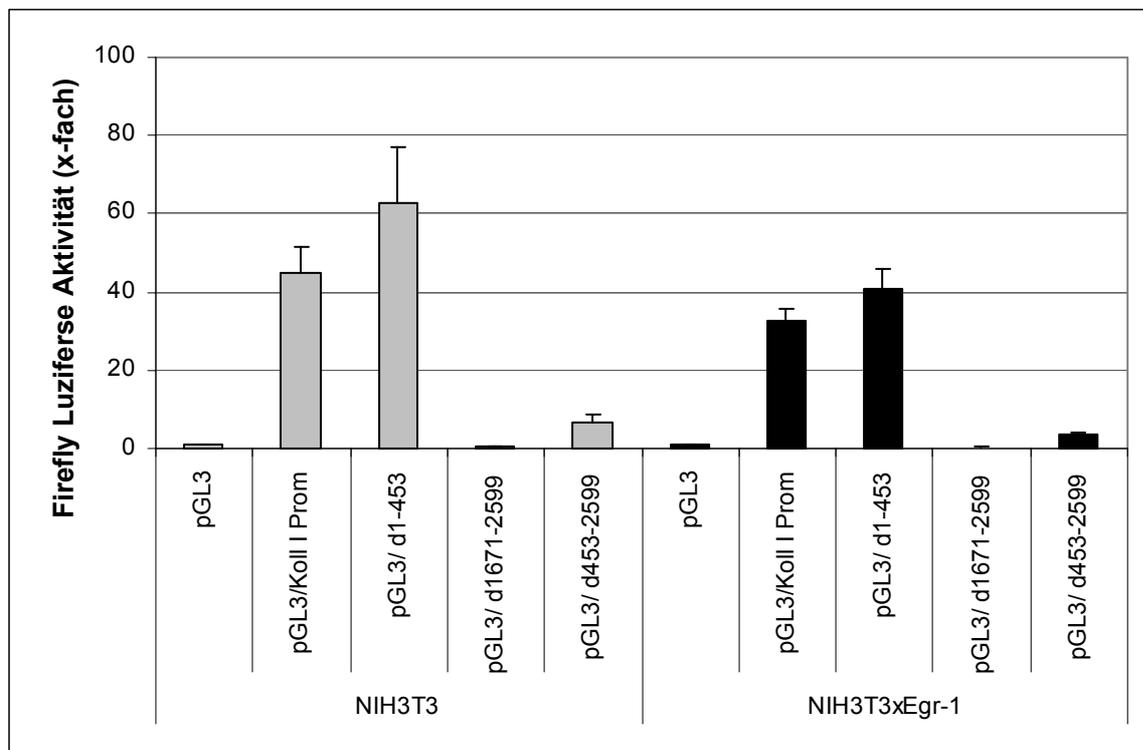


Abb. 39 Promotoranalysen in nicht transduzierten sowie in Egr-1 transduzierten murinen embryonalen Fibroblasten mit dem Kollagen I Wildtyppromotor und den drei hergestellten Mutanten (Δ 1-453; Δ 1671-2599; Δ 453-2599). Nach dem Abgleichen auf die Renilla Luziferaseaktivität wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Messungen dargestellt. Die grauen Balken stellen die Promotoraktivität in der nicht transduzierten Kontrolle (NIH3T3), die schwarzen Balken die Promotoraktivität in den Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten (NIH3T3xEgr-1).

Die Transfektion mit der Mutante $\Delta 1-453$ ergab eine noch stärkere 62-fache Induktion der Promotoraktivität, im Gegensatz zur Transfektion mit der Mutante $\Delta 1671-2599$, die zu einer kompletten Inhibierung der Promotoraktivität führte. Die transiente Transfektion mit der Mutante $\Delta 453-2599$ brachte eine 6,5-fache Induktion im Vergleich zur pGL3 Kontrolle (Abb. 39). Die transiente Transfektion der Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten mit dem Kollagen I Wildtyppromotor brachte lediglich eine 32-fach gesteigerte Promotoraktivität und stieg auf das 41-Fache nach der Transfektion mit der ersten Mutante ($\Delta 1-453$). Auch in diesen Zellen ergab sich nach der Transfektion mit der Mutante $\Delta 1671-2599$ eine komplette Inhibierung der Promotoraktivität und eine schwache, 3,6-fache Induktion nach der Transfektion mit der dritten Mutante ($\Delta 453-2599$) (Abb. 39). Insgesamt zeigte die transiente Transfektion der nicht transduzierten als auch der Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten mit dem Kollagen I Wildtyppromotor und den drei Mutanten den genau gleichen Einfluß auf die Promotoraktivität. Es wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass die Induktion der Promotoraktivität in Egr-1 überexprimierenden Maus-Fibroblasten stärker ist als in der nicht transduzierten Kontrolle. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Egr-1 transduzierten Zellen im Laufe der Passagen das rekombinante Egr-1 verloren haben oder dass das rekombinante, stark exprimierte Egr-1 das zelleigene Gen supprimiert. Die Untersuchung der zum gleichen Zeitpunkt hergestellten Proteinextrakte bestätigte diese Vermutung. Die zwei Zelllinien unterschieden sich nicht mehr stark in ihrer Proteinexpression (Abb. 40).

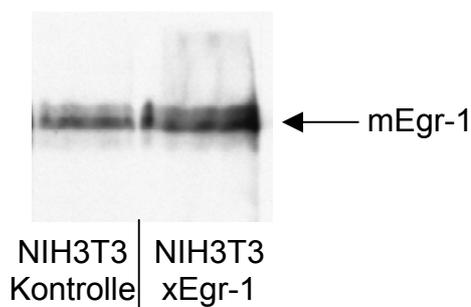


Abb. 40 Untersuchung der Egr-1 Proteinexpression in murinen embryonalen Fibroblasten zum Zeitpunkt der zweiten Serie von Promotoruntersuchungen mit dem Kollagen I Wildtyppromotor und den drei hergestellten Promotormutanten, mittels Western Blotting.

Aus diesem Grund wurden die Promotorexperimente mit einer frisch aufgetauten, früheren Passage der Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten (NIH3T3) wiederholt. Diese unterschied sich bezogen auf die Maus-Egr-1 Proteinexpression deutlich von der nicht transduzierten Kontrolle (Abb. 41).

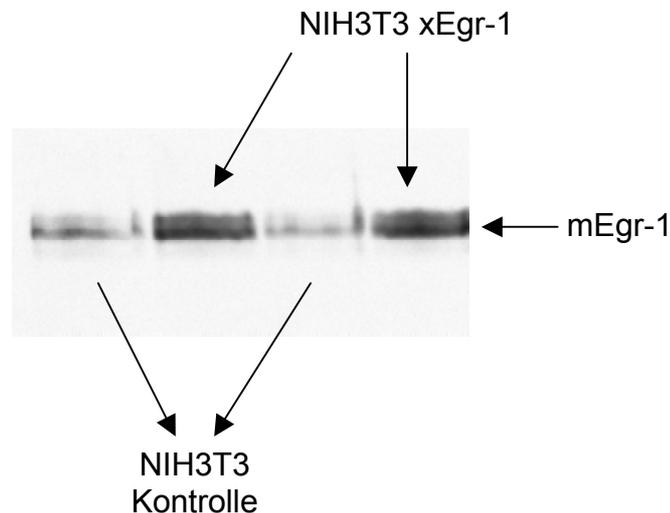


Abb. 41 Maus-Egr-1 Proteinexpression in einer frisch aufgetauten, frühen Passage der transduzierten Maus-Fibroblasten vs. unbehandelte Kontrolle mittels Western Blotting.

Die transiente Transfektion der Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten mit dem Kollagen I Wildtyppromotor als auch mit den Promotormutanten brachte jedoch auch in diesem Fall sehr ähnliche Ergebnisse wie in der Abb. 39 dargestellt. Die Induktion der Kollagen I Promotoraktivität in Egr-1 überexprimierenden Maus-Fibroblasten fiel nicht stärker aus als in der nicht transduzierten Kontrolle. Nach der Transfektion mit der Mutante $\Delta 1671-2599$ konnte ebenfalls bei transduzierten als auch bei nicht transduzierten Maus-Fibroblasten eine komplette Inhibierung der Promotoraktivität beobachtet werden. Die transiente Transfektion mit der Mutante $\Delta 453-2599$ führte ebenfalls zu einer schwachen Induktion der Kollagen I Promotoraktivität, die sich jedoch in transduzierten und in unbehandelten Zellen nicht deutlich unterschied. Daraus wurde der Schluß gezogen, dass der Transkriptionsfaktor Egr-1 die Genexpression der $\alpha 1$ -Kette des Typ I Kollagens nicht durch einen direkt am Promotor wirkenden Mechanismus beeinflusst.

4. Diskussion

Die Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis (RA) ist durch eine synoviale Hyperplasie, pathologische Immunphänomene und eine progressive Gelenkzerstörung gekennzeichnet. Viele Zelltypen, darunter T- und B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und synoviale Fibroblasten sind in die Pathogenese der RA involviert. Die Überexpression von angiogenen Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) führt zur Proliferation und Migration von synovialen Endothelzellen, die in einer vermehrten Angiogenese sowie im Einstrom von Entzündungszellen in das Synovium resultiert (Koch et al., 2000; Neidhart et al., 1999). T-Zellen dominieren in Entzündungsinfiltraten der RA, weiterhin sind $CD68^+$ Makrophagen und B-Zellen stark vertreten. Synoviale $CD4^+$ T-Zellen exprimieren CD69, einen frühen Aktivierungsmarker. Zirkulierende T-Zellen von RA-Patienten zeigen nur selten diesen Aktivierungsmarker, sodass angenommen wird, dass die T-Zellen erst im RA-Synovium aktiviert werden (Weyand, C.M., 2000). Obwohl zahlreiche Hinweise auf eine Aktivierung und dadurch auf eine entscheidende Rolle der T-Zellen bei der RA bestehen, ist deren Bedeutung bei der Pathogenese der RA immer noch nicht ganz geklärt. Die Verabreichung von monoklonalen Anti-CD4-Antikörper brachte in einer Plazebo-kontrollierten Multi-Center-Studie bei RA-Patienten keine signifikante Verbesserung der Krankheit mit sich (Wendling et al., 1998).

In zunehmendem Maße besteht die Evidenz, dass die Zerstörung des Gelenkknorpels auch unabhängig von Entzündungszellen durch aktivierte synoviale Fibroblasten vonstatten geht (Franz et al., 1998). Weitere Hinweise dafür finden sich im SCID (severe combined immuno-defficient)-Mausmodell, in dem synoviale Fibroblasten von RA-Patienten zusammen mit gesundem Knorpel unter die Nierenkapsel der Tiere koimplantiert werden. Die synovialen Fibroblasten wachsen in den Knorpel tief ein und zerstören diesen in ähnlicher Weise, wie dies im humanen Gelenk von RA-Patienten zu beobachten ist (Müller-Ladner et al., 1996).

Die Frage, inwieweit die synoviale Hyperplasie einer Tumorerkrankung ähnlich ist, bleibt nach wie vor offen. Es ist nicht klar, ob synoviale

Fibroblasten von Rheuma-Patienten transformiert sind im Sinne einer Vorstufe zur Krebszelle. Die geringe Proliferationsrate in vivo wie in vitro spricht gegen eine solche Transformation (Aicher et al., 1994; Konttinen et al., 1989). In synovialen Fibroblasten sind aber zahlreiche Proto-Onkogene heraufreguliert (Müller-Ladner et al., 1995). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle innerhalb zellulärer Signalkaskaden und in der Wachstums- und Apoptosekontrolle. Mutiert ein solches Proto-Onkogen, so kann es unter Umständen zum Onkogen werden und die betreffende Zelle entwickelt sich zur Krebszelle. Die Expression eines Proto-Onkogens muß jedoch nicht heissen, dass die Zelle transformiert ist, sondern dies deutet auf eine zelluläre Aktivierung hin (Varmus, 1985).

Ein Tumorsuppressorgen, dessen Funktionsverlust ein häufiges Kennzeichen von malignen Tumoren ist, ist das p53. Unter seiner Kontrolle durchläuft die Zelle entweder den programmierten Zelltod oder der Zellzyklus wird angehalten, um die Reparatur des Genoms zu ermöglichen. In mehr als 50% aller Karzinome ist p53 mutiert und dadurch die Einleitung der Apoptose gestört (May, P. und May, E., 2000). Eine starke Expression von p53 im synovialen Lining und darüber hinaus p53-Mutationen im rheumatoiden Synovium konnten Firestein et al. (1996, 1997) nachweisen. Andere Untersuchungen konnten jedoch weder eine Überexpression von p53 noch p53-Mutationen im synovialen Lining bestätigen (Kullmann et al., 1999; Lee et al., 2000).

