

**Analyse der Transkriptionsregulation des
'Hepatocyte Growth Factor'
(HGF)**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Biol. Petra Hanke

geboren am 19. 12. 1964 in Hameln

1999

Referent: Prof. Dr. P. Schirmacher
Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen
Tag der Promotion: 21.05.1999

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen, daß er die vorliegende Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover vertritt.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Dienes für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. P. Schirmacher für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. Margarete Odenthal für die exzellente Anleitung und Betreuung im Labor.

Der technischen Angestellten Frau Beate Gilberg für Ihre Unterstützung bei zahlreichen praktischen Arbeiten.

Frau Dr. Waltraud Jung, Frau Undine Orning und Herrn Mario Beilmann, die mir jederzeit seelisch-moralischen und auch fachlichen Beistand im Rahmen ihrer Promotionsarbeiten geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Hans, meiner besten »Freundin-Trauzeugin-Patentante meiner Tochter Nora« Gaby Heine sowie meiner Familie, ohne deren Unterstützung im Hinblick auf Kinderbetreuung, Hilfe bei der Erstellung einer »druckreifen« Promotionsarbeit, moralischen Beistand und unendlich viel Liebe ich diese Arbeit niemals vollendet hätte.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Stipendiums des Graduiertenkollegs ‚Molekulare und zelluläre Mechanismen der Pathogenese‘ an der Universität Mainz von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Der Hepatocyte growth factor (HGF) ist ein multifunktionelles Zytokin, das in der normalen Leber ausschließlich von den hepatischen Sternzellen gebildet wird. Seine biologische Funktion in der Leber umfaßt v. a. die Kontrolle der Leberzellproliferation. Die Umwandlung der Sternzellen in proliferierende Myofibroblasten in der Leberfibrose geht einher mit dem Verlust ihrer HGF-Expression. Diese Regulation erfolgt zu einem wesentlichen Teil transkriptionell, so daß die Analyse der transkriptionsregulatorischen Sequenzen des HGF-Gens Aufschluß über die Suppression des HGF-Gens in Myofibroblasten geben kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der HGF-Promotor der Ratte kloniert und nachfolgend charakterisiert. Die Transfektionsanalysen ermittelten eine höhere Promotoraktivität für die ersten 70 bp des HGF-Promotors. Hier zeigen Mobility Shift-Analysen die Bindungen bislang nicht identifizierter Transkriptionsfaktoren. Im weiteren 5' liegenden Bereich, -266 bis -229, konnte eine Sequenz identifiziert werden, an die vermutlich zelltypspezifische Repressorproteine binden. Untersuchungen des TPA Responsiven Elementes (TRE) an der Position -325 bis -319 im HGF-Promotor konnten keine spezifischen Proteinbindungen an diese Sequenz nachweisen. AP-1 ist jedoch in die Suppression des HGF-Gens involviert. TGF β induzierte eine Suppression des HGF-Gens, die zum Teil *c-fos* vermittelt erfolgte. Für das TGF β inhibitorische Element-2 (TIE-2) aus dem HGF-Promotor konnte eine Bindung von FOS nach TGF β -Stimulation nachgewiesen werden. An das TGF β inhibitorische Element-1 (TIE-1) aus dem HGF-Promotor banden spezifische, noch nicht identifizierte Proteine, die ebenfalls durch TGF β -Inkubation der Zellen induziert wurden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Transkription des HGF-Gens signifikant negativ reguliert wird. Dabei erfolgt offenbar eine konstitutive Suppression durch zelltypspezifische Repressorproteine, die an eine oder mehrere Silencerregionen im 5' Bereich des HGF-Gens binden, andererseits eine induzierte Suppression der HGF-Expression durch TGF β , vermittelt über das TIE-2-Element. FOS bzw. der Transkriptionsfaktor AP-1 sind vermutlich an der induzierten Suppression beteiligt.

Schlagworte:

Hepatocyte growth factor (HGF), Genregulation, Transforming growth factor β (TGF β)

Hepatocyte growth factor (HGF) is a multifunctional cytokine which, in the normal liver, is only produced by the hepatic stellate cells (HSC). Its biological function in the liver comprises, among others, the control of liver cell proliferation. Transformation of HSC into the proliferating myofibroblasts during liver fibrosis occurs together with the loss of their HGF expression. The regulation of this transformation is mostly transcriptional, so that an analysis of the sequences which regulate transcription of the HGF gene may provide information about its suppression in myofibroblasts. In the following thesis the HGF promoter from rat was cloned and subsequently characterized. Transfection analyses show an increased promoter activity for the first 70 bp of the HGF promoter. Mobility shift analyses show the binding of not-yet identified transcription factors. In a further 5' region, -266 to -229, a sequence was identified to which cell-type specific repressor proteins likely bind. Examination of the TPA responsive element (TRE) at position -325 to -319 of the HGF promoter could not show any specific protein binding. AP-1 is, however, involved in suppressing the HGF gene. TGF β induced a suppression of the HGF gene which was partly mediated by *c-fos*. TGF β inhibitory element-2 (TIE-2) on the HGF promoter was shown to bind FOS after stimulation with TGF β . TGF β inhibitory element-1 (TIE-1) on the HGF promoter could bind specific, not-yet identified proteins which were also induced by TGF β incubation with the cells. The following results allow the conclusion that a significant, negative regulation of HGF gene transcription takes place. To this end there is an obvious constitutive suppression by cell-type specific repressor proteins binding on one or more silencing elements in the 5' region of the HGF gene. On the other hand there is also an induced suppression of HGF expression taking place through TGF β and mediated by the TIE-2 element. FOS and/or the transcription factor AP-1 are probably involved in the induced suppression.

Key words:

Hepatocyte growth factor (HGF), gene regulation, Transforming growth factor β (TGF β)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Hepatocyte Growth Factor (HGF)	1
1.1.1.	Aufbau des HGF-Gens und Struktur des HGF-Polypeptids	1
1.1.2.	Biologische Effekte des HGF-Polypeptids	2
1.1.3.	Produktion von HGF in der Leber	6
1.1.4.	Transkriptionsregulation des HGF-Gens	7
1.2.	Der HGF-Promotor	7
2.	AUFGABENSTELLUNG	12
3.	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1.	Allgemeines	13
3.1.1.	Chemikalien, Plastikwaren und sonstige Materialien	13
3.1.2.	Herstellung von Lösungen	13
3.2.	Zellkultur	13
3.2.1.	Zellkulturtechnik und Medien	13
3.2.2.	Verwendete Primärzellkulturen	14
3.2.2.1.	Humane Lungenfibroblasten	14
3.2.2.2.	Isolierung und Kultivierung von hepatischen Sternzellen aus der Rattenleber	15
3.2.3.	Verwendete Zelllinien	15
3.2.4.	CAT-Assay	16
3.2.4.1.	Transfektionen	16
3.2.4.2.	Zellyse	16
3.2.4.3.	BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung	16
3.2.4.4.	CAT-ELISA	16
3.2.5.	Stimulierung von Zellen	16
3.2.5.1.	Stimulierungsversuche an den stabil transfizierten KNRK-Zellklonen	16
3.2.5.2.	Stimulierungsversuche an Primärzellen und Zelllinien	17
3.3.	Molekularbiologische Methoden	17
3.3.1.	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	17
3.3.2.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	17
3.3.2.1.	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	17
3.3.2.2.	DNA-Molekulargewichtsmarker	18
3.3.2.3.	Gelelution	18
3.3.3.	Reinigung von Nukleinsäuren	18
3.3.4.	Klonierung von DNA-Fragmenten	19
3.3.4.1.	Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide	19
3.3.4.2.	Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA	20
3.3.4.3.	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	20
3.3.4.4.	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> -Zellen	20
3.3.5.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	20

3.3.6.	Verwendete Oligonukleotide	21
3.3.7.	Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellen und Gewebe	22
3.3.7.1.	Extraktion von genomischer DNA aus Zellen und Gewebe	22
3.3.7.2.	Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen	22
3.3.8.	Sequenzierung von DNA	23
3.3.9.	Radioaktive Markierung von DNA	23
3.3.9.1.	Markierung von Doppelstrang-DNA durch »Random-Priming«	23
3.3.9.2.	Radioaktive Markierung von Doppelstrang-DNA durch γ [³² P]-ATP	23
3.3.10.	Aktivitätsbestimmung von [³² P]-markierten Sonden	24
3.3.11.	»Northern Blot«-Hybridisierung	24
3.3.11.1.	Auftrennung von RNA in Formaldehydgelen	24
3.3.11.2.	Transfer von RNA auf Nylonmembranen	24
3.3.11.3.	Nachweis von RNA durch Hybridisierung mit [³² P]-markierten DNA-Sonden	24
3.3.12.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
3.3.12.1.	Verwendete Oligonukleotid-Primer	25
3.3.12.2.	Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR	25
3.3.13.	»Southern Blot«-Hybridisierung	26
3.3.14.	Herstellung von Kernextrakten aus Zellen	26
3.3.15.	Elektrophoretic Mobility Shift-Assay (EMSA)	27
3.3.15.1.	Polyacrylamid-Gel Herstellung	27
3.3.15.2.	Mobility Shift-Assay	27
3.3.16.	DNase I Footprinting	27
3.3.16.1.	CIP Behandlung	28
3.3.16.2.	γ [³² P]-ATP Markierung	28
3.3.16.3.	Fragmentisolierung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Extraktion	28
3.3.16.4.	Gelelution	28
3.3.16.5.	Maxam & Gilbert Reaktion	28
3.3.16.6.	DNase I Titration	29
3.3.16.7.	DNase I Footprinting	29
4.	ERGEBNISSE	30
4.1.	Analyse der 5' flankierenden Region des Ratten HGF-Gens	30
4.2.	Zelltypspezifische Suppression der HGF-Genexpression	30
4.3.	Nachweis von Protein-DNA-Komplexen in der »basalen Promotorregion« des HGF-Gens	34
4.4.	Analyse des TRE-ähnlichen Elements aus der 5' flankierenden Region des HGF-Gens	36
4.5.	Analyse der HGF-Genexpression in Abhängigkeit von IL-6 und TPA	39
4.6.	Suppression der HGF-Genexpression durch Serum	41
4.7.	TGFβ vermittelte Suppression der HGF-Genexpression	43
4.8.	Proteinbindungen an das TIE-1- sowie das TIE-2-Element in Abhängigkeit von TGFβ	45

4.9.	Identifizierung einer HLH-Konsensussequenz in der 5' flankierenden Region des HGF-Gens	48
5.	DISKUSSION	51
6.	ZUSAMMENFASSUNG	61
7.	LITERATURVERZEICHNIS	62

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , Restriktionsenzym I vom Stamm H
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
<i>Bgl</i> I	<i>Bacillus globigii</i> RUB 561, Restriktionsenzym I
bp	Basenpaare
β-Gal	β-Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin ('bovine serum albumin')
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>c-met</i>	Gen des HGF-Rezeptors
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
C-terminal	carboxyterminal
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
cpm	Zerfallimpuls pro Minute ('counts per minute')
CsCl	Cäsiumchlorid
Cys	Cystein
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ('deoxyribonucleic acid')
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
d. h.	das heißt
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> B 55, Restriktionsenzym I vom Stamm R
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	'Epidermal Growth Factor'
ELISA	'enzyme-linked immunosorbent assay'
FCS	fetales Kälberserum ('fetal calf serum')
fmol	Femtomol
g	Gramm
GITC	Guanidinium-Isothiocyanat

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde ('hora')
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd com-10</i> , Restriktionsenzym III
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae Rf</i> , Restriktionsenzym I
IGF1	Insulin like Growth Factor 1
IFN α	Interferon α
IFN γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IPTG	Isopropyl-b-D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae OK8</i> , Restriktionsenzym I
l	Liter
lacZ	Gen der β -Galaktosidase
LPS	Lipopolysaccharid
μ Ci	Mikro-Curie
M	Mol
MBq	Megabecquerel
MDCK	Nierenzellen von Kaninchen ('Martin-Darby canine kidney')
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	'messenger' Ribonukleinsäure
MG	Molekulargewicht
N-terminal	aminoterminal
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
³² p	Phosphorisotop der relativen Masse 32
p. a.	pro analysis
PBS	'Phosphate buffered saline'
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ('Polymerase Chain Reaction')
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pM	Pikomol
Pro	Prolin

Abkürzungsverzeichnis

<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i> , Restriktionsenzym I
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure ('ribonucleic acid')
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat ('sodiumdodecylsulfat')
sec	Sekunde
Ser	Serin
sog.	sogenannt
SSC	Lösung aus 3 M Natriumchlorid und 0.3 M Natriumcitrat
Tab.	Tabelle
TGF α	Transforming Growth Factor α
TGF β 1	Transforming Growth Factor β 1
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
Tris	Tris- (Hydroxymethyl-) Aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Einheit ('Unit')
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VD3	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃
z. B.	zum Beispiel
%[v/v]	Volumenprozent
%[w/v]	Gewichtprozent

1. EINLEITUNG

1.1. Hepatocyte Growth Factor (HGF)

HGF ist ein hochwirksames, multifunktionelles Zytokin (HIGASHIO ET AL., 1990), das ein breites Wirkungsspektrum sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen besitzt. Der Faktor wird daher in der Literatur auch als Hepatopoietin A (HPTA), »Fibroblast Derived Cytotoxic Factor« (F-TCR) bzw. »Scatter-Factor« (SF) bezeichnet (MICHALOPOULOS ET AL., 1984; STOKER ET AL., 1987; HIGASHIO ET AL., 1990; GHERARDI UND STOKER, 1990; WEIDNER ET AL., 1991; NALDINI ET AL., 1991; SHIMA ET AL., 1991). Ursprünglich wurde HGF aus Rattenserum nach partieller Hepatektomie isoliert, wo er eine wichtige regulatorische Funktion bei der Leberzellregeneration ausübt (NAKAMURA ET AL., 1984). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß HGF auch in anderen Organen, z.B. der Niere, eine entscheidende Rolle bei der Organregeneration spielt. Des Weiteren ist HGF involviert in die Morphogenese sowie die Karzinogenese (RUBIN ET AL., 1991; SHIOTA ET AL., 1992; SCHMIDT ET AL., 1995). HGF wird von den mesenchymalen Zellen in verschiedenen Organen gebildet. Seine Zielzellen umfassen verschiedene Epithelzelltypen, Melanozyten sowie Neurone, auf die HGF mitogene, motogene sowie morphogene Wirkungen ausübt (SONNENBERG ET AL., 1993; JUNG ET AL., 1994). Die Vermittlung der HGF-Signale an die Zielzellen erfolgt über seinen Rezeptor MET, das *c-met* Protoonkogen-Produkt (WEIDNER ET AL., 1993).