Ein weiteres Tumorsuppressorgen, PTEN, zeigte bei RA-Patienten eine andere Gewebeverteilung als im normalen Gewebe auf, war jedoch nicht vermehrt exprimiert (Pap et al., 1999). Während PTEN im normalen Gewebe in der Lining Schicht exprimiert wird, zeigten die Zellen der Sublining Zone des hyperplastischen RA-Synoviums PTEN-spezifische Signale. PTEN-Mutationen konnten in diesem Gewebe jedoch nicht nachgewiesen werden. Aktuell wird eher vermutet, dass die synoviale Hyperplasie durch eine verminderte Apoptose der Zellen verursacht wird. Dafür würde einerseits die verminderte Proliferationsrate der synovialen Fibroblasten und andererseits die geringe Apoptoserate, die mittels Elektronenmikroskopie in diesen Zellen

detektiert werden konnte (Matsumoto et al., 1996). Eine starke Expression des anti-apoptotischen Moleküls Sentrin, zeigte sich im RA-Gewebe, in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten in vitro und in den Knorpel-invadierenden Zellen im SCID-Mausmodell (Franz et al., 2000). Im Gegensatz hierzu, wiesen Kontrollgewebe bzw. kultivierte Zellen von Osteoarthritis-Patienten und normale Hautfibroblasten nur geringe Sentrin-Signale auf. Sentrin hemmt die Übertragung der Signale der Todesdomäne-assoziierten Proteine wie TRADD und FAD. Sentrin-positive Fibroblasten sind dadurch resistent gegen die TNF- und Fas-induzierten Apoptose.

Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-1 spielen eine Schlüsselrolle bei der Progression von entzündlichen Gelenkserkrankungen, was zahlreiche Studien bisher belegten (Feldmann et al., 1996; Brennan et al., 1998). Die Blockade von TNF- α oder IL-1 reduziert die Inflammation und kann z. T. die Erkrankung kontrollieren sowohl bei Patienten mit RA (Maini et al., 1998; Bresnihan et al., 1998; Sekut et al., 1998; Moreland et al., 1999; Keystone, 1999) als auch in verschiedenen Tiermodellen der Arthritis (Van De Loo et al., 1995; Joosten et al., 1996; Kuiper et al., 1998; Bendele et al., 1999; McComb et al., 1999, Feige et al., 2000). Viele Studien weisen darauf hin, dass TNF- α und IL-1 in vitro auf synergistische Weise die Inflammation unterhalten können. Gemeinsam induzieren sie die Produktion des Plasminogen-Aktivators in humanen Chondrozyten (Campbell et al., 1990), der Kollagenase und Prostaglandins E₂ (Meyer et al., 1990; Berenbaum et al., 1996), der IL-6 (Harigai et al., 1991) und der IL-8 Produktion in humanen synovialen Fibroblasten (Rathanaswami et al., 1993). Dieser Synergismus resultiert vermutlich aus pro-inflammatorischen Feedback-Loops, durch die IL-1 die TNF- α Produktion induziert und umgekehrt.

In verschiedenen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2) die Aktivität des Transkriptionsfaktors Egr-1 induziert (Dieckgraefe und Weems, 1999; Wung et al., 1999). Shi et al. (2002) untersuchten ob die ERK1/2 abhängige Aktivierung von Egr-1 zur LPS-stimulierten TNF- α Produktion in Maus-Makrophagen (RAW 264.7) beiträgt. Sie berichteten, dass die LPS-induzierte ERK1/2 Aktivierung

erforderlich ist für die LPS-stimulierte TNF- α Gen- und Proteinexpression. Weiterhin konnten sie demonstrieren, dass die LPS-stimulierte Aktivierung von ERK1/2 die Bindungsaktivität von Egr-1 an den Maus TNF- α Promotor steigerte. Eine weitere Studie berichtete von einem ähnlichen Einfluß von ERK1/2 und Egr-1 auf die LPS-stimulierte TNF- α Produktion, diesmal in der humanen Makrophagen Zelllinie THP-1 (Guha et al., 2001). Kishore et al. (2002) zeigten, dass eine LPS-Aktivierung der ERK1/2 und Egr-1 Expression zu einer erhöhten TNF- α Produktion in den Kupferzellen von Ratten nach chronischer Ethanol-Fütterung beiträgt. Andererseits zeigten Grimbacher et al. (1998), dass nach Stimulation der synovialen Fibroblasten mit TNF- α die Egr-1 Expression induziert wird. Diesen Daten zufolge, könnte TNF- α ein möglicher Aktivierungsfaktor der Egr-1 Expression im rheumatoiden Synovium darstellen. Sicherlich sind an der spezifischen Aktivierung der synovialen Fibroblasten mehrere Faktoren beteiligt. So spielt IL-1 ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Ähnlich können auch weitere Interleukine einen aktivierenden Einfluß auf die Synoviozyten haben. Granet und Miossec berichteten, dass TNF- α , IL-1 und IL-17, wenn sie allein oder in niedrigen Konzentrationen verwendet werden, nahezu keinen Effekt auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Egr-1, AP-1 und NF κ B in Osteoblasten hatten (2003). Die Kombination dieser Zytokine jedoch, zeigte einen synergistischen Effekt auf die Transkription und die nukleäre Translokation der drei Transkriptionsfaktoren. Es wäre demnach denkbar, dass Egr-1-, AP-1- und NF κ B-vermittelte Mechanismen auf kombinierte synergistische Effekte von pro-inflammatorischen Zytokinen sehr sensibel reagieren.

Die Aufklärung der Ursachen und Mechanismen, die zur Aktivierung synovialer Fibroblasten im Pannus führen, trägt zum Verständnis der Ätiologie der RA bei. Für diesbezügliche Untersuchungen wird synoviales Gewebe von Rheuma-Patienten, die sich meistens in einer späten, chronischen Phase der Krankheit befinden, verwendet, sodass die Folgen von den Ursachen der chronischen Entzündung nur schwer zu unterscheiden sind. Eine jahrelange Medikation der Patienten kann die Ergebnisse beeinflussen.

Arbeiten mit Primärkulturen werden zusätzlich dadurch erschwert, dass sie aus Mischpopulationen von makrophagen- und fibroblastenähnlichen Zellen bestehen. In den ersten Subkulturen verschiebt sich das Gleichgewicht immer mehr in Richtung Monokultur, eine Weiterpassagierung der Zellen geht jedoch mit einer drastischen Abnahme der Lebensdauer und mit einer kontinuierlichen Veränderung der Genexpression einher. Die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie, die mit dem rekombinanten Maus-Egr-1 transfiziert werden konnte, erleichterte die Arbeiten zur Charakterisierung dieses Transkriptionsfaktors. Nach der SV40 Transfektion zeigten die synovialen Fibroblasten weiterhin eine fibroblastoide Morphologie, die Zellen wurden jedoch viel kleiner und sie zeigten unabhängig von mitogenen Stimuli eine konstante Proliferationsrate. Die nähere Charakterisierung der immortalisierten synovialen Fibroblasten ergab eine fehlende Expression von VCAM-1 und dem Fibroblasten-assoziierten Antigen Thy-1 sowie eine verringerte Expression der PDGF-, IL-1 und TNF- α Rezeptoren (Dissertation Ch. Haas, Freiburg, 1996; Lemaire et al., 1994). Diese Veränderungen, sowie das Fehlen bestimmter Oberflächenmarker deutet auf eine zumindest partielle Dedifferenzierung der Zellen, die für SV40 TAg transfizierte humane Fibroblasten schon beschrieben wurde (Saito et al., 1991; Lemaire et al., 1994). Gleichzeitig zeigten die immortalisierten Fibroblasten Gemeinsamkeiten zur nativen Zelllinie: eine ähnliche Expression von ICAM-1, CD44 und Fas konnte detektiert werden, weiterhin fand sich keine Änderung im Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors Egr-1. Die Induzierbarkeit von Egr-1 sowie des MHC-II Rezeptors (HLA-DR) durch IFN- γ , was ein weiteres Indiz für den erhaltengebliebenen Phänotyp darstellte, blieb unverändert (Haas et al., 1997). Aufgrund dieser Analysen, der hohen Proliferationsrate dieser Zellen und der Tatsache, dass sich die Primärfibroblasten als weder transfizierbar noch selektionierbar erwiesen, wurde die immortalisierte Fibroblastenzelllinie für die aus der vorliegenden Arbeit geplanten Experimente ausgesucht.

Um die Folgen der Egr-1 Überexpression in humanen synovialen Fibroblasten zu untersuchen und Gene zu identifizieren, die durch diesen

Transkriptionsfaktor reguliert werden, wurde im ersten Teil der Arbeit die immortalisierte Fibroblasten-Zelllinie mit dem rekombinanten Maus-Egr-1 stabil transfiziert. Das für Egr-1 kodierende Maus-Gen enthält drei ATTTA Sequenzen, die für die mRNA Instabilität verantwortlich sind. Um Egr-1 kodierende mRNA mit längerer Halbwertszeit zu erhalten, wurden die AUUUA Sequenzen aus dem Maus-Egr-1 Gen entfernt, die DNA Bindungseigenschaften des rekombinanten Genes im Gelretardationsexperiment bestätigt und die funktionelle Egr-1 Expression in B-Zellen der Maus und des Menschen geprüft (Dinkel et al., 1997).

Nachdem aus Vorarbeiten ein für die Genexpressionsanalyse geeignetes Klonpaar zur Verfügung stand (Klon 6 und 10), wurde eine zweite Transfektionsserie angeschlossen, diesmal mit einem anderen Vektor (pcDNA 3.1(+)/(-)), der eine sense bzw. anti-sense Orientierung des rekombinanten Maus-Egr-1 Genes, ermöglichte. Aus dieser Transfektionsserie ging ein weiteres Klonpaar hervor, der Egr-1 überexprimierende sense Klon 3+/85 und die anti-sense Kontrolle 3-/76. Als weitere Kontrolle wurde ein Vektor-Klon mitgeführt, der kein Maus-Egr-1 enthielt (VK3). Während der Egr-1 überexprimierende Klon 10 eine relativ stabile Egr-1 Expression sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene zeigte, verlor der Klon 3+/85 nach den anfänglichen Experimenten im Laufe weiterer Passagen die starke Egr-1 Expression. Es wäre denkbar, dass nach laufender häufiger Passagierung der CMV-Promotor, unter dessen Kontrolle das transfizierte Maus-Egr-1 in den Zellen zur Expression kommt, methyliert wird und die Transkription dadurch verringert wird. Komura et al. (1995) untersuchten den Effekt der DNA-Methylierung bestimmter Regionen auf die Expression dieser Gene in HeLa-Zellen und konnten dabei feststellen, dass durch Methylierung der Promotor- bzw. der zu transkribierenden Regionen, die Transkription der betreffenden Gene reprimiert wird.

Andererseits könnte es sich bei dem stabilen Klon 10 um eine Ausnahme-situation handeln, da das Egr-1 Gen möglicherweise multipel integriert wurde oder die Expression des Repressors NAB in irgendeiner Weise durch diese multiple Integration gestört worden ist.

Eine weitere interessante Beobachtung der vorliegenden Arbeit wurde hinsichtlich des Einflusses von Egr-1 auf die Proliferation gemacht. Eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors scheint in immortalisierten synovialen Fibroblasten mit einer Hemmung der Proliferation einherzugehen. Diese Wirkung von Egr-1 scheint jedoch zelltypspezifisch zu sein, denn beides, eine Suppression aber auch eine Aktivierung der Proliferation durch Egr-1 sind in der Literatur beschrieben. Einige Arbeiten zeigten, dass eine Überexpression von Egr-1 in transformierten Zellen das Wachstum hemmt und die Tumorbildung in Nackt-Mäusen inhibiert (de Belle et al., 1999; Huang et al., 1997; Huang et al., 1995). Die stabile Überexpression von Egr-1 in Osteosarkom-, Glioblastom- und Fibrosarkomzellen (HT1080) führte zu einer verringerten DNA-Synthese und zu einer Reduktion des Tumorwachstums um 40%. Aus diesem Grund schien es nicht überraschend, dass der Versuch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, Fibrosarkomzellen (HT1080) stabil mit Egr-1 zu transfizieren, erfolglos blieb. Die schlechte Selektionierbarkeit der Egr-1 Klone wurde vermutlich durch die proliferationshemmende Eigenschaft von Egr-1 bedingt. Weiterhin konnten Huang et al. (1995) nachweisen, dass die Egr-1 Bindungsdomäne erforderlich ist für die tumorsupprimierende Eigenschaft.

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen tumorsupprimierenden Eigenschaft von Egr-1, wurde in der Literatur mehrmals beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor Egr-1 in Prostata Tumorzelllinien überexprimiert wird und die Expressionsniveaus mit dem Grad der Malignität korreliert (Eid et al., 1998; Thigpen et al., 1996). Die Egr-1 Überexpression in primären Prostata Karzinomen ist vermutlich auf den häufigen Verlust seines Ko-Repressors NAB2 zurückzuführen (Abdulkadir et al., 2001). Dies scheint spezifisch für Prostata Tumorzellen zu sein, denn in Tumoren aus anderen Geweben (Mamma-Karzinom, Fibrosarkom, Glioblastom) scheint Egr-1 eher unterexprimiert zu sein (Huang et al., 1995; Huang et al., 1997; Calogero et al., 2001). Die transkriptionelle Regulation in den Prostata Tumorzellen, die konstitutiv hohe Egr-1 Proteinlevels zeigen, wurde von Virolle et al. (2003) mit Hilfe der Affymetrix Array Technologie gegen Zellen, bei denen aufgrund

der Zugabe von anti-sense Oligonukleotiden die Egr-1 Expression effizient gehemmt wurde, verglichen. In Anwesenheit der Oligonukleotide war Egr-1 drei Tage lang in Prostata Tumorzellen nicht detektierbar, im Gegensatz zur unveränderten Egr-1 Expression in Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt wurden. Solange die Egr-1 Expression inhibiert wurde, konnte eine starke Reduktion der Proliferationsrate beobachtet werden. Die weitere Beobachtung, dass die Expression von Zyklin D2 und dem G-alpha-12 Protein (die das Wachstum und die Zellzyklus Progression stimulieren) in den ersten drei Tagen inhibiert und die Synthese von Zyklin G2 und p19^{ink4d} (die die Zellzyklus Progression inhibieren) erhöht war, führte zu dem Schluß, dass Egr-1 über die Regulation dieser Gene sowie durch die Inhibition von CD95, das Zellwachstum beeinflusst. Eine weitere Arbeit berichtet von einer Egr-1 Überexpression beim Magen-Karzinom (Kobayashi et al., 2002). Die Autoren fanden eine signifikante Egr-1 Überexpression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene. Weiterhin zeigten kultivierte Tumorzellen mit hohem metastatischem Potential eine höhere Egr-1 Expression als die parentalen Zellen, sodaß vermutet wurde, dass Egr-1 eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese, Progression und Metastasierung des Magen-Karzinoms spielt.

Aufgrund dessen, dass Egr-1 zu einem frühen Zeitpunkt im apoptotischen Prozess induziert wird (Muthukkumar et al., 1995; Ahmed et al., 1996), ist zu erwarten, dass Egr-1 die Aktivierung der Gene, die an der Wachstumskontrolle involviert sind, vermittelt. Eine sehr interessante Arbeit von Nair et al. (1997) beschreibt eine Transaktivierung des p53 Promotors durch Egr-1. Die gesteigerten p53 mRNA und Protein Levels führten zu einer Zunahme der Egr-1-abhängigen Apoptose. Die Inhibition der p53 Funktion durch dominant-negative Mutanten verringerte andererseits die Egr-1-abhängige Apoptose. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die tumorsupprimierende Wirkung von Egr-1 auf den p53-vermittelten Zelltod zurückzuführen ist, während p53 Mutationen in Tumorzellen ihnen eine Resistenz gegenüber der Egr-1 induzierten Apoptose verleiht. Einen weiteren Nachweis für die

Interaktionen zwischen Egr-1 und p53 lieferte die Arbeit von Liu et al. (2001). Rekombinante p53 und Egr-1 Fusionsproteine komplexierten mit in vitro translatierten Egr-1 bzw. p53 Proteinen, was durch Immunpräzipitation detektierbar war. Ein p53 Protein, das im Kodon 154 eine Mutation aufwies, konnte nicht an Egr-1 binden, weiterhin waren intakte Zinkfinger-Domänen für diese Bindung erforderlich.

Egr-1 reguliert außerdem die Transkription von PTEN, eines weiteren Tumorsuppressor-Gens (Virolle et al., 2001), das in humanen Tumoren oft mutiert ist. Nach Bestrahlung fand man in Wildtyp-, aber nicht in Egr-1 Knockout-Mäusen, eine Aktivierung der PTEN mRNA und Proteinexpression, die zur Apoptose führte. Egr-1^{-/-} Mäuse, die ihre PTEN-Expression nicht regulieren konnten, waren resistent gegen die Bestrahlungs-induzierten Apoptose. Der Verlust der Egr-1 Expression, der, wie oben erwähnt oft bei Tumoren beobachtet wird, könnte zur Resistenz der Tumorzellen gegen Bestrahlung, beitragen.

In einer rezenten Arbeit haben de Belle et al. (2003) ein neues Egr-1 Zielgen kloniert und identifiziert, das sie als TOE1 bezeichneten (Target of Egr-1). Das Protein TOE1 stellte sich, durch die Induktion von p21 (ein Protein, das den Zellzyklus in der G1 Phase stoppt) und durch seine Fähigkeit die Kolonienbildung zu hemmen, als Inhibitor des Zellwachstums heraus.

Der Transkriptionsfaktor Egr-1 wird in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten im Vergleich zu Osteoarthrose-Patienten verstärkt exprimiert (Trabandt et al., 1992; Aicher et al., 1994). Aufgrund seiner Funktion als Teil des Transkriptionsapparates kommt Egr-1 eine bedeutende Rolle zu. Egr-1 könnte als erste Antwort der Zellen auf äußere Differenzierungssignale einen entscheidenden Einfluß auf den veränderten Phänotyp der Synoviozyten bei RA-Patienten haben. Eine Transformation der Synoviozyten im Sinne einer Vorstufe zur Krebszelle ist wegen der geringen Proliferationsrate der Zellen eher unwahrscheinlich. Nachdem die proliferationshemmende Wirkung von Egr-1 ausführlich erläutert wurde, könnte eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors diese Beobachtung unterstützen. Während eine Apoptose-Induktion von Egr-1 ausgehen könnte, wurde im RA-Synovium nur

eine geringe Apoptoserate detektiert. Andererseits könnte die proliferationshemmende Wirkung von Egr-1 auf der Induktion des neulich entdeckten Proteins TOE1, das den Zellzyklus inhibiert, basieren. Andererseits werden Prostata Tumorzellen, die konstitutiv eine Egr-1 Überexpression zeigen, zur Proliferation angeregt durch die Stimulation von Zyklin D2 und G-alpha-12 Protein. Das Gleichgewicht zwischen induktiven und hemmenden antagonistischen Prozessen gerät sowohl in Tumorzellen als auch in aktivierten Synoviozyten aus dem Gelenk von RA-Patienten aus den Fugen und ist in seiner Komplexität immer noch nicht ganz verstanden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors Egr-1 in stabil bzw. transient transfizierten Zelllinien mit einer erhöhten Kollagen I Expression korrelierte. Während gleichzeitig die Induktion von TIMP-1, dem Inhibitor der interstitiellen Kollagenase, in Zellen die Egr-1 überexprimierten, beobachtet werden konnte, wurde der Schluß gezogen, dass Egr-1 eine Rolle bei der Entstehung eines fibrosierenden Prozesses im Gelenk des Rheuma-Patienten, spielen könnte.

Auf die Tatsache, dass Egr-1 eine Rolle bei der Entstehung der Fibrose spielen könnte, wurde auch in verschiedenen anderen Studien hingewiesen. Yan et al. (1998) zeigten, dass Wildtyp-Mäuse unter Sauerstoffentzug den Gewebe-Faktor (TF) überexprimieren und Fibrin in den Lungen ablagern. Im Gegensatz hierzu zeigten homozygote Egr-1 defiziente Mäuse weder eine TF-Expression noch Fibrin-Ablagerungen. In einer erweiterten Studie (Yan et al., 2000) induzierten sie durch Sauerstoffentzug die Expression von Egr-1 und des Gewebe-Faktors (tissue factor – TF) in Wildtyp-Mäusen. Eine ähnliche Induktion konnten sie bei PKC β (Protein Kinase C β Isoform) defizienten Mäusen nicht beobachten. Eine Hypoxie-vermittelte Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK1/2) konnte ebenfalls bei Wildtyp-Mäusen, aber nicht bei PKC β defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Neben der Induktion des Gewebe-Faktors wurde gleichzeitig eine Fibrin-Ablagerung in den Lungen von Wildtyp-Mäusen unter hypoxischen Bedingungen unterstützt, jedoch nicht in PKC β defizienten Mäusen. Sie stellten daraufhin die Hypothese, dass eine Aktivierung der β Isoform der

Protein Kinase C zu einer Induktion der ERK1/2 und schließlich Elk-1 führt. Elk-1 bildet einen Komplex mit dem Serum-regulierten Faktor, was wiederum die Transkription von Egr-1 aktiviert. Eine direkte Hochregulierung des Gewebe-Faktors (TF) und anschließende Fibrin-Ablagerungen, die den Blutfluss in den Gefäßen verhindert, wären dann die Folge. Die Induktion der Gewebe-Faktor Expression durch Egr-1 ist in verschiedenen Zellen und im Tiermodell nachgewiesen worden (Cui et al., 1996; Mechtcheriakova et al., 1999; Yan et al., 2000; Guha et al., 2001).

McCaffrey et al. (2000) fand in humanen atherosklerotischen Gefäßläsionen eine Überexpression des Transkriptionsfaktors Egr-1 sowie vieler Egr-1 induzierbarer Gene. Weiterhin resultierte die Induktion der Atherosklerose in LDL-Rezeptor defizienten Mäusen durch eine fettreiche Diät in einer starken Erhöhung der Egr-1 Expression in der Aorta. Wachstumsfaktoren gehören auch zu den Zielgenen von Egr-1. In vitro Studien zeigten, dass Egr-1 an die Egr-1 Bindungsstellen innerhalb des Promotors von PDGF-A (Khachigian et al., 1996) und PDGF-B (Khachigian et al., 1995) bindet und deren Transkription induziert. TGF- β 1 und TGF- β 3 (transforming growth factor) stellen weitere putative Egr-1 induzierbare Wachstumsfaktoren dar, die wie PDGF in den atherosklerotischen Läsionen überexprimiert waren. Auch andere Studien belegten, dass in humanen (Nikol et al., 1992) und tierischen (Majesky et al., 1991) Gefäßläsionen TGF- β 1 m-RNA und Protein überexprimiert waren und dass die Inhibition von TGF- β 1 die fibroproliferative Antwort reduzierte (Wolf et al., 1994). Die Egr-1 Induktion von PDGF und TGF- β könnte in atherosklerotischen Läsionen zur Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen und zur Akkumulation von extrazellulärer Matrix beitragen. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von PDGF- β in Egr-1 überexprimierenden Klonen beobachtet werden, wobei das Expressionsniveau insgesamt sehr niedrig blieb. Eine durch Egr-1 induzierte TGF- β Expression konnte jedoch nur auf minimalen Niveau nachgewiesen werden (1,2 bis 1,4-fach).

Nakamura et al. (2002) konnte an einem Ratten-Modell der interstitiellen Fibrose zeigen, dass die Einführung eines DNA-Enzyms, das die Egr-1 RNA spaltet, zur Reduktion der Egr-1, TGF- β und Kollagen I Expression und somit zur verminderten interstitiellen Fibrose führte.