1.1.1. Aufbau des HGF-Gens und Struktur des HGF-Polypeptids

Das humane Gen für HGF umfaßt ungefähr 70 kb genomischer DNA und ist auf dem Chromosom 7q11.2-21 lokalisiert (WEIDNER ET AL., 1991; ZARNEGAR ET AL., 1992). Es besteht aus 18 Exons, die durch 17 Introns voneinander getrennt sind. Das erste Exon enthält die 5' nichttranslatierte Sequenz und die kodierende Sequenz des Signalpeptids. Exon 2 und 3 kodieren für die N-terminale Region, die folgenden 8 Exons, Exon 4-11, kodieren für die 4 Kringle-Domänen der α -Kette. Das Exon 13 beinhaltet die proteolytische Spaltstelle, an der die Trennung in α' und β -Kette des reifen HGF-Polypeptids erfolgt. Die leichte Kette wird von den letzten 5 Exons, Exon 14-18, kodiert. Das Exon 18 enthält außerdem die 3' nicht kodierende Region (MIYAZAWA ET AL., 1991A). Ausgehend vom HGF-Gen werden Transkripte von unterschiedlicher Größe gebildet, wobei das Mengenverhältnis der verschiedenen Transkripte in den einzelnen Geweben und Zelllinien variieren kann (CHAN ET AL., 1991; MIYAZAWA ET AL., 1991B). So wurden aus der humanen Placenta sowie aus der humanen Fibroblastenzelllinie MRC-5 HGF-Transkripte mit den Größen von 6,3 kb, 3,1 kb, 2,3 kb und 1,5 kb nachgewiesen, wobei nur die drei größeren Transkripte für das Vollängenprotein kodieren können (MIYAZAWA ET AL., 1991 A BZW. 1991 B).

Das HGF-Polypeptid wird zunächst als ein monomeres Vorläuferprotein synthetisiert und sezerniert. Es besteht aus einer einzigen, 728 Aminosäuren langen Polypeptidkette mit einem relativen Molekulargewicht von 82 kDa (THALER UND MICHALOPOULOS, 1985). Der N-terminale Bereich dieses Vorläuferproteins enthält eine hydrophobe Signalsequenz, sowie eine darauf folgende Prosequenz. Die Abspaltung dieser Sequenzen erfolgt wahrscheinlich während der Translokation des Prä-Pro-Polypeptids in das endoplasmatische Retikulum (NAKAMURA ET AL., 1989). Die Aktivierung des Polypeptids erfolgt unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. nach Gewebeschädigung der Leber oder der Niere, durch extrazelluläre proteolytische Spaltung an einer Arg-Val-Spaltstelle (Abb. 1). Diese Spaltung findet durch eine enzymatische Aktivität statt, die im geschädigten Gewebe induziert wird (MIYAZAWA

WA ET AL., 1994). Das entstandene reife HGF ist ein heterodimeres Glykoprotein, das aus einer α -Kette, ca 65000 Dalton, und aus einer β -Kette, ca 35000 Dalton, besteht. Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft (NAKAMURA ET AL., 1987; GODHA ET AL., 1988). Die α -Kette besteht aus einer N-terminalen Haarnadelschleife sowie aus vier charakteristischen Doppelschleifenstrukturen, sogenannten Kringle-Domänen, deren Sekundärstruktur jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird (CLAEYS ET AL., 1976; NAKAMURA ET AL., 1989). Diese Kringlestrukturen sind direkt an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt (PATTHY, 1985). Eine erste Beschreibung dieser Kringlestruktur erfolgte für verschiedene Enzyme, die in Blutgerinnung sowie Fibrinolyse involviert sind. Sie findet sich z. B. im Plasminogen und im Gewebstyp-Plasminogenaktivator (MALINOWSKI ET AL., 1984; NY ET AL., 1984). Die β -Kette besteht aus einer Serinprotease-ähnlichen Domäne.

Die Sequenz des humanen HGF zeigt ca. 40 % Homologie zum humanen Plasminogen. HGF besitzt jedoch keine proteolytische Aktivität, da die Aminosäuren, die normalerweise das katalytische Zentrum bilden, mutiert sind (NAKAMURA ET AL., 1989). Diese einzigartigen strukturellen Merkmale lassen vermuten, daß es sich beim HGF um den Prototyp einer neuen Familie von Wachstumsfaktoren handelt.

1.1.2. Biologische Effekte des HGF-Polypeptids

Das vollständig prozessierte HGF-Polypeptid ist ein heparinbindendes Glykoprotein (ROSEN ET AL., 1989). Es fungiert als potentes, vorwiegend parakrines Zytokin für ein breites Spektrum epithelialer Zellen sowie für Melanozyten, Neurone und reife parenchymatische Hepatozyten. Es übt mitogene, motogene, morphogene sowie zytotoxische Effekte auf seine Zielzellen aus. Nahezu alle Gewebe des Körpers sind in diese Wirkungen involviert.

In der Leber spielt das HGF eine entscheidende Rolle bei der Leberregeneration (STOKER, 1989; GHERARDI UND STOKER, 1990; SELDEN ET AL., 1990; MICHALOPOULOS UND ZARNEGAR, 1992). HGF vermittelt seine vielfältigen Effekte über die Aktivierung eines transmembranen Tyrosinkinase-Zelloberflächenrezeptors, der als MET bezeichnet wird. MET ist das Produkt des *c-met* Protoonkogens (BOTTARO ET AL., 1991). Das reife MET-Protein ist ein Heterodimer, bestehend aus einer ca 50 kDa schweren, vollständig extrazellulären α -Kette und einer ca 145 kDa schweren β -Kette, die die Plasmamembran durchspannt und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne besitzt. Beide Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft (PARK ET AL., 1987). Die beiden Ketten gehen aus der Prozessierung eines Vorläufermoleküls hervor, das an einer spezifischen Stelle proteolytisch gespalten wird (GIORDANO ET AL., 1989). Die Bindung des HGF erfolgt an den extrazellulären Teil der β -Kette (Abb. 2). Der hochaffine HGF-Rezeptor wird auf der Plasmamembran von Epithelien und Endothelien in nahezu jedem Gewebe exprimiert (TAJIMA ET AL., 1992A BZW. B).

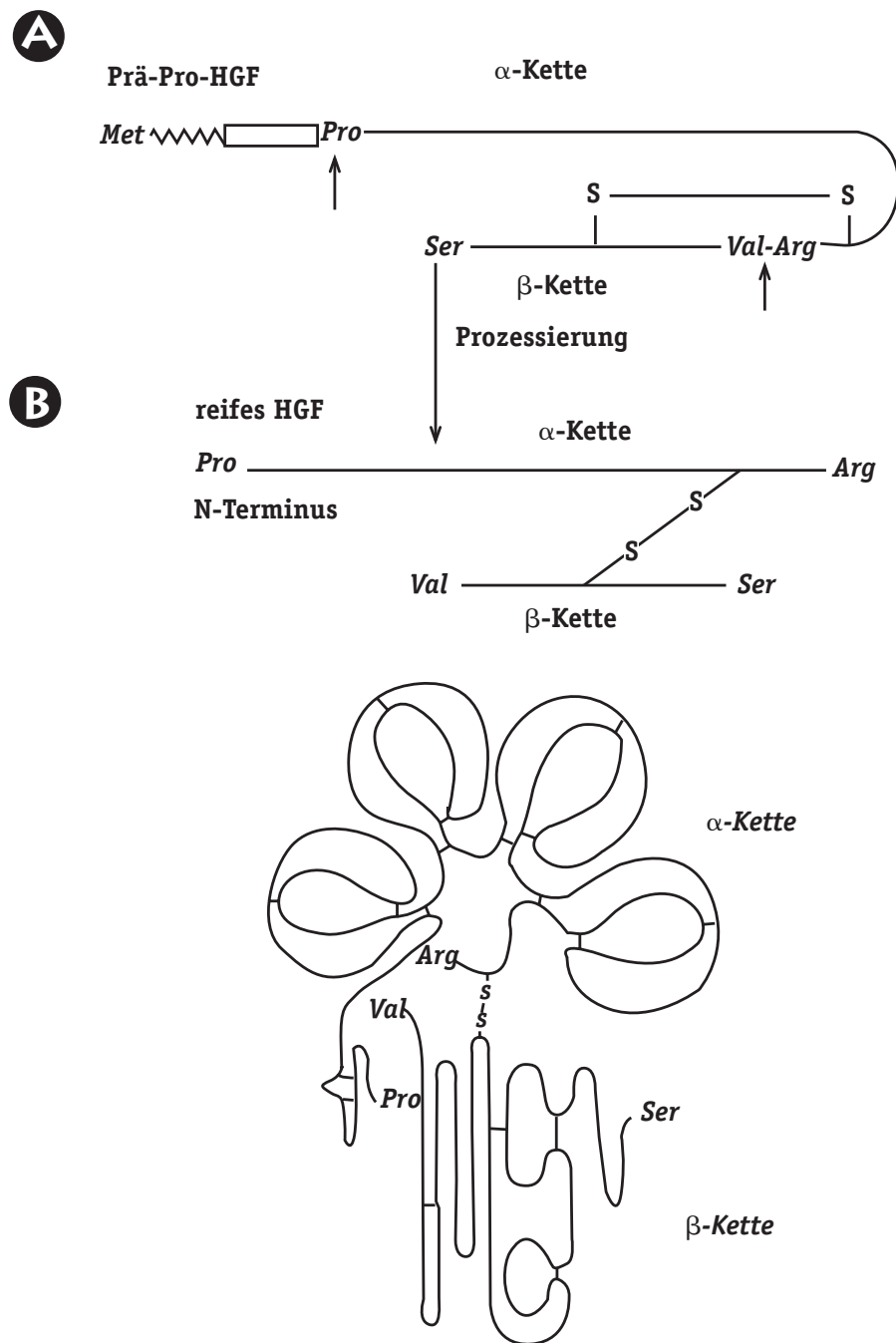


Abb 1: Prozessierung und Struktur des humanen HGF-Proteins in schematischer Darstellung

Schematische Darstellung der Prozessierung des Prä-Pro-HGFs (A). Die intramolekulare Spaltstelle hinter Arg₄₉₄ sowie die ungefähre Abspaltungsposition der Vorläufersequenzen sind mit Pfeilen markiert. In Teil B der Abbildung ist die hypothetische Struktur des vollständig prozessierten humanen HGF-Moleküls dargestellt. Die α - und β -Kette verbindende Disulfidbrücke (S-S) ist ebenfalls eingezeichnet. (Abbildung modifiziert nach NAKAMURA ET AL., 1989)

Mitogene Effekte:

HGF wirkt mitogen, d. h. es induziert die Zellproliferation. Nach experimentell induzierter Leberregeneration lässt sich HGF aus dem peripheren Blut teilhepatektomierter Ratten als stark wirksames Hepatozytenmitogen isolieren. Dabei steigt die HGF-Konzentration im Plasma auf das 25fache gegenüber Werten aus dem Plasma aus Kontrolltieren. Ein ähnlicher Anstieg des HGF-Levels erfolgte nach einer akuten Leberschädigung durch die Gabe von Hepatotoxinen, wie z. B. CCl_4 . 1 bis 2 h nach CCl_4 -Intoxikation konnte bereits ein 15–17facher Anstieg der HGF-Konzentration im Plasma beobachtet werden (LINDROOS ET AL., 1991). Die DNA-Synthese in den Hepatozyten startet innerhalb von 12 bis 16 h nach Teilhepatektomie bzw. nach CCl_4 -Schädigung und erreicht nach 22 bis 24 h bzw. in einem zweiten Zyklus nach 48 h das Maximum (RUSSELL ET AL., 1988). Der schnelle Anstieg der HGF-Plasmakonzentration erfolgt wahrscheinlich durch Freisetzung von gespeichertem HGF aus der extrazellulären Matrix, da ein Anstieg der HGF-mRNA erst 3 bis 6 h nach partieller Hepatektomie der Rattenleber zu beobachten ist (ZARNEGAR ET AL., 1991; KINOSHITA ET AL., 1991; MASUMOTO UND YAMAMOTO, 1991). *In vitro* besitzt HGF eine 2- bis 3fach stärkere mitogene Wirkung auf die DNA-Synthese von kultivierten Hepatozyten als äquimolare Mengen von 'Epidermal Growth Factor' (EGF) und 'Transforming Growth Factor' α ($\text{TGF}\alpha$). Diese mitogene Aktivität wird durch 'Transforming Growth Factor' β ($\text{TGF}\beta$) deutlich reduziert (ZARNEGAR UND MICHALOPOULOS, 1989). HGF induziert die Zellproliferation auch in einer Reihe anderer Epithelzelltypen wie z. B. in Keratinozyten, Nieren-, Brustdrüsen-, Gallengangs- und Bronchialepithelzellen sowie darüber hinaus auch in Melanozyten, Endothelzellen und Melanomzellen (RUBIN ET AL., 1991; MATSUMOTO ET AL., 1991A BZW. B; KAN ET AL., 1991).

Motogene Effekte:

HGF ist motogen, d. h. es wirkt stimulierend auf die Beweglichkeit von Epithel- und Endothelzellen (»Scatter«-Effekt). Dieser motogene Effekt des HGF kann eine Zellseparation (Unterbrechung von Desmosomen, tight- und gap-junctions), eine Veränderung der Zellmorphologie von einem epithelialen zu einem fibroblastartigen Phänotyp oder auch eine Migration von Zellen aus einem Zellverband bewirken (STOKER ET AL., 1987; WEIDNER ET AL., 1990; GHERARDI ET AL., 1989).

Morphogene Effekte:

HGF wirkt morphogen, d. h. es bewirkt eine strukturelle Veränderung in Zellen bzw. in Geweben. So induziert HGF die Ausbildung tubulärer Strukturen bei der Nierenepithelzelllinie MDCK (MONTESANO ET AL., 1991) und fördert trabekuläres Wachstum von Hepatozyten in dreidimensionalen Kollagengelen (BLOCK ET AL., 1996). Außerdem stimuliert HGF ausgeprägt die Angiogenese (BUSSOLINO ET AL., 1992).

Zytotoxische Effekte:

HGF wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch bzw. zytostatisch auf einige Karzinom- und Sarkomzelllinien (HIGASHIO ET AL., 1990). Ebenso inhibiert HGF das Wachstum von hepatozellulären Karzinomzelllinien (SHIOTA ET AL., 1992).