Santiago et al. (1999) untersuchte die Rolle von Egr-1 während der Proliferation und Wundheilung von glatten Muskelzellen. Sie stellten fest, dass die Inkubation der Zellen mit dem DNA-Enzym, das Egr-1 m-RNA spaltet, die Serum-induzierte Proliferationsrate reduzierte. Nach mechanischer Verletzung der glatten Muskelzellen sowohl im Zellkulturmodell als auch durch die Aufdehnung der Carotis mittels eines Ballon-Katheters, inhibierte die Einführung des DNA-Enzyms gegen Egr-1 die Regeneration des Gewebes. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Egr-1 nach mechanischer Verletzung der Gefäße, die Proliferation und Wundheilung der glatten Muskelzellen induziert. Bryant et al. (2000) untersuchten ebenfalls die Rolle von Egr-1 bei der Wundheilung. Nach Einführung der Egr-1 Plasmid-DNA, konnten sie eine Aktivierung der Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- β 1 und PDGF- α immunhistochemisch in den entsprechenden Regionen nachweisen. Diese Egr-1 induzierbaren Wachstumsfaktoren stimulierten im Tiermodell die Wundheilung (Benn et al., 1996; Corral et al., 1999; Eming et al., 1999). Weiterhin konnten sie eine erhöhte Kollagen I Produktion und eine verstärkte Angiogenese und Reepithelisation beobachten, was den natürlichen Heilungsprozess beschleunigte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verstärken ebenfalls die Vermutung, dass Egr-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Fibrose spielen könnte. Metalloproteinasen sind Enzyme, die Bestandteile der extrazellulären Matrix, vor allem Kollagene, degradieren. Eine gleichzeitige Induktion des Inhibitors der interstitiellen Kollagenase (TIMP-1) und der Kollagen I Expression würde das Gleichgewicht zwischen knorpelauf- und -abbauenden Prozessen, das im normalen, gesunden Gewebe besteht, zugunsten einer Fibrosierung stören. Während dem TIMP-1 einen wachstums-stimulierenden Einfluß auf eine Vielzahl von Zellen, u.a. auch auf humane Fibroblasten

zukommt (Hayakawa et al., 1992), könnte dieser Faktor die Proliferation des Pannusgewebes fördern. Die Zerstörung des Knorpels wird z.T. durch das invasive Wachstum von synovialen Fibroblasten verursacht. Tolboom et al. (2002) konnten eine Korrelation zwischen dem invasiven Wachstum von Synoviozyten und der MMP-1, -3 und -10 Expression in diesen Zellen finden. Der adenovirale Gentransfer der Proteinase-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3 reduzierte in Zellkultur-experimenten sowie im Tiermodell das invasive Wachstum von synovialen Fibroblasten. Die Zugabe von Marimastat, einem synthetischen Inhibitor der MMP's reduzierte ebenfalls das invasive Wachstum der Synoviozyten (Van der Laan et al., 2003).

Nachdem Vorarbeiten schon darauf hinwiesen, dass TIMP-1 ein Egr-1 induziertes Gen darstellt (Dissertation Ch. Haas, Freiburg, 1996), erfolgte der Nachweis in weiteren stabil transfizierten Klonen aus zwei Transfektionsserien sowie in transient transfizierten humanen Fibrosarkomzellen, in denen eine Egr-1 Überexpression ebenfalls mit einer erhöhten TIMP-1 mRNA Expression korrelierte. Darüber hinaus konnte in stabil transfizierten Klonen aus beiden Transfektionsserien der Nachweis erbracht werden, dass Egr-1 überexprimierende Klone (Klon 10 und 3+/85) stets höhere TIMP-1 Levels auch auf Proteinebene im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen zeigten. Die TIMP-1 Proteinexpression in transient transfizierten Fibrosarkomzellen war aufgrund der niedrigen m-RNA Expressionsniveaus im ELISA nicht nachweisbar. In transient transfizierten humanen embryonalen Zellen (EcR 293) war eine erhöhte Kollagen-, jedoch keine erhöhte TIMP-1 Expression detektierbar. Eine deutliche Induktion der TIMP-3 m-RNA Expression (6,5-fach) konnte in transient transfizierten EcR 293 Zellen gefunden werden, was darauf hinweisen könnte, dass die Egr-1 Genregulation zelltypspezifisch ist. Das Vorhandensein potentieller Bindungssequenzen reicht alleine nicht aus, um darüber entscheiden zu können, ob ein Gen von einem bestimmten Transkriptionsfaktor in einer bestimmten Zelle reguliert wird. Vielmehr ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Regulationsmechanismen dafür verantwortlich. So ist die Zugänglichkeit dieser Bindungssequenzen für einzelne Transkriptionsfaktoren je nach

Methylierungsgrad und Chromatinstruktur der DNA von entscheidender Bedeutung für diese Bindung.

Promotorstudien der vorliegenden Arbeit demonstrierten, dass Egr-1 die TIMP-1 Expression direkt durch Aktivierung des Promotors regulieren kann. Die Transfektion des Egr-1 überexprimierenden Klons (Klon 10) mit dem TIMP-1 Wildtyp-Promotor, ergab eine statistisch signifikante 2,6-fache Induktion der Promotoraktivität im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Klon 6), die mit dem gleichen Vektor transfiziert wurde. Die Deletion der putativen Egr-1 Bindungsstelle führte zu einer Reduktion der Egr-1 induzierten Promotoraktivität um 38%. Die transiente Transfektion der Klone aus der zweiten Transfektionsserie mit dem TIMP-1 Wildtyp-Promotor bzw. der Promotor-Mutante ergab die gleiche Tendenz mit dem Unterschied, dass die Aktivierung der Promotoraktivität etwas schwächer war. Aufgrund dessen, dass eine reproduzierbare Induktion der TIMP-1 Promotoraktivität in Egr-1 überexprimierenden Klonen und eine deutliche Reduktion dieser Induktion nach Deletion der Egr-1 Bindungsstelle beobachtet werden konnte, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Egr-1 die TIMP-1 Expression über einen direkt am Promotor wirkenden Mechanismus, reguliert. Ein weiteres Gen, das sich reproduzierbar in allen verwendeten Zelllinien durch eine erhöhte Egr-1 Expression induzieren ließ war TIMP-3, ein Inhibitor von Stromelysin und anderen MMP's. Allerdings sollen Promotoruntersuchungen den Wirkmechanismus noch abklären. Eine Induktion von TIMP-2 ließ sich lediglich in Klonen der ersten Transfektionsserie beobachten.

Der Regulation des Proteaseinhibitors TIMP-1 kommt bei der Pathogenese der RA eine besondere Bedeutung zu, da für die auftretende Knorpeldestruktion ein Ungleichgewicht zwischen Metalloproteinasen und deren Inhibitoren verantwortlich gemacht wird. Yoshihara et al. (2000) konnten im Rahmen einer größeren Patienten-Studie (97 RA-Patienten und 103 OA-Patienten) eine signifikant höhere Expression von MMP-1, -2, -3, -8, -9 und TIMP-1 in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten nachweisen. MMP-7 und -13 war nur in 45% der Synovialflüssigkeiten von RA-Patienten und in 20% der Synovialflüssigkeiten von OA-

Patienten detektierbar. Die molaren Verhältnisse der Gesamt-MMP's zu denen der Gesamt-TIMP's waren in RA-Patienten fünfmal höher als bei OA-Patienten, was darauf hinweist, dass ein Ungleichgewicht zwischen den Metalloproteinasen und deren Inhibitoren im Gelenk der RA-Patienten besteht und die Knorpeldestruktion verursacht. Während TIMP-1 überexprimiert ist, sind die anderen Protease-Inhibitoren weniger stark vertreten. Dass die in der vorliegenden Arbeit detektierte TIMP-1 Überexpression mit der Egr-1 Überexpression zusammenhängen könnte, zeigen ebenfalls in situ Hybridisierungen des Synovialgewebes, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Steffen Gay in Zürich durchgeführt wurden. Eine Koexpression beider Gene Egr-1 und TIMP-1 war in nahezu identischen Zonen des Linings und Sublinings zu finden. Im Gegensatz dazu waren in Gewebeschnitten von gesunden bzw. OA-Patienten deutlich schwächere Signale detektierbar (Aicher et al., 2003).

Die Regulation der Kollagen I Expression durch Egr-1 scheint jedoch nicht durch eine direkte Aktivierung des Kollagen I Promotors stattzufinden. In stabil transfizierten Klonen aus zwei Transfektionsserien, in transient transfizierten humanen Fibrosarkomzellen sowie in humanen embryonalen Nierenzellen korrelierte eine Egr-1 Überexpression mit einer erhöhten Kollagen I ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) Expression. Die transiente Transfektion der Klone aus der ersten Transfektionsserie (Klon 6/10) mit dem Kollagen I Promotor ergab jedoch, unerwarteterweise, eine viel stärkere Induktion der Promotor-aktivität in der Mock-Kontrolle (Daten nicht gezeigt), die sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene eine niedrige Egr-1 und Kollagen I Expression zeigte. Die Wiederholung der Promotorversuche im mit Egr-1 transduzierten Maus-Fibroblasten Modell (NIH3T3) brachte ebenfalls keine klaren Ergebnisse. In einem anfänglich durchgeführten Promotorexperiment war eine 3,3-fach höhere Induktion der Kollagen I Promotoraktivität in Egr-1 transduzierten Fibroblasten (45-fach) im Vergleich zur nicht transduzierten Kontrolle (13-fach) nachweisbar. Die relativ hohe Induktion der Promotor-aktivität in der nicht transduzierten Kontrolle deutet darauf hin, dass der Promotor durch viele andere Faktoren vermutlich ebenfalls reguliert wird. Denn im Gegensatz

zu den TIMP-1 Promotorexperimenten, bei denen die Klone nur mit einem Promotorfragment (das die Egr-1 Bindungsstelle beinhaltet) transfiziert wurden, erfolgte die Transfektion für die Kollagen I Promotorexperimente mit einem Konstrukt, das den gesamten Promotor-bereich des Kollagen I Gens enthielt. In diesem Fall können verschiedene Faktoren an die im Promotor enthaltenen regulativen Elemente binden und auf dieser Weise ebenfalls die Promotoraktivität beeinflussen. Bei Promotor-experimenten, die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurden, zeigte die nicht transduzierte Kontrolle nach Transfektion mit dem Kollagen I Wildtyp-Promotor sogar eine etwas stärkere Induktion als die Egr-1 transduzierten Fibroblasten. Die Untersuchung der Egr-1 Expression auf Proteinebene zeigte nahezu gleichstarke Signale bei den transduzierten Fibroblasten sowie bei der unbehandelten Kontrolle. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch die transduzierten Maus-Fibroblasten keine stabile Zelllinie darstellte. Nach Auftauen einer früheren Passage wurden die Promotorexperimente nochmals durchgeführt. Die Induktion der Kollagen I Promotoraktivität war diesmal in der transduzierten Zelllinie ebenfalls nicht höher als in der unbehandelten Kontrolle, obwohl sich beide Zelllinien auf Proteinebene deutlich unterschieden. Die Tatsache, dass die anfänglichen Promotorexperimente sich nicht reproduzieren ließen, deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Egr-1 die Kollagen I Expression vermutlich nicht über einen direkten, sondern eher über einen indirekten Mechanismus reguliert. Alternativ, könnte in dieser Zelllinie ein Egr-1 kooperierender Faktor, der für seine biologische Aktivität notwendig ist, fehlen. Ausserdem können Ergebnisse, die mit Hilfe eines Maus-Modells gewonnen wurden nicht direkt auf Regulationsmechanismen in humanen Zellen übertragen werden. Da allerdings die Promotoruntersuchungen im humanen System (Klon 6/10) ähnliche Ergebnisse wie im Maus-Modell brachten, liegt die Vermutung nahe, dass Egr-1 nicht direkt den Kollagen I Promotor beeinflusst.

Eine Induktion der α 1-Kette von Kollagen Typ II korrelierte mit der Egr-1 Überexpression in Klonen aus beiden Transfektionsserien, in transient transfizierten humanen Fibrosarkomzellen sowie in humanen embryonalen

Nierenzellen. Auch im Falle dieses Gens sollen zukünftige Promotoruntersuchungen den beteiligten Wirkmechanismus abklären. Die transienten Transfektionen der embryonalen Maus-Fibroblasten mit drei Promotormutanten brachten interessante Ergebnisse. Die Transfektion mit der Promotormutante $\Delta 1-453$ brachte eine sogar etwas stärkere Induktion der Promotoraktivität als mit dem Kollagen I Wildtyppromotor. Die Transfektion mit der Promotormutante $\Delta 1671-2599$ reduzierte die Firefly-Aktivität unter das Niveau der Kontrolle. Schließlich konnte nach der Transfektion mit der Promotormutante $\Delta 453-2599$ eine schwache Induktion der Promotoraktivität beobachtet werden, die jedoch etwa zehnmal schwächer war als diejenige, die nach der Transfektion mit der Promotormutante $\Delta 1-453$ detektiert wurde. Aus diesen Experimenten ging hervor, dass sich starke positive regulatorische Elemente im Segment 1671-2599, stark negative Regulations-elemente im Bereich 453-1671 und schwach-positive Elemente im Segment 1-453, befinden könnten. Genauere Untersuchungen des Kollagen I Promotors anhand weiterer Promotormutanten sollen zukünftig mehr Klarheit über seine Regulation in Fibroblasten verschaffen.

Artefakte bzw. Mutationen, die durch die Immortalisierung und die stabile Transfektion von Fibroblasten entstanden sein könnten, wurden in der vorliegenden Arbeit dadurch ausgeschlossen, dass weitere Zelllinien für transiente Transfektionen, die die Zellen weniger stark manipulieren, verwendet wurden. Allerdings stellt die Arbeit mit Tumorzelllinien weiterhin ein recht artifizielles Versuchsmodell dar, das sich in Bezug auf Genexpression und Morphologie vom primären Gewebe stark unterscheidet. Versuche, synoviale Fibroblasten der ersten Subkulturen von Rheuma- oder Osteoarthrose-Patienten mit dem rekombinanten Maus-Egr-1 zu transfizieren und anschließend zu selektieren, schlugen fehl, da nur eine minimale Transfektionseffizienz aufgrund der geringen Vitalität der Zellen erreicht werden konnte. Da Tumorzellen in der Regel sehr vital sind und auch unter schlechten Bedingungen überleben können, werden sie für Transfektionsversuche, die die Zellen einem gewissen Stress aussetzen, eingesetzt. Die Transfektion von nativen synovialen Fibroblasten würde

allerdings das besser geeignete System für Expressionsanalysen darstellen, da es schon eher der in vivo Situation entsprechen würde. Ein von der Firma Amaxa Systems neu entwickeltes Gerät verspricht eine schnelle und hoch-effiziente Methode für den Gentransfer. Diese Methode wurde speziell für Transfektionen von Primärkulturen und sich nicht teilenden, schwer transfizierbaren Zellen entwickelt. Mit Hilfe der Nucleofector™ Technologie soll ein direkter Transport der zu untersuchenden DNA in den Nukleus stattfinden, wodurch die Transfektion nicht mehr von der Zellteilung abhängig sein würde. Durch den direkten Transfer in den Zellkern wäre das transfizierte Gen schon kurz nach der Nukleofektion auf Proteinebene detektierbar. Nach Firmenangaben ergaben Untersuchungen an T-Zellen eine Transfektionseffizienz von 15% nach einer Stunde und bis zu 70% nach 16 h Inkubation. Dies würde Zeit- und Dosis-Kinetiken an nativen Zellen, die weniger stark manipuliert werden würden, ermöglichen und somit eine geeignetere Methode für Genexpressionsanalysen darstellen.

Zahlreiche Studien fokussierten bis jetzt in vitro Analysen von einzelnen Zielgenen in spezifischen Zellen unter definierten Versuchsbedingungen. Der nächste Schritt zur vollständigeren Aufklärung der biologischen Rolle des Transkriptionsfaktors Egr-1 ist die Identifizierung der in vivo Zielgene. Methoden wie die differentielle Genexpressionsanalyse und substraktive Hybridisierungs-Analysen ermöglichen die Identifizierung von Genen, die entweder über- oder unterexprimiert sind mit Hilfe von RNA-Pools aus Zellen, die das zu untersuchende Gen entweder über- oder unterexprimieren. Diese Methoden spiegeln demnach Expressionsänderungen bezogen auf eine bestimmte RNA-Message wieder, sie ermöglichen jedoch nicht die Selektierung direkter Zielgene, was der in vivo Situation eher entsprechen würde. Um neue Zielgene für den Transkriptionsfaktor Egr-1 zu identifizieren aber auch um ihnen eine in vivo Relevanz zu verleihen, eignet sich die Chromatin Immunpräzipitation, die schon andere Arbeitsgruppen für diesen Zweck erfolgreich verwendeten (de Belle et al., 2000). Mit Hilfe dieser

Methode ist nach Formaldehydfixierung die Isolierung der in vivo quervernetzten, protein-gebundenen DNA möglich.

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Egr-1 (immediately early gene response-1) gehört zu den DNA-bindenden Zinkfingerproteinen und stellt ein frühes Aktivierungsglied dar. Egr-1 ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene, die in inflammatorischen Prozessen involviert sind, reguliert. Möglicherweise spielen Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.

Wie frühere Arbeiten von Aicher et al. (1994) und Grimbacher et al. (1998) zeigten, wird Egr-1 in synovialen Fibroblasten von RA Patienten vermehrt exprimiert. Ziel der Arbeit war, Egr-1 stabil oder transient in synovialen Fibroblasten zur Überexpression zu bringen um seine regulatorische Wirkung auf die Egr-1 abhängige Genexpression direkt untersuchen zu können.

Für diese Versuche wurden synoviale Fibroblasten mit dem SV 40 large T-Antigen immortalisiert und mit dem rekombinanten Maus-Egr-1 stabil transfiziert. Nach der Überprüfung der Egr-1 Expression auf Transkript- und Proteinebene, wurden mittels differentieller Genexpressionsanalyse (RAP-PCR) Gene ausfindig gemacht, die in den entstandenen Klonen differentiell exprimiert wurden. Ein Gen, das in den Klonen stark unterschiedlich exprimiert wurde, zeigte nach dem Vergleich mit der Gen-Bank eine 100%ige Homologie mit der α 1-Kette des Typ I Kollagens.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zwei aus unterschiedlichen Transfektionsserien stammenden Klon-Paare mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf die Expression beider Ketten (α 1 und α 2) des Typ I Kollagens näher untersucht. In beiden Klon-Paaren korrelierte die Egr-1 Überexpression mit einer gesteigerten Kollagen Typ I Genexpression. Auf Proteinebene konnten sowohl mittels ELISA als auch Western Blotting höhere Kollagen I Expressionsniveaus im Egr-1 überexprimierenden Klon aus der ersten, nicht jedoch aus der zweiten Transfektionsserie nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in beiden Egr-1 überexprimierenden Klonen eine gesteigerte TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases), TIMP-3 und Kollagen Typ II Expression auf Transkriptebene beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass es sich bei der stabilen Transfektion um Klonierungsartefakte handelt, wurde eine transiente Transfektionsmethode an einer Fibrosarkom-Zelllinie (HT1080) etabliert. Auch in diesen Zellen korrelierte die Egr-1 Überexpression mit einer gesteigerten Kollagen Typ I und II sowie TIMP-1 und TIMP-3 Genexpression im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle oder zur Durchfluß-Fraktion, bei der die Expression dieser Gene ebenfalls auf niedrigem Niveau blieb.

Die Anwendung eines induzierbaren Ecdyson-Expressionssystems brachte ähnliche Ergebnisse wie bei der stabilen und der transienten Transfektion. Eine Egr-1 Überexpression in den humanen embryonalen Nierenzellen (EcR 293) korrelierte mit einer erhöhten Kollagen Typ I, Typ II und TIMP-3, jedoch nicht mit einer verstärkten TIMP-1 Genexpression.

Promotoruntersuchungen mit dem TIMP-1 Wildtypkonstrukt bzw. mit der Promotormutante, der die Egr-1 Bindungsstelle fehlte, bestätigte die Vermutung, dass Egr-1 die TIMP-1 Expression über einen direkt am Promotor wirkenden Mechanismus beeinflusst. Im Gegenteil dazu führten Promotorexperimente mit dem Kollagen I Wildtyppromotor bzw. mit verschiedenen Promotormutanten zu dem Ergebnis, dass Egr-1 die Kollagen I Expression womöglich nicht über einen direkten Mechanismus zu steuern scheint.

Weil in Egr-1 überexprimierenden Zellen gleichzeitig die Expression von Kollagen I, II und TIMP-1, dem Inhibitor der interstitiellen Kollagenase, induziert wurde, wurde angenommen, dass Egr-1 eine Rolle bei der Entstehung eines fibrosierenden Prozesses im Gelenk des Rheuma-Patienten, spielen könnte. Metalloproteinasen sind Enzyme, die Bestandteile der extrazellulären Matrix, vor allem Kollagene, degradieren. Eine gleichzeitige Induktion des Inhibitors der interstitiellen Kollagenase (TIMP-1) und der Kollagen I Expression würde das Gleichgewicht zwischen knorpel-auf- und -abbauenden Prozessen, das im normalen, gesunden Gewebe besteht, zugunsten einer Fibrosierung stören.

Diese Vermutung wird weiterhin durch andere Studien unterstützt, die dem Transkriptionsfaktor Egr-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der

interstitiellen Fibrose bei der Ratte (Nakamura et al., 2002) zukommen liessen. Die Einführung eines DNA-Enzyms, das die Egr-1 RNA spaltet, führte zur Reduktion der Egr-1, TGF- β und Kollagen I Expression und somit zur verminderten interstitiellen Fibrose.

Die weitere Aufklärung der detaillierten Signaltransduktionswegen, die spezifisch sind für das Krankheitsbild der RA, könnte in der Zukunft dazu führen, dass neue Therapieformen für die RA entwickelt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abdulkadir, S.A., Carbone, J.M., Naughton, C.K., Humphrey, P.A., Catalona, W.J., Milbrandt, J., 2001, Frequent and early loss of the EGR1 corepressor NAB2 in human prostate carcinoma, *Hum. Pathol.* 32: 935-939

Ahmed, M.M., Venkatasubbarao, K., Fruitwala, S.M., Muthukkumar, S., Wood, D.P., Sells, S.F., Mohiuddin, M., Rangnekar, V.M., 1996, Egr-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 271: 29231-29237

Aho, K., Koskenvuo, M, Tuominen, J., Kaprio, J., 1986, Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins, *J. Rheumatol.* 13: 899-902

Aicher, W.K., Alexander, D., Haas, C., Kuchen, S., Pagenstecher, A., Gay, S., Peter, H.H., Eibel, H., 2003, Transcription factor early growth response 1 activity upregulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum.* 48: 348-359

Aicher, W.K., Dinkel, A., Grimbacher, B., Haas, C., Seydlitz-Kurzbach, E., Hans, H.P., Eibel, H., 1999, Serum response elements activate and cAMP responsive elements inhibit expression of transcription factor Egr-1 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients, *Int. Immunol.* 11: 47-61

Aicher, W.K., Heer, A.H., Trabandt, A., Bridges, S.L., Schroeder, H.W., Stransky, G., Gay, R.E., Eibel, H., Peter, H.H., Siebenlist, U., Koopmann, W.J., Gay, S., 1994, Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients *J. Immunol.* 153: 5340-5348

Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J., Firestein, G.S., 1990, Cytokines in chronic inflammatory arthritis. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes, *J. Clin. Invest.* 86:1790-1798

Andersson, E.C., Hansen, B.E., Jacobsen, H., Madsen, L.S., Andersen, C.B., Engberg, J., Rothbard, J.B., Mcdevitt, G.S., Malmstrom, V., Holmdahl, R., Svejgaard, A., Fugger, L., 1998, Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4 restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7574-7579

Asahara, H., Fujisawa, K., Kobata, T., Hasunuma, T., Maeda, T., Asanuma, M., Ogawa, N., Inoue, H., Sumida, T., Nishioka, K., 1997, Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium, *Arthritis Rheum.* 40: 912-918

Bendele, A., McAbee, T., Sennello, G., Frazier, J., Chlipala, E., McCabe, D., 1999, Efficacy of sustained blood vessels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data, *Arthritis Rheum.* 42: 498-506

Benn, S.I., Whitsitt, J.S., Broadley, K.N., Nanney, L.B., Perkins, D.H.L., Patel, M., Morgan, J.R., Swain, W.F., Davidson, J.M., 1996, Particle-mediated gene transfer with transforming growth factor- β 1 cDNAs enhances wound repair in skin, *J. Clin. Invest.* 98: 2894-2902

Berenbaum, F., Jacques, C., Thomas, G., Corvol, M.T., Bereziat, G., Masliah, J., 1996, Synergistic effect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on PGE2 production by articular chondrocytes does not involve PLA2 stimulation, *Exp. Cell Res.* 222: 379-384

Biesiada, E., Razandi, M. and Levin, E.R., 1996, Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation, *J. Biol. Chem.* 271: 18576-18581

Brennan, F.M., Maini, R.N., Feldmann, M., 1998, Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis, *Springer Semin. Immunopathol.* 20: 133-147

Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J.M., Cobby, M., Doherty, M., Domljan, Z., Emery, P. et al., 1998, Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, *Arthritis Rheum.* 41: 2196-2204

Bromley, M., Woolley, D.E., 1984, Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint, *Arthritis Rheum.* 27: 968-975

Bryant, M., Drew, G.M., Houston, P., Hissey, P., Campbell, C.J., Braddock, M., 2000, Tissue repair with a therapeutic transcription factor, *Hum. Gene Ther.* 11: 2143-2158

Calogero, A., Arcella, A., De Gregorio, G., Porcellini, A., Mercola, D., Liu, C., Lombardi, V., Zani, M., Giannini, G., Gagliardi, M., Caruso, R., Gulino, A., Frati, L., Ragona, G., 2001, The early growth response gene EGR-1 behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas, *Clin. Cancer Res.* 7: 2788-2796

Campbell, I.K., Piccoli, D.S., Roberts, M.J., Muirden, K.D., Hamilton, J.A., 1990, Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 33: 542-552

Cao, X., Koski, R.A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C.F., Gaffney, R., Hay, R.V., Sukhatme, V.P., 1990, Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals, *Mol. Cell. Biol.* 10:1931-1939

Cao, X., Mahendran, R., Guy, G.R., Tan, Y.H., 1993, Detection and characterization of cellular Egr-1 binding to its recognition site, *J. Biol. Chem.* 268: 16949-16957

Chandrasekhar, S., Harvey, A.K., Hrubey, P.S., Bendele, A.M., 1990, Arthritis induced by interleukin-1 is dependent on the site and frequency of intraarticular injection, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 55:382-400

Christy, B.A., Lau, L.F., Nathans, D., 1988, A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with zinc finger sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7857-7861

Corral, C.J., Siddiqui, A., Wu, L., Farrell, C.J., Lyons, D., Mustoe, T.A., 1999, Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblast growth factor during ischemic wound healing, *Arch. Surg.* 134: 200-205

Cui, M.Z., Parry, G.C., Oeth, P., Larson, H., Smith, M., Huang, R.P., Adamson, E.D., Mackman, N., 1996, Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated Sp1 and EGR-1, *J. Biol. Chem.* 271: 2731-2739

Cunnane, G., Fitzgerald, O., Beeton, C., Cawston, T.E., Bresnihan, B., 2001, *Arthritis Rheum.* 44: 2263-2274

Dayer, J.M., de Rochemonteix, B., Burrus, B., Demczuk, S., Dinarello, A., 1986, Human recombinant interleukin-1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells, *J. Clin. Invest.* 77: 645-648

De Belle, I., Huang, R.P., Fan, Y., Liu, C., Mercola, D., Adamson, E.D., 1999, p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis, *Oncogene* 18: 3633-3642

De Belle, I., Mercola, D., Adamson, E.D., 2000, Method for cloning in vivo targets of the Egr-1 transcription factor, *Biotechniques* 29: 162-169

De Belle, I., Wu, J.X., Sperandio, S., Mercola, D., Adamson, E.D., 2003, In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr-1, *J. Biol. Chem.* 278: 14306-14312

DeFranco, C., Damon, D.H., Endoh, M., Wagner, J.A., 1993, Nerve growth factor induces transcription of NGFIA through complex regulatory elements that are also sensitive to serum and phorbol 12-myristate 13-acetate, *Mol. Endocrinol.* 7: 365-379

Dieckgraefe, B.K. and Weems, D.M., 1999, Epithelial injury induces Egr-1 and fos expression by a pathway involving protein C and ERK, *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 276: G322-G330

Dinkel, A., Aicher, W.K., Haas, C., Eibel, H., 1997, Transcription factor Egr-1 activity downregulates Fas and CD23 expression in B-cells, *J. Immunol.* 159: 2678-2684

Dinkel, A., Warnatz, K., Ledermann, B., Rolink, A., Zipfel, P.F., Burki, K., Eibel, H., 1998, The transcription factor early growth response 1 (Egr-1) advances differentiation of pre-B and immature B cells, *J. Exp. Med.* 188: 2215-2224

Ehrengruber, M.U., Muhlebach, S.G., Söhrman, S., Leutenegger, C.M., Lester, H.A., Davidson, N., 2000, Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus, *Gene* 258: 63-69

Eid, M.A., Kumar, M.V., Iczkowski, K.A., Bostwick, D.G., Tindall, D.J., 1998, Expression of early growth response genes in human prostate cancer, *Cancer Res.* 58: 2461-2468

Eming, S.A., Whitsitt, J.S., He, L., Krieg, T., Morgan, J.R., Davidson, J.M., 1999, Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair, *J. Invest. Dermatol.* 112: 297-302

Feige, U., Hu, Y.L., Gasser, J., Campagnuolo, G., Munyakazi, L., Bolon, B., 2000, Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor- α synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats, *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1457-1470

Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N., 1996, Rheumatoid arthritis, *Cell*: 307-310

Firestein, G.S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N.J., Green, D.R., 1997, Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10895-10900

Firestein, G.S., Nguyen, K., Aupperle, K.R., Yeo, M., Boyle, D.L., Zvaifler, N.J., 1996, Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium, *Am. J. Pathol.* 149: 2143-2151

Franz, J.K., Pap, T., Hummel, K.M., Nawrath, M., Aicher, W.K., Shigeyama, Y., Müller-Ladner, U., Gay, R.E., Gay, S., 2000, Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 43: 599-607

Franz, J.K., Pap, T., Müller-Ladner, U., Gay, R.E., Burmester, G.R., Gay, S., 1998, T cell-independent joint destruction. T cells in arthritis. In: Miossec, P., van den Berg, W.B., Firestein, G.S. (eds), *Birhäuser Verlag*, Basel/Switzerland, 55-74

Friede, T., Gnau, V., Jung, G., Keilholz, W., Stavenovic, S., Rammensee, H.H., 1996, Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules predict features of rheumatoid arthritis associated peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1316: 85-101

Fugger, L. and Svejgaard, A., 2000, Association of MHC and rheumatoid arthritis: HLA-DR4 and rheumatoid arthritis-studies in mice and men, Review, *Arthritis Res.* 2: 208-211

Fugger, L., Michie, S.A., Rulifson, I., Lock, C.B., McDevitt, G.S., 1994, Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the V β T cell repertoire and mediates an HLA-DR restricted immune response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6151-6155

Fujisawa, K., Aono, H., Hasunuma, T., Yamamoto, K., Mita, S., Nishioka, K., 1996, Activation of transcription factor NF κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor α , *Arthritis Rheum.* 39: 197-203

Gashler, A.L., Sukhatme, V.P., 1995, Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors, *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* 50:191-224

Gashler, A.L., Swaminathan, S. and Sukhatme, V.P., 1993, A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1, *Moll. Cell. Biol.* 13: 4556-4571

Geiler, T., Kriegsmann, J., Keyszer, G.M., Gay, R.E., Gay, S., 1994, A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal cartilage into SCID mice, *Arthritis Rheum.* 37: 1664-1671

Granet, C., Miossec, P., 2003, Combination of the proinflammatory cytokines IL-1, TNF- α and IL-17 leads to enhanced expression and additional recruitment of AP-1 family members, Egr-1 and NF κ B in osteoblast-like cells, Arthritis Res. Ther. 5 (suppl 1): 38

Gravallese, E.M., Harada, Y., Wang, J.T., Gorn, A.H., Thornhill, T.S., Goldring, S.R., 1998, Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis, Am. J. Pathol. 152: 943-951

Gravallese, E.M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E., Goldring, S.R., 2000, Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor, Arthritis Rheum. 43: 250-258

Grimbacher, B., Aicher, W.K., Peter, H.H., Eibel, H., 1998, TNF-alpha induces the transcription factor Egr-1, pro-inflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells, Rheumatol. Int. 17: 185-192

Guha, M., O'Connell, M.A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S.F., Stern, D., Mackman, N, 2001, Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression, Blood 98: 1429-1439

Haas, C., Aicher, W.K., Dinkel, A., Peter, H.H., Eibel, H., 1997, Characterization of SV40 T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression of Egr-1, HLA-DR and some surface molecules, Rheum. Int. 16: 241-247

Haas, Christian, Dissertationsarbeit, 1996, Freiburg, Analyse des regulatorischen Potentials des Transkriptionsfaktors EGR-1 in humanen synovialen Fibroblasten

Harigai, M., Hara, M., Kitani, A., Norioka, K., Hirose, T., Hirose, W., Suzuki, K., Kawakami, M., Masuda, K., Shinmei, M., et al., 1991, Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically increase the production of interleukin-6 in human synovial fibroblast, J. Clin. Lab. Immunol. 34: 107-113

Harrington, M., Edenberg, H., Saxman, S., Pedigo, L., Daub, R. and Broxmeyer, H. 1991, Cloning and characterization of the murine promoter for the colony-stimulating factor-1-encoding gene, Gene 102:165-170

Harris, E.D., 1990, Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy, N. Engl. J. Med. 322: 1277-1283

Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., Iwata, K., 1992, Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells, A possible new growth factor in serum, FEBS Lett. 298: 29-32

Heijde, D.M. van der, Leeuwen, M.A. van, Riel, P.L. von, Putte, L.B. van de, 1995, Radiographic progression on radiographs of hands and feet during the first 3 years of rheumatoid arthritis measured according to Sharp's method (van der Heijde modification), J. Rheumatol. 22: 1792-1796

Henderson, B., Pettipher, E.R., 1989, IL-1 and tumor necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo, Clin. Exp. Immunol. 75: 306-310

Holmdahl, R., Andersson, E.C., Andersen, C.B., Svejgaard, A., Fugger, L., 1999, Transgenic mouse models of rheumatoid arthritis, Immunol. Rev. 169: 161-173

Huang, R.P., Fan, Y., De Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M.M., Mercola, D., Adamson, E.D., 1997, Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation, Int. J. Canc. 72: 102-109

Huang, R.P., Liu, C., Fan, Y., Mercola, D., Adamson, E.D., 1995, Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain, Cancer Res. 55: 5054-5062

Joosten, L.A.B., Helsen, M.M.A., Van De Loo, F.A.J., Van Den Berg, W.B., 1996, Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNF-alpha, anti-IL-1 alpha/beta and IL-1Ra, Arthritis Rheum. 39: 797-809

Keystone, E.C., 1999, The role of tumor necrosis factor antagonism in clinical practice, J. Rheumatol. 26: 22-28

Khachigian, L., Lindner, L., Williams, A., Collins, T., 1996, Egr-1 induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury, Science 271: 1427-1431

Khachigian, L., Williams, A. and Collins, T., 1995, Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells, J. Biol. Chem. 270: 27679-27686.