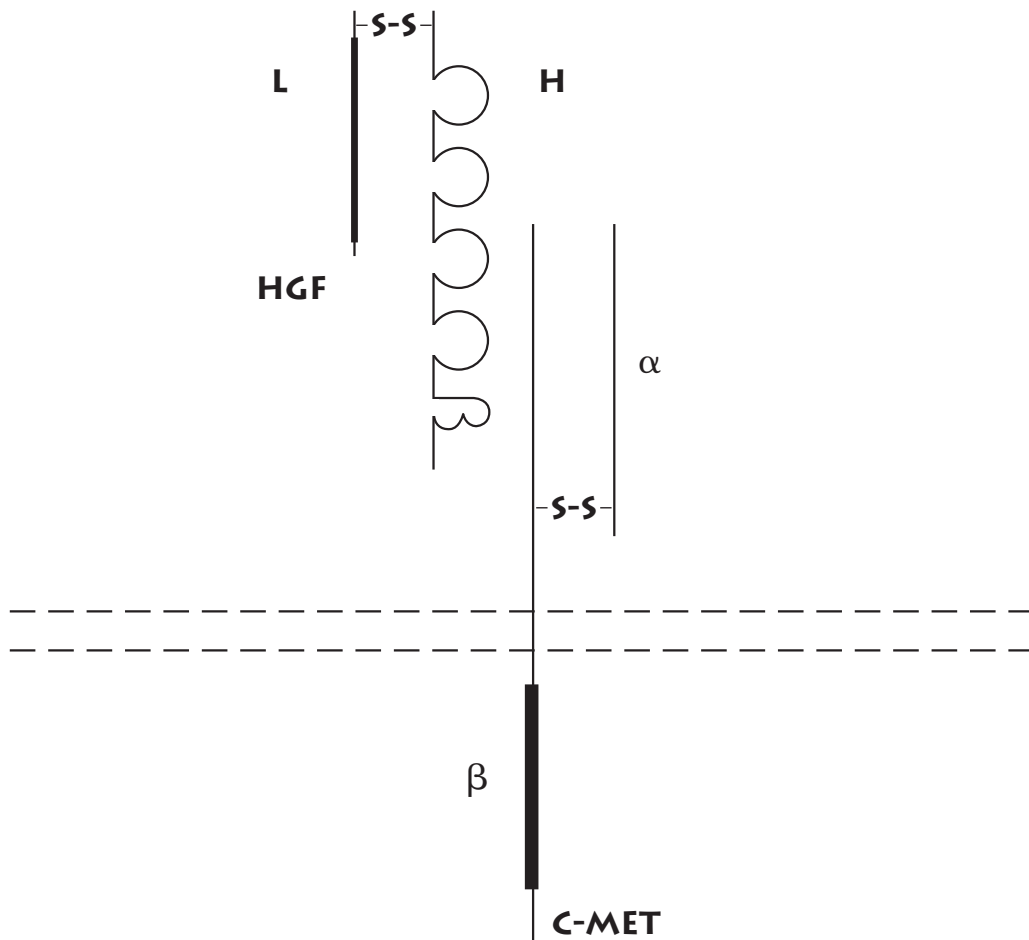


Abb. 2: Modell der Interaktion zwischen HGF und MET (HGF-Rezeptor)

Die Darstellung zeigt ein Modell der Interaktion des aktivierten HGF-Heterodimer mit dem c-met-Protein. Dabei bindet der N-terminale Teil des HGF-Polypeptids, bestehend aus einer Haarnadelschleifenstruktur und den zwei ersten Kringeldomänen, an die extrazelluläre Domäne der β -Kette des Rezeptors. Die schwere (H) und die leichte (L) Kette des HGF sowie die α - und β -Kette des c-met-Proteins sind durch Disulfidbrücken (S-S) verbunden.

1.1.3. Produktion von HGF in der Leber

In der normalen Leber wird HGF von einer einzigen Zellpopulation gebildet, den hepatischen Sternzellen (SCHIRMACHER ET AL., 1992; RAMADORI ET AL., 1992), die zahlenmäßig etwa 5–7 % aller Leberzellen ausmachen. Diese hochspezialisierten Zellen befinden sich in der Leber im Disse-Raum (WAKE, 1971), einem 0,5–2 µm breiten Spalt, der zwischen den Leberepithelzellen und dem sinusoidalen Endothel ausgebildet ist. Am auffälligsten sind die cytoplasmatischen Fetttropfchen der hepatischen Sternzellen, die zugleich eine wichtige Funktion – die Vitamin-A-Speicherung und Verstoffwechslung – darstellen (HENDRICKS ET AL., 1985). Die Anordnung der Zellorganellen ähnelt Fibroblasten; charakteristisch ist ihr ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum (WAKE, 1971). Eine weitere wichtige Funktion der hepatischen Sternzellen ist ihre Produktion von extrazellulärer Matrix. Es ist möglich, daß die hepatischen Sternzellen durch die HGF-Produktion die Regeneration der Parenchymzellen in der normalen Leber über parakrine Wechselwirkungen stimulieren, und so die wichtige homöostatische Kontrolle der Leberzellproliferation ausüben. Das sezernierte HGF wird über verschiedene Mechanismen inaktiviert, da es ein hochpotentes Zytokin mit Wirkung auf viele unterschiedliche Zelltypen ist. Einerseits erfolgt die Bindung an die extrazelluläre Matrix im subendothelialen Raum (MASUMOTO UND YAMAMOTO, 1991), andererseits liegen die zirkulierenden HGF-Polypeptide in hochmolekularen Komplexen vor (ZARNEGAR UND MICHALOPOULOS, 1989). Es wird diskutiert, daß diese Komplexe durch das verkürzte, lösliche *c-met* Protein und andere Faktoren wie z. B. Heparin gebunden und inaktiviert werden (PRAT ET AL., 1991; ZARNEGAR UND MICHALOPOULOS, 1989).

In der akut geschädigten Leber weisen erhöhte HGF-Plasmaspiegel mit nachfolgender DNA-Synthese in den Hepatozyten und anschließender Proliferation auf eine maßgebliche Beteiligung des HGF an der Leberregeneration hin. Verschiedene Vorgänge führen vermutlich zu dem erhöhten HGF-Plasmaspiegel. So kann eine Zunahme der HGF-Produktion durch die hepatischen Sternzellen erfolgen, durch erhöhte HGF-Produktion pro Zelle und/oder Erhöhung der Anzahl der hepatischen Sternzellen durch Zellteilung (SCHIRMACHER ET AL., 1993). In den Endothelzellen der Leber kann die HGF-Expression induziert werden (NOJI ET AL., 1990; MAHER, 1993) und infiltrierende Immunzellen können ebenfalls HGF produzieren (SCHIRMACHER ET AL., 1993). Außerdem ist die Freisetzung gespeicherten HGFs aus der extrazellulären Matrix wahrscheinlich (SHIMA ET AL., 1991; MASUMOTO UND YAMAMOTO, 1991).

Die chronisch geschädigte Leber, wie z. B. die Leberfibrose, ist durch vermehrte Bindegewebsablagerung (gestörtes Gleichgewicht Bildung/Abbau sowie verstärkte Ablagerung) sowie eine veränderte Architektur und zelluläre Anordnung des Leberparenchyms gekennzeichnet. Die hepatischen Sternzellen spielen vermutlich eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung der Leberfibrose, der Kollagenablagerung sowie der veränderten zellulären Zusammensetzung. Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen bei Leberschädigung, sowie bei Kultivierung frisch isolierter hepatischer Sternzellen, führt zu zellulärer Proliferation, Verlust der Lipidtröpfchen sowie verstärkter Expression von Matrixproteinen in diesen Zellen (GEERTS ET AL., 1989). Aktivierte hepatische Sternzellen besitzen einen myofibroblastartigen Phänotyp und sezernieren TGFβ, das einen starken Stimulus für die fibrogenische Reaktion darstellt. TGFβ wirkt chemotaktisch für Monozyten und es induziert in Makrophagen die Sekretion von weiterem TGFβ sowie anderer Zytokine, die zum entzündlichen Ablauf der Fibrose beitragen (WAHL ET AL., 1987; McCARTNEY-FRANCIS ET AL., 1988). Weiterhin induziert TGFβ die Produktion von extrazellulärer Matrix (ROSSI ET AL., 1988; RAGHOW ET AL., 1987). Die Autoinduktion von TGFβ in aktivierten hepatischen Sternzellen ist möglicherweise eine kontinuierliche

TGF β -Quelle in der chronischen Fibrose (BACHEM ET AL., 1992). Die Umwandlung der ruhenden hepatischen Sternzellen in aktivierte myofibroblastartige Zellen geht außerdem einher mit einem Verlust der HGF-Expression (SCHIRMACHER ET AL., 1992). Der Verlust einer basalen Stimulation der Leberzellproliferation bei chronisch fibrosierenden Lebererkrankungen kann möglicherweise Ursache einer verminderten Parenchymregeneration und letztlich auch einer Leberinsuffizienz sein.

1.1.4. Transkriptionsregulation des HGF-Gens

HGF wird sowohl posttranskriptionell durch Prozessierung als auch durch Inaktivierung des reifen HGF-Proteins einer wirksamen Regulation unterworfen. Eine maßgebliche Regulation der HGF-Expression findet jedoch auf der Ebene der Transkription statt. Untersuchungen beschrieben den HGF-mRNA-Anstieg in nichtparenchymatischen Leberzellen, die aus Hepatotoxin behandelten Ratten isoliert wurden (KINOSHITA ET AL., 1989). Dabei erfolgte der Anstieg der HGF-mRNA zeit- und dosisabhängig. 5 h nach CCL₄-Behandlung erfolgte ein rascher mRNA-Anstieg, das Maximum wurde nach 10 h erreicht. Bei der D-Galaktosamin-induzierten Leberschädigung erfolgt erst nach 24 h eine Erhöhung des mRNA-Levels (KINOSHITA ET AL., 1989). Weitere Hinweise für eine transkriptionell regulierte Genexpression des HGF lieferten Versuche mit humanen Fibroblasten, bei denen nach Stimulierung mit IL-1 α und IL-1 β sowie TNF α ein Anstieg der HGF-mRNA nachgewiesen werden konnte. IL-1 α und TNF α werden hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen produziert und wirken maßgeblich auf den Ablauf einer Entzündungsreaktion ein. Eine Induktion der HGF-Genexpression durch diese inflammatorischen Zytokine ist möglicherweise entscheidend für Gewebsregeneration, wie z. B. in der Wundheilung (MATSUMOTO ET AL., 1992A; TAMURA ET AL., 1993). Einen stark supprimierenden Effekt auf die Expression von HGF-mRNA in kultivierten hepatischen Sternzellen aus der Ratte sowie in der humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 zeigte TGF β (RAMADORI ET AL., 1992; MATSUMOTO ET AL., 1992B). Die DNA-Synthese in Rattenhepatozyten in Primärkultur wird durch TGF β stark inhibiert (CARR ET AL., 1986). Nach Teilhepatektomie erfolgt ein deutlicher Anstieg von TGF β -mRNA in der Rattenleber und erreicht sein Maximum nach dem größten Peak der Hepatozyten-DNA-Synthese (BRAUN ET AL., 1988). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß TGF β als Inhibitor der HGF-Genexpression eine wichtige Funktion bei der Suppression der Hepatozytenproliferation während der Leberregeneration ausübt. Für die promyelozytische Leukämiezelllinie HL-60 konnte ein Anstieg der HGF-mRNA nach Stimulierung mit TPA sowie eine Suppression der HGF-mRNA nach TGF β - bzw. Dexamethason-Stimulus nachgewiesen werden (NISHINO ET AL., 1991; MATSUMOTO ET AL., 1992B). Die Mechanismen, die zur Induktion der HGF-mRNA in den genannten Zellen bzw. Geweben führen, sind noch nicht genauer untersucht. Die Charakterisierung von zahlreichen Genen hat gezeigt, daß die 5' nicht transkribierten Sequenzen eines Gens eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen.

1.2. Der HGF-Promotor

Promotoren werden im allgemeinen über ihre Fähigkeit, die Transkription in geeigneten Testsystemen zu initiieren, identifiziert bzw. charakterisiert. Dabei handelt es sich um eine DNA-Region im 5' terminalen Bereich eines Gens, an die die RNA-Polymerase für die Transkriptionsinitiation binden kann. Im weiteren liegen im 5' flankierenden Bereich eines Gens bindende Sequenzen für regulatorische Proteine, deren Bindung einen positiven oder negativen Einfluß auf die Genexpression ausübt. Eine Analyse dieser 5' terminalen Region eines Gens ermöglicht somit einen Einblick in die Regulation seiner Transkription.

Abb. 3 zeigt die publizierten Sequenzen für die 5' terminalen Regionen des humanen HGF-Gens sowie des Ratten- und Maus HGF-Gens (MIYAZAWA ET AL., 1991A; OKAJIMA ET AL., 1993; LIU ET AL., 1994A). Die ersten 600 Basenpaare in dieser Region zeigen eine hohe Sequenzhomologie zwischen den drei Spezies, die weiter 5' liegenden Sequenzen sind im Ratten- und Maus-HGF-Gen ebenfalls stark homolog, wohingegen die Sequenz des humanen HGF-Promotors zunehmend variiert. Die typischen Kontrollelemente für die basalen Transkriptionsfaktoren, wie TATA-, CAAT- und GC-Boxen, die in vielen eukaryotischen Promotoren vorkommen, fehlen. Dafür liegt eine konservierte TATA-Box-ähnliche Sequenz in allen drei Promotoren vor. Die zahlreichen o. g. Studien zur Transkriptionsregulation des HGF-Gens ließen eine Reihe von proteinbindenden Sequenzen in der Promotorregion vermuten. Zu den folgenden Konsensussequenzen wurden homologe Regionen in den HGF-Promotoren von Ratte, Maus und Mensch beschrieben: IL-6-RE's (Interleukin 6 response element) Typ I und II, ein TRE (TPA response element), eine SP-1 Bindestelle sowie zwei TIE's (TGF β inhibitory elements), ein GRE (Glucocorticoid response element)-ähnliches Element und ein ISRE (Interferon stimulated response element). Einige Analysen des HGF-Promotors wurden bereits durchgeführt und lassen auf eine sehr komplexe Regulation des HGF-Gens schließen. So zeigte die Transfektion der 5' flankierenden Region des Ratten HGF-Gens in Rattenzelllinien, die ihren Ursprung aus verschiedenen Geweben hatten, eine gewebsspezifische Promotorfunktion. Des Weiteren wurde durch den Einsatz verschiedener Deletionsmutanten in Transfektionsstudien mit KNRK Zellen, einer Rattenzelllinie, eine negativ regulierte Region im HGF-Promotor ermittelt (ARAVAMUDAN ET AL., 1993). Die Transfektionsuntersuchungen der Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 bzw. der humanen Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 mit der 5' terminalen Region des Maus HGF-Gens lieferten Hinweise auf positiv sowie negativ regulierende Sequenzen in dieser Region. Stimulierungsversuche mit TGF β , TPA, IL-1, IL-6 sowie Östradiol und Progesteron zeigten jedoch keine signifikanten Änderungen der Promotor-CAT-Aktivitäten. Außerdem waren keine einheitlichen Aktivitätsmuster bei den untersuchten Zellen feststellbar, vielmehr scheint die HGF-Genregulation sehr stark zellspezifisch zu erfolgen (LIU ET AL., 1994A, PLASCHKE-SCHLÜTTER ET AL., 1995). Jiang et al. (1997b) konnten im Maus HGF-Promotor eine Bindesequenz für die Transkriptionsfaktoren SP-1 und SP-3 identifizieren. Die Bindung der Faktoren bewirkte eine Aktivierung der HGF-Promotoraktivität. Weitere Untersuchungen zur Regulation der Transkription des HGF-Gens zeigten eine Promotoraktivität in der mesenchymalen Zelllinie NIH3T3. Dagegen konnte in der epithelialen Zelllinie MCF7 keine HGF-Promotoraktivität nachgewiesen werden. Deletionsexperimente ermittelten eine inhibitorisch wirksame Sequenz im Bereich -229 bp bis -258 bp im HGF-Promotor. Die DNase I Footprint-Analyse zeigte sowohl mit Kernextrakten aus mesenchymalen als auch aus epithelialen Zellen eine Protektion dieser Sequenz durch Kernproteine. Der inhibitorische Effekt dieser Sequenz erwies sich als streng HGF-Promotorspezifisch. Für den Promotorbereich 14 bp bis -7 bp konnten spezifische Proteinbindesequenzen mit Kernproteinen aus mesenchymalen Zellen detektiert werden (PLASCHKE-SCHLÜTTER ET AL., 1995). Weitere Proteinbindungsstudien identifizierten eine Sequenz im Maus HGF-Promotor, an die ein negativ regulierendes, ca. 70 kDa schweres Kernprotein aus Epithelzellen bindet. Die supprimierende Wirkung des Proteins war auf den HGF-Promotor beschränkt, wie Versuche mit heterologen Promotoren zeigten. Außerdem sind für die vollständige Unterdrückung der HGF-Genexpression vermutlich eine Reihe weiterer Repressoren notwendig (LIU ET AL., 1994B).