Kim, S.J., Jeang, K.T., Glick, A.B., Sporn, M.B. and Roberts, A.B. 1989, Promoter sequences of the human transforming growth factor- β 1 gene responsive to transforming growth factor- β 1 autoinduction, *J. Biol. Chem.* 264: 7041-7045

Kishore, R., Hill, J.R., McMullen, M.R., Frenkel, J., Nagy, L.E., 2002, ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF- α production in rat kupffer cells after chronic ethanol feeding, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282: G6-G15

Kobayashi, D., Yamada, M., Kamagata, C., Kaneko, R., Tsuji, N., Nakamura, M., Yagihashi, A., Watanabe, N., 2002, Overexpression of early growth response-1 as a metastasis-regulatory factor in gastric cells, *Anticancer Res.* 22: 3963-3970

Koch, A.E., 2000, The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments, *Ann. Rheum. Dis.* 59: (Suppl.): 65-71

Komura, J., Okada, T., Ono, T., 1995, Repression of transient expression by DNA methylation in transcribed regions of reporter genes introduced into cultured human cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1260: 73-78

Kottinen, Y.T., Nykanen, P., Nordstrom, D., Saari, H., Sandelin, J., Santavirta, S., Kouri, T., 1989, DNA synthesis in prolyl 4-hydroxylase positive fibroblasts in situ in synovial tissue. An autoradiography-immunoperoxidase double labelling study, *J. Rheumatol.* 16: 339-345

Krane, S.M., Goldring, S.R., Dayer, J.M., 1982, Interactions among lymphocytes, monocytes and other synovial cells in the rheumatoid synovium, *Lymphokines* 7: 75-87

Krishnaraju, K., Nguyen, H.Q., Liebermann, D.A., Hoffman, B., 1995, The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells, *Mol. Cell. Biol.* 15: 5499-5507

Kuiper, S., Joosten, L.A.B., Bendele, A.M., Edwards, C.K.E., Arntz, O.J., Helsen, M.M.A. et al., 1998, Different roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis, *Cytokine* 10: 690-702

Kullmann, F., Judex, M., Neudecker, I., Lechner, S., Jüsten, H.P., Green, D.R., Wessinghage, D., Firestein, G.S., Gay, S., Scholmerich, J., Müller-Ladner, U., 1999, Analysis of the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum.* 42: 1594-1600

- Landschulz**, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L., 1988, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Nature* 224: 1759-176
- Lee**, S.L., Tourtellotte, L.C., Wesselschmidt, R.L., Milbrandt, J., 1995, Growth and differentiation proceeds normally in cells deficient in the immediate early gene NGFI-A, *J. Biol. Chem.* 270: 9971-9977
- Lee**, S.L., Sadovsky, Y., Swirnoff, A.H., Polish, J.A., Goda, P., Gavrilina, G., Milbrandt, J., 1996a, Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1), *Science* 273: 1219-122
- Lee**, S.L., Wang, Y., Milbrandt, J., 1996b, Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transcription factor NGFI-A (Egr-1), *Moll. Cell. Biol.* 16: 4566-4572
- Lee**, C.S., Portek, I., Edmonds, J., Kirkham, B., 2000, Synovial membrane p53 protein immunoreactivity in rheumatoid arthritis patients, *Ann. Rheum. Dis.* 59: 143-145
- Lemaire**, R., Flipo, R.M., Monte, D., Dupressoir, T., Duquesnoy, B., Cesbron, J.Y., Janin, A., Capron, A., Lafyatis, R., 1994, Synovial fibroblast-like cell transfection with the SV40 large T antigen induces a transformed phenotype and permits transient tumor formation in immunodeficient mice, *J. Rheumatol.* 21: 1409-1419
- Lim**, C.P., Jain, N., Cao, X., 1998, Stress-induced immediate-early gene, *egr-1*, involves activation of p38/JNK1, *Oncogene* 16: 2915-2926
- Lim**, R.W., Varnum, B.C., Herschman, H.R., 1987, Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced primary response sequences and their expression in density-arrested swiss 3T3 cells and a TPA nonproliferative variant, *Oncogene* 1: 263-270
- Liu**, J., Grogan, L., Nau, M.M., Allegra, C.J., Chu, E., Wright, J.J., 2001, Physical interactions between p53 and primary response gene *Egr-1*, *Int. J. Oncol.* 18: 863-870
- Maini**, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Davis, D., Macfarlane, J.D., Antoni, C., Leeb, B., Elliott, M.J., Woody, J.N., Schaible, T.F., Feldmann, M., 1998, Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexat in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 41: 1552-1563

Majesky, M.W., Lindner, V., Twardzik, D.R., Schwartz, S.M., Reidy, M.A., 1991, Production of transforming growth factor- β 1 during repair of arterial injury, *J. Clin. Invest.* 88: 904-910

Maltzman, J.S., Carmen, J.A. and Monroe, J.G., 1996, Transcriptional regulation of the ICAM-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B-lymphocytes; role for transcription factor Egr-1, *J. Exp. Med.* 183: 1747-1759

Matsumoto, S., Müller-Ladner, U., Gay, R.E., Nishioka, K., Gay, S., 1996, Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts, *J.Rheumatol.* 23: 1345-1352

May, P., May, E., 2000, Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene* 19: 1734

McComb, J., Gould, T., Chlipala, E., Sennelo, G., Frazier, J., Kieft, G. et al., 1999, Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy, *J. Rheumatol.* 26: 1347-1351

McMahon, S.B., Monroe, J.G., 1995, A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of Egr-1 through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B-lymphocytes, *Mol. Cell. Biol.* 15:1086-1093

Mechtcheriakova, D., Wlachos, A., Holzmüller, H., Binder, B.R., Hofer, E., 1999, Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by Egr-1, *Blood* 93: 3811-3823

Meyer, F.A., Yaron, I., Yaron, M., 1990, Synergistic, additive, and antagonistic effects of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and gamma-interferon on prostaglandin E, hyaluronic acid, and collagenase production by cultured synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum.* 33: 1518-1525

Milbrandt, J., 1987, A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor, *Science* 238: 797-799

Minc, E, de Coppe, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M., Jaulin, C., 1999, The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by SP1, Egr-1 and WT1 via non-canonical binding sites, *J. Biol. Chem.* 274: 503-509

Mittelstadt, P.R. and DeFranco, A.L., 1993, Induction of early response genes by cross-linking membrane Ig on B lymphocytes, *J. Immunol.* 150: 4822-4832

Mittelstadt, P.R. and Ashwell, J.D., 1998, Cyclosporine A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression, *Mol. Cell. Biol.* 18: 3744-3751

Mittelstadt, P.R. and Ashwell, J.D., 1999, Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells, *J. Biol. Chem.* 274: 3222-3227

Miyazaki, T., 1997, Two distinct steps during thymocyte maturation from CD4⁻CD8⁻ to CD4⁺CD8⁺ distinguished in the early growth response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene-deficient background, *J. Exp. Med.* 186: 877-885

Molnar, G., Crozat, A., Pardee, A.B., 1994, The immediate-early gene Egr-1 regulates the activity of the thymidine kinase promoter at the G0-to-G1 transition of the cell cycle, *Mol. Cell. Biol.* 14: 5242-5248

Moreland, L.W., Schiff, M.H., Baumgartner, S.W., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., Bulpitt, K.J. et al., 1999, Etanercept therapy in rheumatoid arthritis: A randomized, controlled trial, *Ann. Intern. Med.* 130: 478-486

Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B.N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R.E., Gay, S., 1996, Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice, *Am. J. Pathol.* 149: 1607-1615

Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Gay, R.E., Gay, S., 1995, Oncogenes in rheumatoid arthritis, *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 21: 675-690

Muthukkumar, S., Nair, P., Sells, S.F., Maddivar, N.G., Jacob, R.J., Rangnekar, V.M., 1995, Role of Egr-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6, *Mol. Cell. Biol.* 15: 6262-6272

Nagase, H., 1997, Activation mechanism of matrix metalloproteinases, *Biol. Chem.* 378: 151-160

Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S.F., Han, S.S., Sukhatme, P., Rangnekar, V.M., 1997, Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53, *J. Biol. Chem.* 272: 20131-20138

Nakamura, H., Isaka, Y., Tsujie, M., Rupprecht, H.D., Akagi, Y., Ueda, N., Imai, E., Hori, M., 2002, Introduction of DNA enzyme for Egr-1 into tubulointerstitial fibroblasts by electroporation reduced interstitial α -smooth muscle actin expression and fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats, *Gene Ther.* 9: 495-502

Nastiuk, K.L., Mello, C.V., George, J.M., Clayton, D.F., 1994, Immediate-early gene responses in the avian song control system: cloning and expression analyses of the canary c-jun cDNA, Mol. Brain Res. 27: 299-309

Neidhart, M., Wehrli, R., Brühlmann, P., Michel, B.A., Gay, R.E., Gay, S., 1999, Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum. 42: 622-630

Nepom, G.T., 1998, Major histocompatibility complex-directed susceptibility to rheumatoid arthritis, Adv. Immunol. 68: 315-332

Nguyen, H.Q., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D.A., 1993, The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the the macrophage lineage, Cell 72: 197-209

Nikol, S., Isner, J.M., Pickering, J.G., Keamey, M., Leclerc, G., Weir, L., 1992, Expression of transforming factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions, J. Clin. Invest. 90: 1582-1592

Pap, T., Franz, J.K., Hummel, K.M., Jeisy, E., Gay, R.E., Gay, S., 1999, Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumor suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction, Arthritis Res. 2: 59-64

Perez-Castillo, A., Pipano, C., Garcia, I., Alemany, S., 1993, NGFI-A gene expression is necessary for T-lymphocytes proliferation, J. Biol. Chem., 268: 19445-19450

Pincus, T., Callaghan, L.F., 1986, Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously – predictive markers, socioeconomic status and comorbidity, J. Rheumatol. 13: 841-845

Pitsillides, A.A., Wilkinson, L.S., Mehdiadeh, S., Bayliss, M.T., Edwards, J.C.W., 1993, Uridine diphosphonate dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell, Int. J. Exp. Pathol. 74: 27-34

Quale, A.J., Wilson, K.B., Li, G.S., Kjeldsen-Kragh, J., Oftung, F., Shinnik, T., Sioud, M., Capra, J.D., Natvig, J.B., 1992, Peptide recognition, T cell receptor usage and HLA restriction of human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial 65-kD hsp-reactive T cell clones from rheumatoid synovial fluid, Eur. J. Immunol. 22: 1315-1322

Rathanaswami, P., Hachicha, M., Wong, W.L., Schall, T.J., McColl, S.R., 1993, Synergistic effect on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts: evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation, *Arthritis Rheum.* 36: 1295-1304

Romas, E., Bakharevski, O., Hards, D.K., Kartsogiannis, V., Quinn, J.M.W., Ryan, P.F.J., Martin, T.J., Gillespie, M.T., 2000, Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen induced arthritis, *Arthritis Rheum.* 43: 821-826

Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Esaki, Y., Whittington, K.B., Zaller, D.M., Woods, A., Stuart, J.M., Kang, A.H., 1998, Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen, *J. Immunol.* 160: 2573-277

Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Whittington, K.B., Gumanovskaya, M., Zaller, D.M., Woods, A., Altmann, D.M., Stuart, J.M., Kang, A.H., 1997, An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen, *J. Exp. Med.* 185: 1113-1122

Russo, M., Sevetson, B.R., Milbrandt, J., 1995, Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A and Krox-20 mediated transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6873-687

Saito, H., Moses, R.E., 1991, immortalization of Werner syndrome and progeria fibroblasts, *Exp. Cell Res.* 192: 373-379

Sakamoto, K.M., Bardeleben, C., Yates, K.E., Golde, M.A., Gasson, J.C., 1991, 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, *Egr-1/TIS8*, *Oncogene*, 6: 867-871

Santiago, F.S., Lowe, H.C., Kavurna, M.M., Chesterman, C.N., Baker, A., Atkins, D.G., Khachigian, L.M., 1999, New DNA enzyme targeting *Egr-1* mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury, *Nat. Med.* 5: 1264-1269

Schett, G., Redlich, K., Xu, Q., Bizan, P., Gröger, M., Tohidast-Akrad, M., Kiener, H., Smolen, J., Steiner, G., 1998, Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue, *J. Clin. Invest.* 102: 302-311

Sekut, L. and Connolly, K., 1998, Anti-TNF-agents in the treatment of inflammation, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7: 1825-1839

Seyfert, V.L., McMahon, S.B., Glenn, W., Cao, X.M., Sukhatme, V.P., Monroe, J.G., 1990, Egr-1 expression in surface Ig-mediated B cell activation: kinetics and association with protein kinase C activation, *J. Immunol.* 145: 3647-3653

Shi, L., Kishore, R., McMullen, M.R., Nagy, L.E., 2002, Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF- α production via Egr-1, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: C1205-C1211

Silman, A.J., MacGregor, A.J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A., Ollier, W.E., 1993, Twin concordance rates for rheumatoid arthritis, *Br. J. Rheumatol.* 32: 903-907

Silverman, E., Du, J., Williams, A., Wadgaonkar, R., Drazen, J., Collins, T., 1998, c-AMP-response-element-binding-protein-binding-protein (CBP), and p300 are transcriptional co-activators of Egr-1, *Biochem. J.* 336:183-189

Silverman, E.S., Khachigian, L.M., Lindner, V., Williams, A.J. and Collins, T., 1997, Inducible PDGF-A chain transcription in smooth muscle cells is mediated by Egr-1 displacement of Sp-1 and Sp-3, *Am. J. Physiol.* 273: H1415-H1426.