Abb. 3: 5' flankierende Sequenzen des Ratten, Maus und humanen HGF-Gen's

				ISRE		
-1207	R	GAAGGTCTCA	CATTCTGTTG	ACTTTCTCTT	TCTCTAAAG	AGGTATTCGT
	M	GGTATTAGTT	CCTTTGGGTA	TCTAGTCGTC	AGAAATACAG	AGGTAT -CTA
-1157	R	TCTTCTGAGT	ATCCATCTCA	GAAACACTGT	ACTCTGTTCT	CTGACACATC
	M	T -GCCTCAAA	ATC - -TATTA	GAGACACAGT	ACGCT -ATCT	CTGACACATC
			IL-6-RE Typ I			
-1107	R	AGAGCACCT	CCTCGTGTG	TAATAAAAGG	AGAAGTCTGG	GCAATGATCT
	M	AGAGCACCA	CCAGGTGTG	TAATAAAAGG	AGAAGTCTGG	ACAATGATCT
			TIE			
-1057	R	CACCAAAACG	TGATACTCAG	GGATC - -AGA	GCCCCTCTGC	CCCCTCCCTC
	M	CACCAAAACG	TGATACTCAT	GGATTGAGC	ACCCCTCTGC	TTCTCCCTC
					PEA3	
-1009	R	CCCGAAGA - -	CCGTGGTGCT	GTGGGTGTGT	GTAGGAGGAA	AGAGGTTGAG
	M	CCTGAAGACT	GTGTGATGCT	GTGGGTGTGT	GTAGGAGAAA	AGAGGTTAAG
-961	R	ACCTTACTTA	GGAATTAATA	TAGCCCAATG	GGTCTCTAGT	GAAATCTTC
	M	ACGTCATTTA	GGAATTAATA	TAGTCCAACG	GGTCTCAAGT	GAAAGCTTA
-911	R	ATGCATACAT	ACTGACATGT	GGACATATGT	GATTGTGTAC	AAGGTTAGAA
	M	GTGCATACAT	ACTGACGTGT	GAACATGTGT	AACTGTACAC	AAGGTCAGAA
-861	R	AAACAGTAT	CTGTTTGCTT	GTCAGGGATA	AGAAACGGGC	CATGTCTGTC
	M	AGACCATTAT	CTATTTGCTT	GTCAGGGAGA	TGCAAAGTGC	CATGTCT - - -
-811	R	CCTTAGATGG	TTAAGGGAA	ATTATCAACA	GATACATCAG	AAAACAGACA
	M	-----ATCC	CTTAAGAGAA	ATTATCAACA	GATACATCAG	AAAACAGACA
-761	R	TTTGAAAAT	GTATTTGGGA	TCCTTTTGCA	GTGGTTTGGG	GATAGCTCTT
	M	TTTGAAACAT	TTATTTGGGA	TCCTTTTGCA	GTGGTTTGGG	G - TAGCTCTT
			IL-6-RE Typ I, PEA3			
-711	R	CTGAGGAAAG	TC-----	-----AC-	TGGACAGGGC	AATTTTCTGG
	M	CTGAGGAAAG	CTGCC - ATGC	TGAGCCCA -	TAGACTGGGC	AATTTTCTGG
	H	AAAAAAAAAAG	CTGCCTGCTC	TGAGCCCATG	GGGCAGGGGC	AATTTTTTCA

-676	R	CCTGAAACCC	TGAGTGTTT -	TGTTTCTGTT	GCTATTTCTT	CTCATCCCTC
	M	CCTGAAAACC	AGGGTGTTTT	TGTTTCTGGT	GCTATTTCTT	CTCATTCGTC
	H	TCTGACAATC	TGCGTGCTTT	TGTTTTGCTT	GCT - - - TATT	TTGGCCCCAC
-627	R	AAGGCCACAC	CCTTTTGTTA	CCTGCCCTCT	TTC - ACC - - -	-----
	M	AAGGCCCCAC	GCTTTTCTTA	CCTGCCCTCT	TTCTACC - - -	-----
	H	AATACCACAC	CCTTTTCTTA	ACTAACCTCT	TTCTACCTGG	GCTGGACGTG
-591	R	- - TGGTCTCT	GCCCCCTGA	CTCC - CTTTC	TCTTCTCTTA	CTTTCCTTAA
	M	- - TGGGCTCT	GCACCCCTGA	CTTC - CTTAC	TCTGCTCTTA	CTGTCTTTAA
	H	CCTGGGCTCT	CCTCCC - TGG	CCCCGCTCCC	ACCTCTCCA	GGTCTCTAAA
-544	R	AATCCCGGGA	A - CTGGGGTC	AGTGTTC - -	- TCCCGAAT	CTCTCCAACA
	M	AATCCCGGGA	AACTGGGGTC	AGTGTTC - -	- TCCCTGAAT	CTCTCCAGCA
	H	CCCCTAGAGA	A - CCTGTGTC	AGTGTTTTGA	ATCCCTCAGT	TGCTCTAGCA
-497	R	CTGCAAGCTC	G - CAGACTAG	GAGCTGGGGC	TCATTTGGCA	GAAGGGGCTC
	M	CTGCAAGCTC	G - CAGACTAT	GAGCTGGGGC	TCATTTGGCA	TAAGGG - CTG
	H	- GGAAAATA	GACAGATTAG	GAGCTGGGGC	ACATTTGGCT	GAAAGACAGC
					IL-6-RE Typ II	
-449	R	TC - - CGCTCT	CCTCTTATGC	TGCTTCCCCT	TCCTCTTTTC	CCAGATAGAT
	M	TC - - CGCTCT	CTTCTTATGC	TGCTTCCCCT	TCCTCTTTTC	CCAGATAGAT
	H	TCTTCGCTTT	CTTCTTATGC	TGCTTCCCCT	TCCTCTTTTC	CCAAATAGAT
			PEA3		SP-1 TIE-1	
-401	R	ATGTAAACAC	ATGCATTTTC	CTGTTTAAAC	GGGGCGAATT	GGTGTTCAGC
	M	ATGTAAACAC	ATGCATTTTC	CTGTTCAAAC	GGGGCGAATT	GGTGTTCAGC
	H	ATATAAACAC	ATGTATTTTC	CTGTTTAAAT	TGAGCGAATT	GGTCCCCTGC
				TRE		
-351	R	CTGTGCCTTG	ACTTAGCGAT	TGGGCTGAGT	CTTGCTCCTC	CCTTCCCTAC
	M	CTGTGCCTTG	ACTTAGCGAT	TGGGCTGAGC	CTTGCTCCTC	CCTTCCCTAC
	H	CTGTGCCTTG	ATTTAGCCAT	TGGGCTCAGC	CTTGCTCCTC	CCTTCCCTAC
			IL-6-RE Typ II			
-301	R	TCGGATAGGA	GCCACAAGGA	TCTGGAGCTC	AGGCTTCTAA	ATTGCAGCTG
	M	TCGGATAGGA	GCCACAAGGA	TCTGGAGCTC	CAGCTTCCAA	ATTGCAGCTG
	H	TCGGATAGGA	GCCACTGGGA	TCTGGAGCTC	CAGCTTCCAA	ATTGAAGCTG
					IL-6-RE Typ II	
-251	R	GCCTC - GGCC	AGGTGACCTT	TGCTTTGTAA	GTTTCTTT - -	----- CTG
	M	GCCTCGGGCC	AGGTGACCTT	TGCTTTGTAA	GTTTCTTT - -	----- CTG
	H	GCCTCAGGCC	AGGTGACCTT	TTCTTTGTAA	GTTTCTTTCC	TAAGCGGGTG

IL-6-RE Typ II						
-210	R	GGAGGGGGAG	TGAGTGGAGT	GGGGAGAG --	- CTGGGATCT	G - TTGCT - - T
	M	GGA - - GGGGG	AGTGTGTGGA	GGGGAGAG --	- CTGGGATCT	G - TTGCTTGT
	H	GTTGGGGGGA	GGCGGGGAAT	GGGGGGGGTT	GCAGGGATCT	GTTTGGTGTCT
IL-6-RE Typ I						
-166	R	GTTG - GGGGG	GGGGGGTTAA	GGAAAGGAAG	GGGCTGGAAG	AGAGTAAAGG
	M	TGGG - GGGGG	GGGGGGTTGA	GGAAAGGAAG	GGGCTGGAAG	AGAGTAAAGG
	H	GTTGAGAGGG	GGGCGAGTGA	GGAAAGGAGG	GGGCTGGAAG	AGAGTAAAGG
-117	R	GCTGTTGTTA	AACAGTTTCT	TACCGTAAGA	GGGAGTTTAG	TCCTAGATCT
	M	GCTGTTGTTA	AACAGTTTCT	TACCGTAAGA	GGGAGTTCAG	ACCTAGATCT
	H	GCTGTTGTTA	AACAGTTTCT	TACCGTAAGA	GGGAGTTCAG	ACCTAGATCT
TATA-Box ähnliche Region						
-67	R	TTCCAGTTAA	TCACACACAA	CAAACCTAGC	TCATCGCAAT	AAAA - GCAGC
	M	TTCCAGTTAA	TCACACACAA	CAAACCTAGC	TCATCGCAAT	AAAA - GCAGC
	H	TTCCAGTTAA	TCACACACAA	CAAACCTAGC	TCATCGCAAT	AAAAAGCAGC
Transkription						
-18	R	TCAGAACCGA	CCGGCT - - - -	-----	-- T GCA ACAG	GATTCTTTCA
	M	TCAGAACCGA	CCGGTT - - - -	-----	-- T GCA ACAG	GATTCTTTCA
	H	TCAGAGCCGA	CTGGCTCTTT	T AGGCACTGA	CTCCGAACAG	GATTCTTTCA
Translation =>						
+17	R	GCCCGGCATC	TCCTGCAGAC	CCATCAGCCT	GCTCGAACTG	CA - - - - <u>ATG</u>
	M	GCCCGGCATC	TCCTGCAGAG	GGATCAGTCT	GCTCGAACTG	CA - - <u>AGCATG</u>
	H	CCCAGGCATC	TCCTCCAGAG	GGATCCGCCA	GCCCGTCCAG	CAGCAC <u>CATG</u>

Vergleich der Nukleotidsequenz der 5' terminalen Region des Ratten (R), Maus (M) und humanen (H) HGF-Gens. Die Sequenzen für Ratte und Maus sind aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 92,3 % bis -1207 bp aufgeführt. Die 5' terminale Region des humanen HGF-Gens weist bis -711 bp eine Sequenzhomologie von 83,4% gegenüber den murinen Sequenzen auf, im weiter 5' gelegenen Bereich differieren die Sequenzen erheblich. Der Haupttranskriptionsstartpunkt (+1) für den Ratten- sowie den Maus-Promotor (OKAJIMA ET AL., 1993; LIU ET AL., 1994A) ist jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert. Die Rattensequenz ist vom Transkriptionsstartpunkt ausgehend durchnummeriert. Auf diese Numerierung beziehen sich alle in dieser Arbeit angegebenen Positionen. Potentielle Proteinbindesequenzen sowie die TATA-Box-ähnliche Sequenz sind fett gedruckt. Sich überlappende Proteinbindesequenzen sind zusätzlich kursiv gedruckt.

2. AUFGABENSTELLUNG

Die Umwandlung der hepatischen Sternzellen in proliferierende Myofibroblasten in der chronisch erkrankten Leber geht einher mit dem Verlust der HGF-Expression und einer gleichzeitigen Aktivierung der TGF β -Expression. Es besteht somit eine mögliche direkte Beziehung zwischen fibrogenen und regenerativen Mediator-Systemen. Für das Verständnis der HGF-Genregulation und eines möglichen direkten Einflusses von TGF β auf die HGF-Transkription, ist eine genaue Analyse der 5' HGF-genregulatorischen Sequenz erforderlich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse der 5' flankierenden Region des Ratten HGF-Gens. Es sollten mögliche positive bzw. negative *cis*-regulatorische Elemente identifiziert und charakterisiert werden, die einen Einfluß auf die Transkription des HGF-Gens ausüben.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte der Schwerpunkt auf der möglichen Transkriptionsregulation des HGF-Gens durch TGF β in verschiedenen Zelllinien sowie hepatischen Sternzellen liegen und mögliche hierfür verantwortliche Sequenzen in der 5' genregulatorischen Region des HGF-Gens identifiziert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Allgemeines

3.1.1. Chemikalien, Plastikwaren und sonstige Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien und Lösungen von Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in pro analysis (p.a.)-Qualität bezogen. Reagenzien und Inkubationspuffer für die molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Boehringer Mannheim verwendet. Die Medien und anderen Zusätze für die Zellkultur wurden von Seromed (Berlin), das fötale Kälberserum von PAN Systems (Nürnberg), alle sterilen Plastikwaren für Zellkulturarbeiten von der Firma Greiner (Nürtingen) verwendet. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße lieferte die Firma Eppendorf (Hamburg).

Die Sterilisation der Glas- und Metallgeräte erfolgte für mindestens 6 h im Trockenschrank bei 180° C.

3.1.2. Herstellung von Lösungen

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit vollentsalztem Wasser aus einer Millipore-Q Plus-Anlage (Millipore, Molsheim, Frankreich) angesetzt.

Die Sterilisation erfolgte, falls notwendig, durch Sterilfiltration (0,22µm Durchmesser) oder durch feuchte Hitze in einem KSG 40/60 Vertikal-Autoklaven (KSG, Olching) bei 121° C und 1,2 bar Überdruck für 25 min.

Für die Arbeiten mit RNA wurden alle Lösungen mit 0,1% [v/v] Diethylpyrocarbonat – (DEPC, Fluka, Neu-Ulm) behandeltem Wasser angesetzt.

Für die Herstellung der Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion wurde Ampuwa-Wasser (steriles pyrogenfreies Aqua ad iniectabilia nach DAB9, Fresenius AG, Bad Homburg) verwendet.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zellkulturtechnik und Medien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37° C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 6-well-Platten, in 94 mm bzw. 150 mm Petrischalen. Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Materialien unter einer Sicherheitswerkbank (Microflow Sicherheitswerkbank Klasse 2, Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Die Medien und Lösungen wurden bei 4° C bzw. bei –20° C gelagert.

Passagieren der Zellen:

Die Zellen wurden bei einer Dichte von ca 90 % Konfluenz passagiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und je nach Petrischalengröße wurde 0,5 bis 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 % Trypsin/0,03 % EDTA in 1x PBS: 8,2 g NaCl, 5 g Na₂HPO₄, 0,68 g KH₂PO₄ ad 1l H₂O, pH 7,4) auf die Schalen gegeben, durch Schwenken der Schalen verteilt und wieder abgesaugt. Die auf den Petrischalen verbleibende Trypsin/EDTA-Lösung löste die Zellen vom Boden der Schalen ab und nach wenigen Minuten wurde diese Reaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde nun in geeigneter Verdünnung in neue Petrischalen ausgesät.

Bestimmung der Zellzahl:

Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ein Aliquot der gut durchmischten Zellsuspension wurde steril entnommen und nach 1:2-Verdünnung mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 % [w/v]) in die Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wurden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen} \times 1000}{\text{Kammerhöhe (0,1 mm)} \times \text{Verdünnung} \times \text{Fläche der Großquadrate (4 mm}^2\text{)}} = \text{Zellzahl/ml}$$

Auftauen und Einfrieren von Zellen:

Nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff wurde das Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37° C zügig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde auf eine 94 mm Petrischale überführt, mit 9 ml kaltem Kulturmedium versetzt und durch Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Nach ca. 10 min wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

Für das Einfrieren von Zellen erfolgte zunächst die Aufzucht in 150 mm Petrischalen bis zu einer Zelldichte von ca 80–90 % Konfluenz. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 8 min bei 1200 Upm in 50 ml-PPN-Röhrchen abzentrifugiert (Varifuge RT, 5315-Rotor, Heraeus). Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt und die Zellen wurden in eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 5 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert, so daß sie eine Dichte von 1–2 x 10⁶ Zellen/ml erreichten. Die Zellsuspension wurde nun in 1 ml-Einfrierröhrchen (Nunc Inter Med, Kamstrup, Dänemark) aliquotiert und bei Temperatursenkungen von ca 1° C/min bei –70° C eingefroren. Nach 24 h erfolgte die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Kulturmedium:

Das verwendete Kulturmedium enthielt stabiles Glutamin.

DMEM:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (4,5 g/l Glukose)
	Zusätze: Penicillin 500 I.E.
	Streptomycin 500 µg/ml
	Fetales Kälberserum 5–10 % (w/v)
RPMI 1640:	2,0 g/l NaHCO ₃ , 0,532g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin
	Zusätze: 50µg/ml Gentamycin
	Fetales Kälberserum 5–10 % (w/v)

3.2.2. Verwendete Primärzellkulturen

3.2.2.1. Humane Lungenfibroblasten

Die humanen embryonalen Lungenfibroblasten FH109 wurden uns freundlicherweise von der AG Wieser, Institut für Toxikologie, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen sind nicht transformiert, haben nur eine begrenzte Lebensdauer und unterliegen einem Alterungsprozeß, während dem sich das Wachstumsverhalten und ihre Stoffwechselleistungen verändern (WIESER ET AL., 1985). Bei den Untersuchungen wurden nur Zellen der 7. bis 10. Passage verwendet. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in 10 % DMEM.

3.2.2.2. Isolierung und Kultivierung von hepatischen Sternzellen aus der Rattenleber

Die hepatischen Sternzellen wurden aus der Rattenleber mittels Kollagenase/Pronase-Perfusion isoliert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank mit sterilen Instrumenten und Lösungen. Zunächst erfolgte die Betäubung des Tieres, das zuvor mit einer Vitamin A angereicherten Kost ernährt wurde, mit 60 mg Nembutal/kg Körpergewicht. Nach Eröffnung des Abdomens wurde die Perfusionsnadel in die Pfortader eingeführt, die Leberarterie durchtrennt und die Leber 30 min mit 150 mg Kollagenase und 240 mg Pronase in 500 ml GBSS-Lösung 37° C (Zusammensetzung siehe unten) perfundiert. Anschließend wurde die perfundierte Leber in einer Petrischale von Fettgewebe befreit und die Leberzellen wurden mit einer Pinzette ausgestrichen und mit 50 mg Kollagenase und 50 mg Pronase in 100 ml GBSS-Lösung auf dem Rundschtüttler (Certomat HK Inkubator und Certomat U Rundschtüttler; Braun Melsungen) bei 37° C und 200 Upm 30 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann über ein 100 µm Netz gegeben und für 2 min bei 600 Upm (Varifuge RT, 5315-Rotor, Heraeus) in 50 ml PPN-Röhrchen sedimentiert. Nach dem Waschen der Zellen mit GBSS-Lösung ohne CaCl₂ wurde die Suspension bei 1570 Upm sedimentiert und das Pellet in GBSS-Lösung ohne CaCl₂ und NaCl suspendiert und mit der notwendigen Menge Nykodenz versetzt, so daß eine Endkonzentration von 11,5% Nykodenz erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde dann mit 1 ml GBSS überschichtet und 20 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Die hepatischen Sternzellen bildeten eine weiße Schicht am oberen Rand des Nykodenzgradienten. Sie wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und nach dem Waschen und Zählen in 20% DMEM auf 94 mm Petrischalen mit einer Dichte von ca 1 Mio Zellen pro Schale ausgesät.

GBSS-Lösung, Mengenangaben pro Liter:		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O		0,22 g
KCl		0,37 g
NaH ₂ PO ₄		0,03 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		0,21 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O		0,07 g
NaCl		8,0 g
NaHCO ₃		0,227 g
Na ₂ HPO ₄		0,12 g
D-Glukose		1,0 g
DNase		0,01 g

3.2.3. Verwendete Zelllinien

Die Zelllinien wurden von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) oder von der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen.

KNRK:	Rattennierenzellen (AARONSON UND WEAVER, 1971) Kultivierung in 5% DMEM.
Rat2:	embryonale Rattenfibroblasten (TOPP, 1981) Kultivierung in 5% DMEM.
NIH3T3:	embryonale Mausfibroblasten (ANDERSON ET AL., 1979) Kultivierung in 10% DMEM.
KG-1:	humane myeloblastische Leukämiezellen (KOEFFLER UND GOLDE 1978) Kultivierung in 10% RPMI

3.2.4. CAT-Assay

3.2.4.1. Transfektion

Stabile Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat, Boehringer) und der KNRK-Zelllinie durchgeführt. Die Aussaat der Zellen erfolgte einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von ca 50 % Konfluenz in 94 mm Petrischalen in 5 % DMEM. Einige Stunden vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Die Transfektion erfolgte mit dem DOTAP-Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers. Nach 72 h wurden die transfizierten Zellen passagiert und in einer Verdünnung von 1:15 auf fünf 94 mm Petrischalen ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Selektivmedium, 5 % DMEM mit einem Zusatz von 200 µg Geneticin/ml Kulturmedium. Alle 4–5 Tage erfolgte ein Kulturmediumwechsel. Die stabil transfizierten Zellen wuchsen innerhalb von 20–30 Tagen zu Kolonien auf der Petrischale heran; diese wurden isoliert gewonnen, lysiert (3.2.4.2.) und im CAT-ELISA (3.2.4.4.) auf ihre CAT-Produktion getestet.

3.2.4.2. Zellyse

Die Zellyse erfolgte mit Hilfe des Lysis-Puffers des CAT-ELISA Kits (Boehringer Mannheim). Nachdem die Zellen dreimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie 30 Minuten bei Raumtemperatur in 500 µl 1x Lysispuffer inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4° C und 15000 Upm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend sofort in flüssigem Stickstoff gefroren oder direkt für den CAT-ELISA weiterverwendet.

3.2.4.3. BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem BCA-Kit von Pierce (Rockford, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Falls die Konzentration über 500 µg/ml betrug, wurde entsprechend mit Lysis-Puffer verdünnt.

3.2.4.4. CAT-ELISA

200 µl des zu testenden Zelllysates wurden 1 bis 2 Stunden in anti-CAT-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatten bei 37° C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Digoxigenin-gekoppelter anti-CAT-Antikörper (2 µg/ml) hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37° C wurden 200 µl Peroxidase konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper (150 mU/ml) hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37° C und Zugabe von 200 µl Substrat (ABTS) erfolgte ein Farbumschlag, der photometrisch bei 405 nm gemessen wurde (Immunoreader NJ-2000, Nunc, Wiesbaden).

3.2.5. Stimulierung von Zellen

3.2.5.1. Stimulierungsversuche an den stabil transfizierten KNRK-Zellklonen

Die stabil transfizierten KNRK-Zellklone wurden in serumhaltigem (5 % DMEM) bzw. in 'serumfreiem' (0,5 % DMEM) Kulturmedium mit folgenden Stimulanzien (PBH, Hannover), jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen, für 16 h inkubiert:

1. humanes rekombinantes Interferon α (IFN α)	Konz./ml: 100 U/1000 U
2. humanes rekombinantes Interferon γ (IFN γ)	50 U/500 U
3. Dexamethason	10 nM/1 μ M
4. humanes rekombinantes Interleukin-1 β (IL-1 β)	1 U/100 U
5. humanes rekombinantes Interleukin-6 (IL-6)	100 U/500 U
6. Lipopolysaccharid (LPS) aus E.coli	1 μ g/5 μ g
7. Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)	1 ng/10 ng
8. humaner rekombinanter 'Transforming Growth Factor' β 1 (TGF β 1)	0,1 ng/10 ng
9. humaner rekombinanter 'Tumor Necrosis Factor' α (TNF α)	150 U/250 U
10. humaner rekombinanter 'Epidermal Growth Factor' (EGF)	50 ng
11. humaner rekombinanter 'Platelet Derived Growth Factor' (PDGF)	40 ng/100 ng

Die eingesetzten Stimulanzen waren in Ethanol (Dexamethason, TPA), in Essigsäure 0,1 M (TGF β 1) bzw. in PBS pH 7,4 unter sterilen Bedingungen gelöst.

Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und im CAT-ELISA wurde die produzierte CAT-Enzymmenge bestimmt.

3.2.5.2. Stimulierungsversuche an Primärzellen und Zelllinien

Die Stimulierung der Zellen für eine nachfolgende 'Northern Blot'-Analyse der HGF-Expression erfolgte mit folgenden Zytokinen:

TPA, 10 ng/ml Kulturmedium
TGF β 1, 5 ng/ml Kulturmedium

Die Inkubation mit diesen Substanzen erfolgte über verschiedene, in den Versuchen jeweils angegebene Zeiträume. Die Zellen wurden nach der Stimulierung geerntet, sedimentiert und für die Isolierung von Gesamt-RNA in eiskalter Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung (4 M GITC, 0,5 % [w/v] N-Laurylsarcosyl, 25 mM Natriumcitrat; pH 7,0 und 100 mM β -Mercaptoethanol) lysiert und bei -70° C bis zur weiteren Verarbeitung schockgefroren.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Herstellung geeigneter DNA-Fragmente sowie für die Charakterisierung von Plasmiden erfolgte eine enzymatische Hydrolyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die Restriktion wurden 5 U Restriktionsenzym pro μ g DNA eingesetzt und die Reaktion über mindestens 3 h bei 37° C im entsprechenden Reaktionspuffer durchgeführt.

3.3.2. Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren

3.3.2.1. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Für die Überprüfung einer Restriktion sowie für die Isolierung eines DNA-Fragmentes wurde die DNA, je nach Molekülgröße, über ein 0,8–2 %iges Agarosegel (SeaKem ME-Agarose; Biozym, Hameln), das

mit TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Eisessig, 1,25 mM EDTA; pH 8,0) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt wurde, elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer eingesetzt. Die DNA-Proben sowie geeignete Molekulargewichtsmarker wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{6}$ Volumen Auftragspuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 30 % [v/v] Glycerin) versetzt. Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe einer MP 4 Land Kamera von Polaroid (Cambridge, MA, USA) unter Verwendung einer Chroma 43 UV-Kontaktlampe (Vetter, Wiesloch).

3.3.2.2. DNA-Molekulargewichtsmarker

Es wurden die DNA-Längenstandards II und III von Boehringer Mannheim verwendet. Diese entsprachen der DNA des Phagen Lambda hydrolysiert mit dem Restriktionsenzym *HindIII* (Standard II) bzw. hydrolysiert mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRI* (Standard III). DNA-Längenstandard VI stellte ein Gemisch von DNA des Plasmides pBR 328, zum einen hydrolysiert mit Restriktionsenzym *BglI*, zum anderen hydrolysiert mit *HinfI*, dar.

3.3.2.3. Gelelektion

Die Isolierung und Reinigung des gewünschten DNA-Fragments erfolgte nach einer präparativen gelelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe von Glasmilch (VOGELSTEIN UND GILLESPIE ET AL., 1979).

Dazu wurde die Bande des zu isolierenden DNA-Fragments unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten und die DNA mit einem 'Prep-A-Gene DNA Purification Kit' (Biorad, Richmond, CA, USA), gemäß den Angaben des Herstellers, aus dem Agarosegelstück eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der eluierten DNA erfolgte einerseits durch den Auftrag auf ein Agarosegel mit bekannter DNA-Standardmenge sowie photometrisch durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV 160 A Spektrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Extinktion $E_{260} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotid (SAMBROOK ET AL., 1989). Um mögliche Proteinverunreinigungen der DNA zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Absorptionen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gebildet, wobei nukleinsäurehaltige Lösungen als ausreichend rein angesehen wurden, wenn der E_{260}/E_{280} -Quotient zwischen 1,8 und 2,0 lag.

3.3.3. Reinigung von Nukleinsäuren

Proteinverunreinigungen in nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden durch die Extraktion mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform (im Verhältnis 1:1 [v/v]) entfernt. Nach kräftigem Schütteln des Phenol-Chloroform-Nukleinsäure-Gemischs erfolgte ein 5minütiger Zentrifugationsschritt bei 15000 upm und RT (54156-Eppendorf-Zentrifuge, F-45-18-11-Rotor). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phenolrückstände darin wurden durch eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (24:1) beseitigt. Nach Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,5fachem Volumen Ethanol p. a. wurden die Nukleinsäuren bei -70°C für mindestens 10 min präzipitiert, anschließend 30 min bei 15000 upm und 4°C sedimentiert, mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet (Speed Vac, Refrigerated Condensation Trap, Savant). Die Resuspension der DNA erfolgte in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) oder in autoklaviertem H_2O .

3.3.4. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.3.4.1. Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide

Folgende Vektoren wurden verwendet:

pBAT FS 2,7 kb:

Dieses Expressionsplasmid enthält das komplette, 2,7 kb große *PstI*-cDNA-Fragment des humanen HGF's und wurde von Guido Hartmann (Institut für Zellbiologie, Tumorforschung, Universitätsklinik Essen) zur Verfügung gestellt.

pBluescript SK(-) von Stratagene (La Jolla, CA, USA):

Der pBluescript-Vektor ist ein 2,95 kb großes Plasmid, das ein Ampicillinresistenzgen sowie das lacZ-Gen enthält. Das lacZ-Gen ermöglicht eine blau/weiß-Selektion von rekombinanten Klonen; über das Ampicillinresistenzgen kann zusätzlich eine Selektion der Klone erfolgen. Seine 'Polylinker'-Region enthält 21 singuläre Restriktionsschnittstellen, die von den RNA-Polymerase-Promotoren der Bakteriophagen T3 und T7 flankiert sind.

pCATbasic von Promega (Madison, WI, USA):

Der pCATbasic-Vektor enthält die Sequenz des Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gens ohne vorgeschaltete eukaryontische Promotor- und 'Enhancer'-Sequenzen. Die Insertion eines funktionalen Promotors kann in die 'Polylinker'-Region vor dem CAT-Gen erfolgen. 'Enhancer'-Sequenzen können nach dem CAT-Gen inseriert werden. Außerdem enthält der Vektor das Ampicillinresistenzgen.

pGEM-3Z von Promega:

Der 2743 bp große Vektor beinhaltet eine multiple Klonierungsregion mit 13 singulären Restriktionsschnittstellen. Diese Region wird von den RNA-Polymerase-Promotoren der Bakteriophagen SP 6 und T 7 flankiert. Außerdem enthält der Vektor das lacZ-Gen sowie das Ampicillinresistenzgen.