Skerka, C., Decker, E. and Zipfel, P., 1995, Coordinate expression and distinct DNA-binding characteristics of the four egr-1-zinc finger proteins in Jurkat T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 270: 22500-22506

Stastny, P., 1978, Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.* 298: 869-87

Sukhatme, V.P., Cao, X., Chang, L.C., Tsai-Morris, C., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C.P., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T., Le Beau, M.M., Adamson, E.D., 1988, A zinc finger encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarisation, *Cell* 53: 37-43

Suzuki, Y., Nishikaku, F., Nakatuka, M., Koga, Y., 1998, Osteoclast-like cells in murine collagen induced arthritis, *J. Rheumatol.* 25: 1154-1160

Svaren, J., Sevetson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Milbrandt, J., 1996, NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), and Krox-20, is induced by proliferative, and differentiative stimuli, *Mol. Cell. Biol.* 16: 3545-3553

Swirnoff, A.H., Milbrandt, J., 1995, DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors, *Mol. Cell. Biol.* 15: 2275-2287

Swirnoff, A.H., Apel, E.D., Svaren, J., Sevetson, B.R., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Milbrandt, J., 1998, NAB1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain, *Mol. Cell. Biol.* 18: 512-524

Thigpen, A.E., Cala, K.M., Guileyardo, J.M., Molberg, K.H., McConnell, J.D., Russell, D.W., 1996, Increased expression of early growth response-1 messenger ribonucleic acid in prostatic adenocarcinoma, *J. Urol.* 155: 975-981

Tolboom, T.C.A., Pieterman, E., Van der Laan, W.H., Toes, R.E.M., Huidekoper, A.L., Nelissen, R.G.H.H., Breedveld, F.C., Huizinga, T.W., 2002, Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-10, *Ann. Rheum. Dis.* 61: 975-980

Trabandt, A., Aicher, W.K., Gay, R.E., Sukhatme, V.P., Fassbender, H.G., Gay, S., 1992, Spontaneous expression of immediate early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts, *Rheumatol. Int.* 12: 53-59

Treisman, R., 1995, Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE, *EMBO J.* 14: 4905-4913

Van De Loo, F.A.J., Joosten, L.A.B., Van Lent, P.L.E.M., Arntz, O.J., Van Den Berg, W.B., 1995, Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction, *Arthritis Rheum.* 38: 164-172

Van der Laan, W.H., Quax, P.H., Seemayer, C.A., Huisman, L.G., Pieterman, E.J., Grimbergen, J. M., Verheijen, J.H., Breedveld, F.C., Gay, R.E., Gay, S., Huizinga, T.W., Pap, T., 2003, Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3, *Gene Ther.* 10: 234-242

Varmus, H.E., 1985, Viruses, genes and cancer. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia, *Cancer*, 15: 2324-2328

Virolle, T., Krones-Herzig, A., Baron, V., De Gregorio, G., Adamson, E.D., Mercola, D., 2003, Egr-1 promotes growth and survival of prostate cancer cells: identification of novel Egr-1 target genes, *J. Biol. Chem.* 278: 11802-11810

Waters, C.M., Hancock, D.C., Evan, G.I., 1990, Identification and characterisation of the Egr-1 gene product as an inducible, short-lived, nuclear phosphoprotein, *Oncogene* 5: 669-674

Wendling, D., Racadot, E., Wijdenes, J., Sibilia, J., Flipo, R.M., Cantagrel, A., Miossec, P., Eschard, J.P., Macro, M., Bertin, P., Liote, F., Debiais, F., Juvin, R., Le Goff, P., Masson, C., 1998, A randomized, double blind, placebo controlled multicenter trial of murine anti-CD4 monoclonal antibody therapy in rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 25: 1457-1461

Weyand, C.M., 2000, New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 39 (Suppl.1): 3-8

Weyand, C.M., Xie, C., Goronzy, J.J., 1992, Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis, *J. Clin. Invest.* 89: 2033-2039

Wilkinson, L.S., Pitsillides, A.A., Worrall, J.G., Edwards, J.C.W., 1992, Light microscopic characterization of the fibroblastic synovial lining cell (synoviocyte), *Arthritis Rheum.* 35: 1179-1184

Wolf, Y.G., Rasmussen, L.M., Ruoslahti, E., 1994, Antibodies against transforming growth factor- β 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model, *J. Clin. Invest.* 93: 1172-1178

Wolffe, A.P., 1994, Transcription: in tune with the histones, *Cell* 77: 13-16

Woods, A., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Sirotina, A., Cummings, R., Zaller, D.M., 1994, Human major histocompatibility complex class II-restricted T cell responses in transgenic mice, *J. Exp. Med.* 180: 173-181

Wung, B.S., Cheng, J.J., Chao, Y.J., Hsieh, H.J., Wang, D.L., 1999, Modulation of ras/raf/ERK pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells, *Circ. Res.* 84: 804-812

Yan, S.F., Lu, J., Zou, Y.S., Kisiel, W., Mackman, N., Leitges, M., Steinberg, S., Pinsky, D., Stern, D., 2000, Protein kinase C- β and oxygen deprivation, a novel Egr-1 dependent pathway for fibrin deposition in hypoxemic vasculature, *J. Biol. Chem.* 275: 11921-11928

Yan, S.F., Zou, Y.S., Gao, Y., Zhai, C., Mackman, N., Lee, S.L., Milbrandt, J., Pinsky, D., Kisiel, W., Stern, D., 1998, Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia, *PNAS* 95: 8298-8303

Yankulov, K., Blau, J., Purton, T., Roberts, S., Bentley, D.L., 1994, Transcriptional elongation by RNA Polymerase II is stimulated by transactivators, *Cell* 77: 749-759

Yao, J., Mackman, N., Edgington, T.S. and Fan, S.T. 1997, Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- α promoter in human monocyte cells: regulation by egr-1, c-jun, NF-kappa B transcription factors, *J. Biol. Chem.* 272: 17795-1780

Yoshihara, Y., Nakamura, H., Obata, K., Yamada, H., Hayakawa, T., Fujikawa, K., Okada, Y., 2000, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 59: 455-461

Zvaifler, N.J., Firestein, G.S., 1994, Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheum.* 37: 783-789

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W.K. Aicher für die Bereitstellung des Themas, für die interessante Zusammenarbeit und die stete Ansprechbarkeit bei allen auftretenden Fragen und Problemen und für sein freundschaftliches Engagement beim Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Nordheim danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Vertretung meiner Arbeit gegenüber der biologischen Fakultät.

Meiner Kollegin, Frau Dipl. Biol. M. Weis-Klemm danke ich für die außerordentlich kooperative und freundschaftliche Zusammenarbeit in allen Phasen dieser Studie und für das äußerst angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. med. N. Wülker danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik durchführen zu dürfen und für die Mitfinanzierung meines Projektes.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. R.E. Gay und Herrn Prof. Dr. med. S. Gay und allen Mitarbeitern des WHO-Zentrums für Rheumatologie des Universitäts-Spitals der ETH Zürich für die gute und freundliche Kooperation in diesem Forschungsprojekt.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. T. Pap und bei allen Mitarbeitern in seinem Labor in Magdeburg für die Einarbeitung in die Methodik der Transduktion mittels retroviraler Expressionssysteme bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund, Herrn Dr. med. B. Friedrich bedanken, mit dem ich ergiebige Diskussionen der Ergebnisse führte und der mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitete.

8. Lebenslauf

Dorothea Alexander

Geburtsort: Bukarest / Rumänien
Geburtstag: 17.11.1967
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:
1974 - 1982 Volksschule (Bukarest / Rumänien)
1982 - 1983 Gymnasium (Bukarest / Rumänien)
1983 - 1987 Gymnasium Werl / Nordrhein-Westfalen
1987 Allgemeine Hochschulreife

Berufsbildung:
1987 - 1989 Ausbildung zur staatlich geprüften Kosmetikerin
(Gertrud-Bäumer-Schule Düsseldorf)

Hochschulbildung:
WS 1989 - SS 1995 Biologiestudium (Justus-Liebig-Universität Gießen)
November 1992 Vordiplom
Mai 1995 Diplomprüfungen in Botanik, Zoologie,
Mikrobiologie, Immunologie
Juni 1995 - November 1996 Diplomarbeit mit dem Thema: „Untersuchungen
zum Tropismus des Borna Disease Virus“ (Bundes-
forschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Tübingen)

Berufstätigkeit:
April 1997 - April 1998 Geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft (Zytologisches
Labor der Urologischen Universitätsklinik Tübingen)
April 1998 - März 2000 Wissenschaftliche Angestellte (Forschungslabor der
Urologischen Universitätsklinik Tübingen)

Promotion:
April 2000 - heute Anfertigen der Dissertation im Forschungslabor der
Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen
(Leiter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W. Aicher)

Publikationen

Erstautorenschaften

Arthritis & Rheumatism, 2003 Feb., 48(2): 348-59

W.K. Aicher, D. Alexander, C. Haas, S. Kuchen, A. Pagenstecher, S. Gay, H.H. Peter, H. Eibel (geteilte Erstautorenschaft mit W.K. Aicher)

Transcription factor early-growth-response (Egr)-1 activity up-regulates TIMP-1 expression in human synovial fibroblasts.

Biological Chemistry, 2002 Dec., 383(12): 1845-53

D. Alexander, M. Judex, R. Meyringer, M. Weis-Klemm, S. Gay, U. Müller-Ladner, W.K. Aicher

Transcription factor Egr-1 activates collagen expression in immortalized fibroblasts or fibrosarcoma cells.

Ko-Autorenschaft

E. Rutkauskaite, W. Zacharias, J. Schedel, D. Volkmer, U. Müller-Ladner, C. Seemayer, D. Alexander, R.E. Gay, W.K. Aicher, S. Gay, T. Pap

Ribozymes that inhibit the production of MMP-1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (in Revision bei Arthritis & Rheumatism).

Kongressbeiträge

12/99 Vortrag beim Bad Teinacher Expertengespräch: Einfluß nephrotoxischer Agenzien auf die Nierentubuluszelle

1/00 Posterpräsentationen auf dem Internationalen Nephrolithiasis Kongress in Kapstadt/ Südafrika:

S.Lahme, D.Alexander, T. Beiter, W. L. Strohmaier, K.H. Bichler

Does gentamicin, parathormone or vitamin D cause a direct damaging effect on renal tubular cells?

S.Lahme, D.Alexander, T. Beiter, W. L. Strohmaier, K.H. Bichler

Comparison of LDH-measurement and proliferation assay for the detection of cytotoxicity in MDCK-cells in stone research.

11/00 Posterpräsentation auf dem American College of Rheumatology in Philadelphia/USA:

D.Alexander, S. Kuchen, M. Weis-Klemm, S. Gay, W.K. Aicher

Transcription factor Egr-1 induces expression of collagenase inhibitor TIMP-1 but represses its own transcription.

02/01 Posterpräsentation auf dem Federation of the American Societies of Experimental Biologists in New Orleans/USA:

W.K. Aicher, M. Weis-Klemm, D.Alexander, S. Kuchen, S. Gay

Zinc finger transcription factor Egr-1 represses its own transcription but induces transcription of tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1 (TIMP-1).

06/02 Vortrag auf dem EU (European League of Arthritis Rheumatologists) Kongress in Stockholm/Schweden:

D. Alexander, M. Judex, R. Meyringer, M. Weis-Klemm, S. Gay, U. Müller-Ladner, W.K. Aicher

Transcription factor Egr-1 promotes synovial fibrosis by activation of type I collagen expression.

10/02 Posterpräsentation auf dem American College of Rheumatology in New Orleans/USA (Abstract Supplement Vol. 46/9, Abstr./SeitenNr. 874/344; 1578/587; 1630/604)

D. Alexander, M. Weis-Klemm, H. Eibel, S. Gay, W.K. Aicher

Deletion of a putative Egr-1 binding site in the TIMP-1 promoter leads to reduction of inducible TIMP-1 expression in Egr-1 high expressing fibroblasts.

E. Rutkauskaite, J. Schedel, W. Zacharias, D. Volkmer, U. Müller-Ladner, C. Seemayer, R.E. Gay, D. Alexander, S. Gay, W.K. Aicher, T. Pap

Effects of retroviral gene transfer of specific ribozymes against MMP-1 on the production of MMP-1 and the invasiveness of synovial fibroblasts in the SCID mouse model of RA.

E. Rutkauskaite, D. Volkmer, Y. Shigeyama, J. Schedel, U. Müller-Ladner, D. Alexander, R.E. Gay, S. Drynda, W.K. Aicher, S. Gay, T. Pap

Retroviral gene transfer of an antisense construct against membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) modulates the invasiveness and apoptosis of RA-SF.

06/03 Posterpräsentation auf dem EULAR (European League of Arthritis Rheumatologists) Kongress in Lissabon

D.Alexander, W.K. Aicher

Leflunomide induces IL-6 and IL-8 expression but enhances MMP-1 and MMP-3 expression in synovial fibroblasts activated with TNF- α and IL-17.