Folgende rekombinante Plasmide wurden verwendet:

pBrHGF-Promotor:

Das 1367 bp-HGF-Promotor-Fragment, das durch PCR-Amplifikation mit den Primern P 24 und P 19 aus einer *ScaI*-restringierten, genomischen, adulten Rattenleber-DNA entstand, wurde über die *PstI* und die *SmaI*-Schnittstelle in den Vektor pBluescript SK (-) inseriert und sequenziert.

pCATrHGF-Promotor:

Die Klonierung des 1356 bp-HGF-Promotor-Fragments, das aus dem Plasmid pBrHGF-Promotor stammte, erfolgte in den Vektor pCAT-Basic mit anschließender Sequenzierung.

pGhHGF:

Die Klonierung des 2,2 kb-*BamHI/KpnI*-Fragments der humanen HGF-cDNA, das aus dem Plasmid pBAT FS 2,7 kb stammte, erfolgte in den Vektor pGEM-3Z. Das inserierte Fragment zeigt eine anti-sense Orientierung zum T7-Promotor.

pSPTfos 2,1 kb:

Die Klonierung des 2,1 kb -Fragments der humanen *c-fos*-cDNA in den Vektor pSPT 18/19 erfolgte über die Restriktionsschnittstelle *EcoRI*.

3.3.4.2. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden wurden 100–200 ng linearisierte, phenolisierte Vektor-DNA mit der gleichen molaren Menge bzw. der doppelten oder fünffachen molaren Menge des zu inserierenden DNA-Fragments eingesetzt. Für die 'blunt-end'-Ligation wurden die gereinigten PCR-Produkte vor der Ligation mit Restriktionspuffer L (10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT; pH 7,5), 200 µM dNTP und 1 U Klenow-Enzym für 20 min bei RT inkubiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert (3.3.3.). Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 100 ng/ml BSA und 50 mM Tris-HCl; pH 7,4) mit 1 U T4-DNA Ligase über Nacht bei 15° C bis 16° C.

3.3.4.3. Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Transformation der verschiedenen Vektoren und rekombinanten Plasmide wurden die *E.coli*-Stämme DH5α (Gibco) und HB101 (Invitrogen) verwendet.

Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 50 ml frisches LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton (Difco, Detroit, MI, USA), 5 g/l Bacto-Hefeextrakt (Difco), 8 g/l NaCl; pH 7,6) mit 100 µl einer frischen Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden auf einem Rundschüttler (Certomat HK Inkubator und Certomat U Rundschüttler; Braun Melsungen) bei 37° C und 250 upm bis zur logarithmischen Wachstumsphase vermehrt. Dies wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm festgestellt. Bei einer erreichten optischen Dichte von 0,3–0,4 wurden die Bakterien sofort auf Eis abgekühlt und in der Varifuge RT und dem 5315-Rotor (Heraeus) bei 4° C für 10 min bei 5000 upm sedimentiert. Nach dem Waschen mit 25 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung erfolgte eine 30minütige Inkubation der sedimentierten Zellen mit 30 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung auf Eis. Nach erneuter Sedimentation wurden die Bakterien in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und mindestens 3h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden direkt zur Transformation verwendet oder in Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70° C gelagert.

3.3.4.4. Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen

Für die Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen wurde ein 200 µl Aliquot langsam auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA oder 10–500 ng eines Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und 40 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42° C für 3 min und sofortiger Abkühlung auf Eis für 1 min wurden die Zellen mit 800 µl LB-Medium 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf LB-Agar-Platten (LB-Medium mit 15 g/l Agar) mit Ampicillinzusatz (50 mg/l) ausplattiert und über Nacht bei 37° C kultiviert. Für die Farbselektion von Plasmiden, die das lacZ-Gen besaßen, wurden die Transformationsansätze auf LB-Selektionsplatten kultiviert, die zusätzlich jeweils 100 µl 0,1 M Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) und 40 µl 2% [w/v] 5-Brom-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal, gelöst in Dimethylformamid) enthielten.

Die Analyse der Transformanten erfolgte durch Mini-Präparationen der Plasmid-DNA (3.3.5.), Hydrolyse der präparierten Plasmid-DNA (3.3.1.) und nachfolgender Gelelektrophorese (3.3.2.).

3.3.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten durch alkalische Lyse der Bakterienzellen, nach der modifizierten Birnboim und Doly-Methode (BIRNBOIM UND DOLY, 1979).

Analytische Isolierung von Plasmid-DNA:

Für die Analyse von den Bakterienkolonien, die nach Transformation über Nacht gewachsen waren, wurden einzelne Bakterienkolonien in jeweils 3 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus je 1,5 ml der gewachsenen Kulturen durch die sogenannte Mini-Präparation. Die Bakterien wurden 1 min bei 9000 upm sedimentiert (54156-Eppendorf-Zentrifuge, F-45-18-11-Rotor) und anschließend mit TENS-Puffer (1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5% [w/v] SDS, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5) lysiert und auf Eis gestellt. Durch Zugabe von je 150 µl 3 M NaOAc, pH 5,2 und 3minütiger Zentrifugation bei 15000 upm bei 4° C konnten die Plasmide aus dem Überstand durch Fällung mit eiskaltem Ethanol p. a. bei -70°C für mindestens 10 min isoliert werden. Nach 10 min Zentrifugation bei 15000 upm bei 4° C wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und das luftgetrocknete Pellet in 49 µl H₂O und 1 µl RNase A (10 mg/ml) aufgenommen. 10 ml davon wurden jeweils restringiert (3.3.1.) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.3.2.).

Präparative Plasmidisolierung:

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte über Anionen-Austauscher-Säulen (Qiagen-Kit, Diagen, Düsseldorf) nach den Angaben des Herstellers.

Für die Langzeitlagerung von plasmidtragenden *E.coli*-Bakterien wurden die Bakterien im entsprechenden Selektionsmedium mit 20–30 % Glycerin aliquotiert und in 1 ml-Kryogefäßen (Nunc) bei -70°C gelagert.

3.3.6. Verwendete Oligonukleotide

Die im Elektrophoretic Mobility Shift-Assay verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Promega (Madison, WI, USA) oder MWG Biotech (Ebersberg/München) synthetisiert. Für die Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide wurden die homologen einzelsträngigen Nukleinsäuren 5 min bei 95° C erhitzt und über einen Zeitraum von mindestens 1,5 h langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Eingesetzte Oligonukleotide: Die fettgedruckten Nukleotide markieren die Konsensussequenz, die kleingedruckten Nukleotide markieren Abweichungen von der HGF-Promotor-Sequenz, die aufgrund von Überlappungen mit weiteren Konsensussequenzen bewußt synthetisiert wurden.

- TIE-1:** HGF Promotor (Nukleotide -374 bis -357):
5' - agC tta GtG **AAT TGG TGT** - 3'
- TIE-1a:** HGF-Promotor (Nukleotide -373 bis -350):
5' - ACG GGG **CGA ATT GGT GTT** CAG CCT - 3'
- TIE-2:** HGF-Promotor (Nukleotide -1066 bis -1043):
5' - CAA TGA TCT **CAC CAA AAC** GTG ATA - 3'
- TRE:** HGF-Promotor (Nukleotide -333 bis -312):
5' - ATT GGG **CTG AGT CTT** GCT CCT - 3'
- HLH I:** HGF-Promotor (Nukleotide -256 bis -227):
5' - gat ccG CCT CGG **GCC AGG TGA** CCT TTG C - 3'

HLH II: HGF-Promotor (Nukleotide -263 bis -243):
5' - AAA TTG **CAG CTG** GCC TCG GGC - 3'

HLH I/II: HGF-Promotor (Nukleotide -263 bis -229):
5' - AAA TTG **CAG CTG** GCC TCG GGC **CAG GTG** ACC TTT - 3'

E₂SM: E-Box des Glattmuskel-Aktin-Promotors (BLANK ET AL., 1992):
5' - GAG AAC **AAC TGC** TCT - 3'

AP-1: AP-1 'Responsives Element' (Promega):
5' - CGC TTG **ATG AGT CAG** CCG GAA - 3'

3.3.7. Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellen und Gewebe

3.3.7.1. Extraktion von genomischer DNA aus Zellen und Gewebe

Nach kurzem Auftauen des gefrorenen Frischgewebes (ca. 0,6–1 g) auf Eis erfolgte die Zerkleinerung der Gewebstücke mit einem RZR-2000 Homogenisator (Heidolph, Kehlheim) in 10 ml TES-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5). Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen sterile Mullkompressen (Rauscher, Pattensen) filtriert und die Zellen in sterilen 30 ml Corex-Röhrchen in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge (Du Pont, Boston, USA) mit dem HB-4-Rotor für 5 min bei 2000 upm und 4° C zentrifugiert. Bei der Extraktion von genomischer DNA aus Zellen wurden diese nach dem Abzentrifugieren und Waschen in 10 ml TES-Puffer aufgenommen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Sediment aus extrahierten Zellkernen wurde mehrmals in 10 ml TES-Puffer gewaschen, in 10 ml TES-Puffer mit 0,2% [w/v] SDS aufgenommen und mit 750 µg/ml Pronase bei 37° C für 90 min inkubiert. Nach dreimaliger Phenolextraktion und nachfolgender Ethanol-fällung (3.3.3.) wurde die DNA mit einer sterilen, gebogenen Pasteurpipette aufgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit eiskaltem Ethanol p. a. gewaschen. Die weitere Aufreinigung der luftgetrockneten DNA erfolgte in 200 µl RNase-Puffer (10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5) mit 40 µl/ml RNase A bei 37° C innerhalb 30 min. Anschließend wurde die DNA nochmals mit 0,1% [w/v] SDS, 100 mM NaCl und 0,25 mg/ml Pronase bei 37° C für 30 min inkubiert. Nach zwei Phenolextraktionen und nachfolgender Ethanolpräzipitation wurde die isolierte, genomische DNA in 200 µl +H₂O resuspendiert, quantifiziert (3.3.2.3.) und bei -20° C gelagert.

3.3.7.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von zellulärer RNA erfolgte über einen Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten (CHIRGWIN ET AL., 1979). Hierzu wurden 3 ml CsCl-Lösung (5,7 M CsCl, 25 mM Natriumcitrat, 0,1 M EDTA; pH 7,0) in 5 ml Polyallomer-Röhrchen (BECKMANN, CA, USA) gegeben und vorsichtig mit dem aufgetauten GITC-Zellysat überschichtet. Nach Austarieren der einzelnen Röhrchen mit GITC auf 10 mg erfolgte die Zentrifugation für 18 h in einem Sorvall AH 650-Rotor (Du Pont, Boston, USA) bei 20° C und 35000 Upm mit Sedimentation der RNA am Gefäßboden. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 70%igem Ethanol wurde das RNA-haltige Pellet anschließend in 200 µl H₂O resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat und 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol erfolgte eine Präzipitation der RNA für mindestens 2 h bei -70° C. Nach Zentrifugation (15 min, 4° C, 15000 Upm, SK 15-Zentrifuge, 12145-Rotor, Sigma)

wurde das Pellet vakuumgetrocknet und in 50-200 μl H_2O aufgenommen. Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA wurde eine spektrophotometrische Messung durchgeführt (3.3.2.3.). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C .

3.3.8. Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzanalyse wurde mit dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger (1981) entsprechend dem Protokoll des 'PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits' im 373 A-'Sequencer' von Applied Biosystems (Foster-City, CA, USA) am Institut für Genetik (Universität Mainz) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme 'Data Collection' und 'Data Analysis' am Macintosh IICI-Computer (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA).

3.3.9. Radioaktive Markierung von DNA

3.3.9.1. Markierung von Doppelstrang-DNA durch 'Random-Priming'

Die radioaktive Markierung erfolgte nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) mit dem 'Random Priming DNA Labeling Kit' (Boehringer Mannheim). Als DNA-Matrizen dienten linearisierte DNA-Fragmente, die bei 95°C 10 min inkubiert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt wurden. Zur radioaktiven Markierung von den DNA-Sonden wurde $\alpha[^{32}\text{P}]$ -Desoxycytidin-5'-Triphosphat (Du Pont) mit einer spezifischen Aktivität von 370 MBq/ml verwendet. Die Reaktion erfolgte für 30 min im Heizblock bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit folgenden Lösungen:

100 ng linearisierte, denaturierte DNA
2 μl 10x Hexanukleotid-Gemisch (0,5 M Tris-HCl, 0,1 mM MgCl_2 , 1 mM 1,4-Dithiothreitol, 2 mg/ml BSA; 62,5 A_{260} -Einheiten/ml Hexanukleotide; pH 7,2)
1 μl 0,5 mM dATP
1 μl 0,5 mM dGTP
1 μl 0,5 mM dTTP
5 μl $\alpha[^{32}\text{P}]$ -dCTP
1 μl 2 U/ μl Klenow-Fragment (Boehringer Mannheim)

Nach Zugabe von 80 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5) wurde der Reaktionsansatz über eine Sephadex G-50 'Nick'-Säule (Pharmacia-LKB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt, die Aktivität der $\alpha[^{32}\text{P}]$ -markierten DNA-Sonde bestimmt und die Sonde bei -20°C gelagert.

3.3.9.2. Radioaktive Markierung von Doppelstrang-DNA durch $\gamma[^{32}\text{P}]$ -ATP

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden erfolgte in einem Reaktionsgemisch aus 1 μl (5 pmol) Oligonukleotid, 3,4 μl H_2O , 0,8 μl 10x T4 Polynukleotid Kinase Puffer, 2 μl 3000 Ci/mmol $\gamma[^{32}\text{P}]$ -ATP und 0,8 μl T4 Polynukleotid Kinase (Boehringer Mannheim) für 30 Minuten bis 1 h im Heizblock bei 37°C . Nach Zugabe von 92 μl TE-Puffer wurde der Reaktionsansatz über eine Nap-Säule (Pharmacia-LKB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt, die Aktivität der $\gamma[^{32}\text{P}]$ -markierten Oligonukleotide bestimmt und die Oligonukleotide bei -20°C gelagert.

3.3.10. Aktivitätsbestimmung von [³²P]-markierten Sonden

Die Aktivität der radioaktiv-markierten Sonden wurde in einem 'Liquid Scintillation Analyzer' von 'Packard Instruments' (Meriden, CT, USA) durch die Messung der Zerfallsimpulse pro Minute (cpm = 'counts per minute') bestimmt. Dabei erfolgte die Messung von 1 µl zu analysierender Lösung in 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint 2211, Roth, Karlsruhe).

3.3.11. 'Northern Blot'-Hybridisierung

Die HGF- bzw. *c-fos*-Transkripte in der zellulären RNA wurden durch 'Northern Blot'-Hybridisierungen identifiziert (ALWINE ET AL, 1977).

3.3.11.1. Auftrennung von RNA in Formaldehydgelen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Molekülen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in formaldehydhaltigen Agarosegelen. Für die Herstellung eines 1%igen Formaldehydgels wurde 1 g SeaKem ME-Agarose in 74 ml DEPC-H₂O aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 60° C wurden 10 ml 10x Laufpuffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH 7,0), 16,2 ml 37%iges Formaldehyd und 6 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml] zugegeben, und das Gemisch direkt in den DEPC-behandelten Gelträger gegossen. 20 µg Gesamt-RNA wurden jeweils in 2,3 µl DEPC-H₂O gelöst, 7,7 µl Probenpuffer (1x Laufpuffer, 17,5% [v/v] deionisiertes Formamid, 6,5% [v/v] Formaldehyd) zugegeben, bei 65° C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 3 µl 5x Ladepuffer (5x Laufpuffer, 0,25% [w/v] Bromphenolblau, 15% [w/v] Ficoll Type 400) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 70 Volt gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde im langwelligen UV-Licht analysiert und photographiert.

3.3.11.2. Transfer von RNA auf Nylonmembranen

Die RNA wurde mittels kapillaren Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N-Membran, Amersham-Buchler) übertragen. Dazu wurde das Agarosegel auf ein 3 MM Whatman Filterpapier (Amersham, Buckinghamshire, England) gelegt, das in 20x SSC (3 M NaCl, 3 M Natriumcitrat) getränkt war und dessen Enden sich in einer Schale mit 20x SSC-Lösung befanden. Nach dem Transfer auf die Membran über Nacht wurde die RNA durch 5minütige UV-Bestrahlung oder 2stündiges Backen bei 80° C auf der Membran fixiert.

3.3.11.3. Nachweis von RNA durch Hybridisierung mit [³²P]-markierten DNA-Sonden

Nach Immobilisierung der im Agarosegel aufgetrennten RNA auf einer Nylonmembran (3.3.11.2.) erfolgte der Nachweis der spezifischen Transkripte durch Hybridisierung mit entsprechenden [³²P]-markierten DNA-Sonden. Dazu wurde die Nylonmembran in einem Hybridisierungsröhrchen (Schott, Mainz) mit 10 ml Hybridisierungspuffer (50% [v/v] deionisiertes Formamid, 5x SSC, 0,2% [w/v] Ficoll Type 400, 0,2% [w/v] Polyvinylpyrrolidon, 0,2% [w/v] BSA, 25 mM NaHPO₄, 0,1% [w/v] SDS, 5% [w/v] Dextransulfat, 250 µl/ml denaturierte Heringsspermien-DNA) für mindestens 4 h bei 42° C im Hybridisierungsschrank (Bachhofer, Reutlingen) inkubiert. Für die Hybridisierung wurde die [³²P]-markierte DNA-Sonde 5 min bei 95° C denaturiert, auf Eis abgekühlt, in einer Konzentration von 1 x 10⁶ cpm/ml zur Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 42° C inkubiert. Nach

der Hybridisierung wurde die Membran mehrfach mit einer Lösung aus 2 x SSC und 0,1% [w/v] SDS zuerst bei 42° C und schließlich unter stringenteren Bedingungen (steigende Temperaturen und/oder sinkende Salzkonzentrationen) gewaschen. Nach Einschlagen in eine Klarsichtfolie erfolgte die Exposition der Membran auf einem Kodak X-OMAT AR-Film (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) in einer Autoradiographiekassette (Sigma) mit zwei Verstärkerfolien (Sigma) bei -70° C.

3.3.12. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Technik erfolgte die Vervielfältigung einzelner DNA-Moleküle (SAIKI ET AL., 1985; SAIKI ET AL., 1988).

3.3.12.1. Verwendete Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Ausgehend von der Ratten-HGF-Promotor-Sequenz (ARAVAMUDAN ET AL., 1993) wurden folgende Oligonukleotide synthetisiert:

Primer P 18: 5' – ACA CCC TTT TCT TAC CTG CCC TCT – 3'
sense Primer (Nukleotide -621 bis -598)

Primer P 19: 5' – AGG AGA TGC CGG GCT GAA AGA ATC – 3'
antisense Primer (Nukleotide +7 bis +30)

Primer P 24: 5' – CTG CAG GTA GCT GTA GTT ATG CTG AG – 3'
sense Primer (Nukleotide -1340 bis -1315)

3.3.12.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR

Die PCR wurde in einem 'Thermal-Cycler' (Perkin-Elmer, Überlingen) in einem Endvolumen von 50 µl unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

10 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µg genomische DNA
5 ml 10 mM sense Primer
5 ml 10 mM antisense Primer
5 ml 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% [w/v] Gelatine, 100 mM Tris-HCl; pH 8,3)
8 ml 1,25 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5 ml 5 U/ml Taq-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim)

Die PCR-Ansätze wurden jeweils mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und die Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenz erfolgte in 30 Zyklen unter folgenden Reaktionsbedingungen:

– Denaturierung: 93° C, 1 min
– 'Hybridisierung': 50 – 55° C, 1,5 min
– 'Extension': 72° C, 2 min

Die Temperatur für das Anlagern der Primer wurde aus der Berechnung der Schmelztemperatur beider Primer ermittelt. Die 'Primer-Hybridisierungs'-Temperatur lag dabei 5° C unter der niedrigsten

Schmelztemperatur. Die Analyse des Amplifikationsergebnisses erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung mit 1/10 des PCR-Ansatzes.

3.3.13. 'Southern Blot'-Hybridisierung

Zunächst erfolgte die Isolierung der DNA aus den Zellklonen (3.3.7.1.) mit nachfolgender gelelektrophoretischer Auftrennung (3.3.2.). Anschließend wurde das Gel 30–45 min im Depurinierungspuffer (0,05 M NaOAc; pH 4,2) einmal bei RT und einmal bei 50° C inkubiert. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei RT für 30 min mit Denaturierungspuffer (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl). Danach wurde das Gel für 30–45 min in Neutralisationspuffer (3 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl; pH 7,5) inkubiert. Der Transfer und die Immobilisierung der DNA erfolgte analog dem Transfer von RNA (3.3.11.2.). Die Detektion der integrierten CAT-Plasmide erfolgte durch Hybridisierung mit einer [³²P]-markierten DNA-Sonde analog der 'Northern Blot'-Hybridisierung (3.3.11.3.).

3.3.14. Herstellung von Kernextrakten aus Zellen

Die Kernextraktisolierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von DIGNAM ET AL. (1983). Pro Ansatz wurden ca. 10 Millionen Zellen eingesetzt. Nach Trypsinierung und Waschen in PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 2 min Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge) bei 5000 Upm wurde das Pellet in 400 µl Puffer A aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach weiteren 2 min Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge) bei 5000 Upm wurde das Pellet in 400 µl Puffer A mit 0,05 % NP-40 (Nonidet P40) aufgenommen und 10x durch eine 26G-Kanüle passiert. Nach Abzentrifugation (2 min 6000 Upm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde das Pellet in 250 µl Puffer B aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis bei schwenkender Bewegung inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 30 min bei 14 000 Upm und 4° C zentrifugiert und der Überstand im tausendfachen Volumen Puffer D bei 4° C dialysiert.

Verwendete Puffer:

Puffer A: 10 mM Hepes-KOH pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂
0,5 mM DTT (frisch!); 0,5 mM PMSF (frisch!)
10 µg/ml Pepstatin (frisch!); 10 µg/ml Leupeptin (frisch!)

Puffer B: 20 mM Hepes-KOH pH 7,9; 25 % Glycerin (Serva); 420 mM NaCl;
1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA
frisch zusetzen: siehe Puffer A

Puffer D: 20 mM Hepes pH 7,9; 20 % Glycerin (Serva); 100 mM KCl; 2 mM MgCl₂
0,5 mM DTT (frisch!)
0,5 mM PMSF (frisch!)

3.3.15. Elektrophoretic Mobility Shift-Assay (EMSA)

3.3.15.1. Polyacrylamid-Gel Herstellung

Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte im 5 %igen Polyacrylamid-Gel. 8 ml 30 % Acrylamid (29 g Acrylamid; 1 g N,N-Methylenbisacrylamid; auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt und zum Lösen auf 37° C erwärmt), 2,5 ml 5 x TBE und 25 µl TEMED wurden in 50 ml H₂O aufgenommen und nach Zugabe von 300 µl 10 % Ammoniumpersulfat in die Gießkammer übertragen. Nach ca. 30 min waren die Gele auspolymerisiert und konnten genutzt, bzw. in Folie verpackt bei 4° C gelagert werden.

3.3.15.2. Mobility Shift-Assay

Pro Ansatz wurden 2 bis 5 fmol γ [³²P]-ATP markierte Oligonukleotide mit 5 µg Zellkernextrakt 20 min auf Eis in Puffer D (3.3.14.) inkubiert. Um unspezifische Bindungen abzufangen, diente 1 µg I/C (Sigma) das 30 min bei 42° C inkubiert und in 20 µl aliquotiert wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA/Protein-Komplexe über ein Polyacrylamid-Gel wurde das Gel getrocknet (Unigeldryer 3040 und Unijet Refrigerated Aspirator II; UniEquip, Martinsried) und für mindestens 10 h mit dem KODAK Safety Film ARO (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) autoradiographiert. Um die Spezifität der DNA-Protein-Interaktion zu überprüfen, wurden unmarkierte Oligonukleotide in 25- bis 500facher Konzentration zugegeben.

3.3.16. DNase I Footprinting

Zur DNA-Fragment-Gewinnung wurden 5 µg Plasmid mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde gelelektrophoretisch getestet. Das Fragment wurde in 10 mM Tris/HCl [0,5 µg/µl, pH8] aufgenommen.

Lösungen:

Elutionspuffer: Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei 4° C gelagert.
0,5 M Ammoniumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,1 % SDS

Maxam und Gilbert

Stop-Lösung: 0,3 M Natriumacetat pH 5,5; 100µg/ml tRNA

I/C: Die doppelsträngigen poly-I/C's (Pharmacia) wurden in 1 mg/ml TE-Puffer aufgenommen, für 5 min auf 45° C erhitzt und zum dimerisieren abgekühlt. Aliquots zu 20µl wurden bei -20° C gelagert.

HNB-Puffer: Der Puffer wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20° C gelagert.
0,5 M Sucrose; 15 mM Tris/HCl pH 7,5; 60 mM KCl; 0,25 mM EDTA pH 8;
0,125 mM EGTA pH 8

DNase I-Mix: Die DNase I, Grad I, (Boehringer Mannheim), wurde mit TMK Puffer auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml verdünnt und bei -20° C gelagert.

TMK-Puffer: 50 % Glycerin; 50 mM Tris/HCl pH 8; 50 mM KCl pH 8; 10 mM MgCl₂

DNase I Stop-Lösung: 50 mM EDTA; 0,1 % SDS; 150 µg/ml tRNA (phenolextrahiert); 200µg/ml Proteinase K

20 mM MgCl₂ und 20 mM Spermidin wurden aliquotiert und bei -20° C gelagert.

3.3.16.1. CIP Behandlung

Zur CIP Behandlung wurden 5 µg DNA, 1 U CIP (Boehringer Mannheim) und 1x CIP-Puffer in 50 µl Gesamtvolumen aufgenommen und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 1 U CIP und erneuter 30 min langer Inkubation bei 37°C wurden 1 µl 0,5 M EDTA und 49 µl TE-Puffer zugegeben und 15 min bei 70°C inkubiert. Nach zweimaliger Phenol-Chloroform (1:1[v/v]) Extraktion (3.3.3.) wurde die nun CIP behandelte DNA in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) aufgenommen.

3.3.16.2. γ [³²P]-ATP Markierung

5 µg DNA wurden mit 50 µCi γ [³²P] ATP (3000 Ci/mmol), 5 U T4 Polynukleotid Kinase, 50 µg/ml BSA und 5 µl 10x T4 Polynukleotid Kinase Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1 µl 0,5 M EDTA, 2 µg I/C und 100 µl TE-Puffer zugegeben. Nach Phenol-Chloroform (1:1[v/v]) Extraktion (3.3.3.) wurde die organische Phase mit einem Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina auf -20°C temperierten Ethanol 15 min bei -70°C gefällt. Die DNA wurde 15 min bei 15000 Upm zentrifugiert und anschließend zweimal in 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen.

3.3.16.3. Fragmentisolierung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Extraktion

30 µl des DNA-Fragments und Puffer (Bromphenolblau, Xylencyanol, Glycerin) wurden auf ein 5% Polyacrylamid-Gel aufgetragen und für 1 bis 2 h bei 20 mA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 3 bis 5 min bei Raumtemperatur mit einem Röntgenfilm exponiert. Nach Entwicklung konnte die entsprechende Bande identifiziert, aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden.

3.3.16.4. Gelelution

Das isolierte Gelpartikel wurde zerkleinert in 400 µl Elutionspuffer aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Gel-DNA-Gemisch wurde dann für 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand in 2,5 Volumina Ethanol (-20°C) gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Die markierte DNA wurde in einer Aktivität von 50000 cpm/µl (ca. 1 ng) in TE-Puffer aufgenommen.

3.3.16.5. Maxam & Gilbert Reaktion

Um die späteren DNA-Protein-Interaktionen genau lokalisieren zu können, wurde von dem einseitig markierten DNA-Fragment eine Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt.

20 µl (10⁶ cpm) der markierten Probe wurden mit 1 µg I/C und 25 µl 88% HCOOH versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 7 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl auf 4°C temperierter Stop-Lösung terminiert, die DNA Fragmente mit 500 µl Ethanol (-20°C) bei -70°C gefällt und anschließend 30 min bei 15000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl 0,3 M Natriumacetat aufgenommen und mit 3 Volumina Ethanol versetzt abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde vakuumgetrocknet (Speed Vac Concentrator SVC 100 H, Savant, Farmingdale, NY, USA), in 100 µl 1 M frisch verdünntem Piperidin aufgenommen, 30 min

lang auf 90° C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 2 h vakuumgetrocknet. Nach Resuspension in 100 µl H₂O und erneutem Vakuumtrocknen wurden die DNA-Fragmente in 20 µl Ladepuffer aufgenommen.

3.3.16.6. DNase I Titration

Um das geeignete Verhältnis von DNA zu DNase I zu ermitteln ist eine Titration der DNase I erforderlich. In einer Stammlösung wurden pro Reaktion 1 ng Probe und 2,5 µg I/C in 50 µl HNB mit 5 mM MgCl₂ und 2,5 mM CaCl₂ aufgenommen und im Wasserbad auf 20° C temperiert. Die Stammlösung wurde mit dem DNase I Mix in HNB mit 5 mM MgCl₂ und 2,5 mM CaCl₂ in den Verhältnissen 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1000 in 1 µl Gesamtvolumen angesetzt. Der DNase I-Verdau wurde 60 sec lang bei 20° C durchgeführt und mit 50 µl Stop-Lösung beendet. Die DNA-Fragmente wurden durch Phenol-Chloroform Extraktion (1:1[v/v]) und anschließende Fällung (1 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina Ethanol) für 15 min bei -70° C und 30 min Zentrifugation bei 15000 Upm bei 4° C isoliert und in 3 µl Sequenziergelladepuffer aufgenommen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ausgehend von den entstandenen Fragmentlängen das geeignete DNA-DNase I Verhältnis ausgewählt.

3.3.16.7. DNase I Footprinting

Pro Probe wurden 4 µl 20 mM MgCl₂/20 mM Spermidin, 1 µg I/C, 5 µl Puffer D (3.3.14.) und 10 µg Kernextrakt (3.3.14.) angesetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ng des markierten DNA-Fragments (ca. 5–10 x 10⁴ cpm) wurde das Gemisch erneut 10 min inkubiert. Die Proben wurden dann mit der jeweiligen Menge DNase I (2mg/ml) 60 sec lang bei 20° C inkubiert. Nach den 60 sec wurden 30 µl Stop-Lösung mit 200 µg/ml Proteinase K zugegeben und das Gemisch wurde 30 bis 45 min lang auf 42° C erhitzt. Nach Zugabe von 48 µl TE-Puffer wurden die DNA-Fragmente durch Phenol-Chloroform Extraktion (1:1[v/v]), anschließender Fällung (1 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina Ethanol) für 15 min bei -70° C und 30 min Zentrifugation bei 15000 Upm bei 4° C isoliert und in 3 µl Sequenziergelladepuffer aufgenommen.

Auf das Polyacrylamidgel wurden jeweils 1 µl aufgetragen. Als Kontrollen dienten:

1. Probe – Kernextrakt ± DNase I
2. Probe + Kernextrakt ohne DNase I
3. Probe + BSA ± DNase I

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente im Polyacrylamid-Gel wurde das Gel getrocknet (Unigeldryer 3040 und Unijet Refrigerated Aspirator II) und mit Kodak X-OMAT AR Filmen (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) autoradiographiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Analyse der 5' flankierenden Region des Ratten HGF-Gens

Die 5' flankierende Region des Ratten HGF-Gens wurde aus einer *ScaI*-restringierten, genomischen, adulten Rattenleber-DNA über die Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe der spezifischen HGF-Promotor-DNA-Primer P24 und P19 bzw. P18 und P19 vermehrt. Dabei erfolgte die Amplifikation eines 1370 bp (-1340 bis +30) bzw. eines 651 bp (-621 bis +30) langen DNA-Fragmentes. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in den Vektor pBluescript SK(-) sowie in den pCAT-Basic-Vektor inkloniert. Die entstandenen Plasmide pBrHGF-Promotor und pCATrHGF-Promotor wurden sequenziert.

Es folgte eine computergestützte Analyse der klonierten, 1370 bp langen Sequenz bezüglich potentieller Proteinbindungssequenzen. Die folgenden Bereiche der 5' flankierenden Region des HGF-Gens konnten als homologe Sequenzen zu bereits publizierten Proteinbindestellen, sogenannten Konsensussequenzen (FAISST UND MEYER, 1992), identifiziert werden:

Bei -182, -213 sowie -413 konnten drei IL-6 responsive Elemente vom Typ II (IL-6-RE Typ II), bei -710 und -1092 zwei IL-6 responsive Elemente vom Typ I (IL-6-RE Typ I) identifiziert werden. Verschiedene Transkriptionsfaktoren, aktiviert durch IL-6, IL-1 sowie LPS binden die IL-6-RE's. Potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor PEA 3, der u. a. durch Mitogene induziert wird, wurden ebenfalls zahlreich, d. h. an den Positionen -385, -553, -708, -976 in der 5' terminalen Region gefunden. An der Position -371 fand sich eine mögliche Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor SP-1. Ein TPA responsives Element (TRE), eine Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor AP-1, wurde an der Position -326 gefunden. Bei -366 sowie -1058 konnten TGF β inhibitorische Elemente (TIE) gefunden werden. Ein Interferon stimulierendes responsives Element (ISRE) fand sich bei -1186. Der typischerweise daran bindende Transkriptionsfaktor ist der Interferon stimulierte Wachstumsfaktor 2 (ISGF2), der durch IFN α sowie IFN γ aktiviert wird.

4.2. Zelltypspezifische Suppression der HGF-Genexpression

Für eine detaillierte Untersuchung der Promotoraktivität wurde das in den Vektor pCATbasic klonierte, 1370 bp lange DNA-Fragment zunächst mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *BglII* bzw. *SacI* verkürzt. Die nun vorliegenden 4 Plasmide wurden als pCATr70, pCATr270, pCATr620 bzw. pCATr1340 bezeichnet (Abb. 4 A). KNRK Zellen wurden mit diesen Plasmiden sowie einem Neomycin-Resistenzplasmid stabil kotransfiziert und die gewachsenen Zellklone wurden im CAT-ELISA auf ihre CAT-Enzym Produktion getestet.

Eine Überprüfung der Integration der pCATrHGF-Plasmide in das Genom der KNRK Zellklone erfolgte mittels 'Southern Blot'-Analyse (Abb. 5). Dafür wurde die DNA aus KNRK Zellen sowie aus den 4 Zellklonen isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* bzw. *HindIII* und *BamHI* restringiert. Die DNA aus den normalen KNRK Zellen diente dabei als Negativkontrolle. Als Sonde wurde [³²P] markierter CATbasic Vektor eingesetzt. Abb. 5 A zeigt den Southern Blot mit *EcoRI* hydrolysiertes genomischer DNA. Im CATbasic Vektor befinden sich zwei Schnittstellen für *EcoRI*, so daß bei Integration des CAT Plasmids 2 Banden auf der Autoradiographie zu erwarten sind. Ein 1392 bp langes Fragment ist beim Verdau jedes Plasmids zu erwarten, die zweite Bande ist je nach Plasmidgröße

ein 3072 bp, 3272 bp, 3618 bp bzw. 4337 bp langes Fragment. Für alle 4 untersuchten Zellklone ist die 1392 bp Bande deutlich nachweisbar, die obere Bande ist nur bei den beiden kürzeren CAT Plasmiden, pCATr70 sowie pCATr270 deutlich nachweisbar. Vermutlich sind die längeren Fragmente der größeren zwei Plasmide bei der Restriktion nicht exakt geschnitten worden. Abb. 5 B zeigt den Southern Blot mit *HindIII/BamHI* hydrolysiertes genomischer DNA. Im CATbasic Vektor sind zwei Schnittstellen für *BamHI* sowie eine Schnittstelle für *HindIII*, im längsten Promotorfragment ist ebenfalls eine *BamHI* Schnittstelle. Die zwei Banden der 1654 bp und 2576 bp langen Fragmente sind deutlich nachweisbar. Die kleineren Fragmente, zwischen 100 bp und 600 bp lang, sind aufgrund ihrer geringen Größe in der Autoradiographie nicht zu detektieren. Der Southern Blot liefert somit den Nachweis, daß alle 4 Zellklone CAT Plasmide in ihr Genom integriert haben.

Abb. 4 B zeigt die relative CAT-Enzym Produktion der 4 Zellklone, die nach der Länge der transkribierten Promotorfragmente mit KNRK70, KNRK270, KNRK620 bzw. KNRK1340 bezeichnet wurden. Dabei wurde die geringste, im CAT ELISA ermittelte Enzymmenge im Zellysat des KNRK620 Zellklons detektiert. Diese Menge wurde gleich 1 gesetzt und die ermittelten Enzymmengen der anderen Zellklone im Verhältnis dazu mit den entsprechenden Zahlen belegt. Für den Zellklon KNRK70 wurde eine 20fache, für den Klon KNRK270 eine 7fache und für den Klon KNRK 1340 eine 2fache Enzymmenge in Bezug auf den KNRK620 Klon nachgewiesen.

Für eine weitergehende Charakterisierung der 5' flankierenden Region des HGF-Gens erfolgten im Verlauf der vorliegenden Arbeit Stimulierungsversuche mit den 4 stabilen Zellklonen. Verwendet wurden mögliche stimulierende bzw. supprimierende Zytokine und anderen Substanzen, die nach der computergestützten Sequenzanalyse der 5' flankierenden Region des HGF-Gens ausgewählt wurden. Folgende Stimulanzen wurden eingesetzt: $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, Dexamethason, IL-1 β , IL-6, LPS, TPA, TGF β 1, TNF α , EGF und PDGF. Eine Inkubation der 4 KNRK Zellklone mit den genannten Substanzen zeigte unter den gewählten Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf deren CAT-Expression (ohne Abb.).

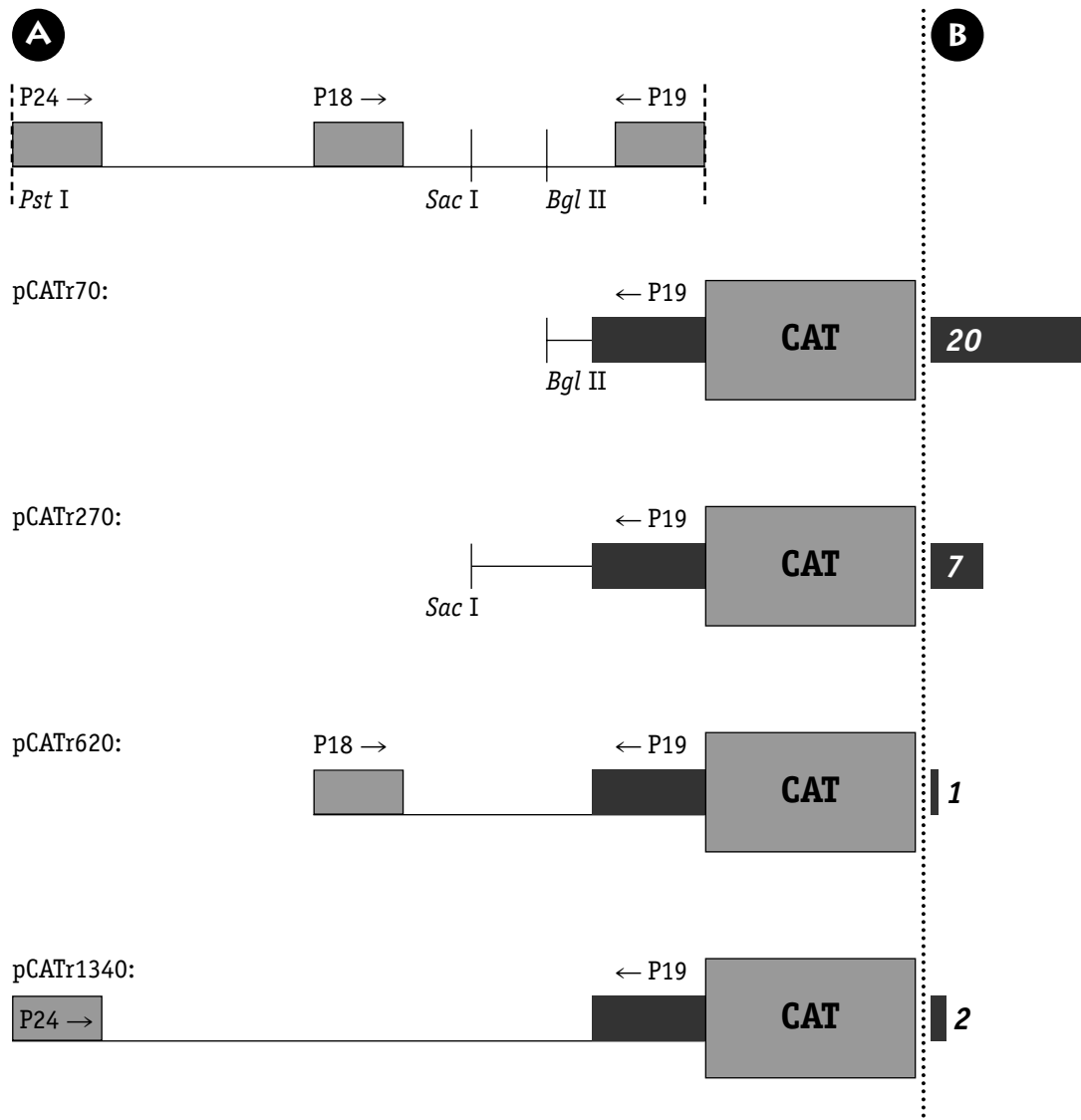


Abb. 4: CAT-Produktion der verschiedenen Zellklone

A. Darstellung der 4 pCATrHGF Plasmide. pCATr70 bzw. pCATr270 wurden mittels Restriktion aus dem pCATr1340 hergestellt.

B. Darstellung der relativen CAT-Enzym Produktion. Die geringste, im CAT-ELISA ermittelte Enzymmenge wurde mit 1 bezeichnet.

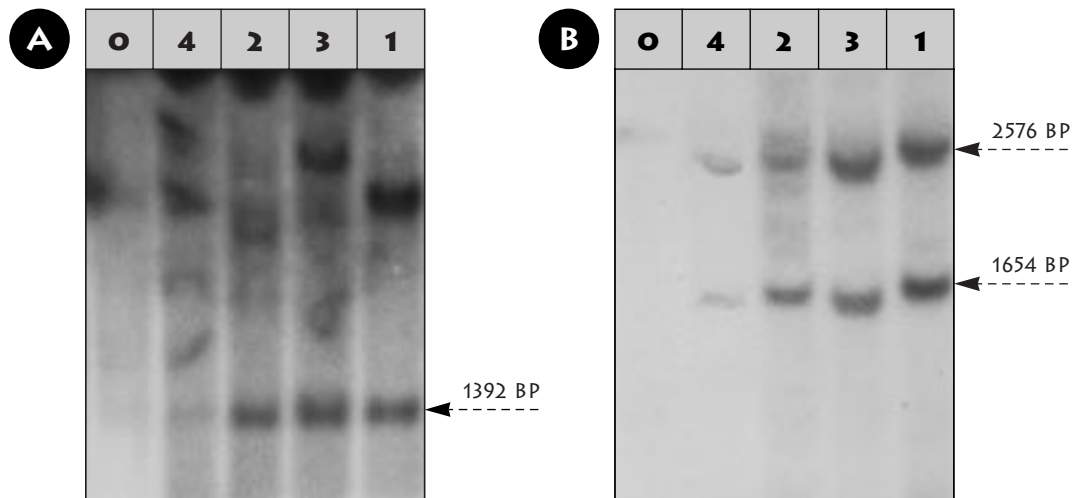


Abb. 5: Nachweis der Integration der CAT-Plasmide in das Genom der transfizierten Zellen

Southern-Blot-Analyse von jeweils 20µg EcoRI (A) bzw. HindIII und BamHI (B) hydrolysiertes DNA von KNRK Zellen (0, Negativkontrolle) sowie von den stabil transfizierten KNRK Zellklonen KNRK70 (1), KNRK270 (2), KNRK620 (3) und KNRK1340 (4) mit einer [³²P]-markierten pCATbasic-Sonde.

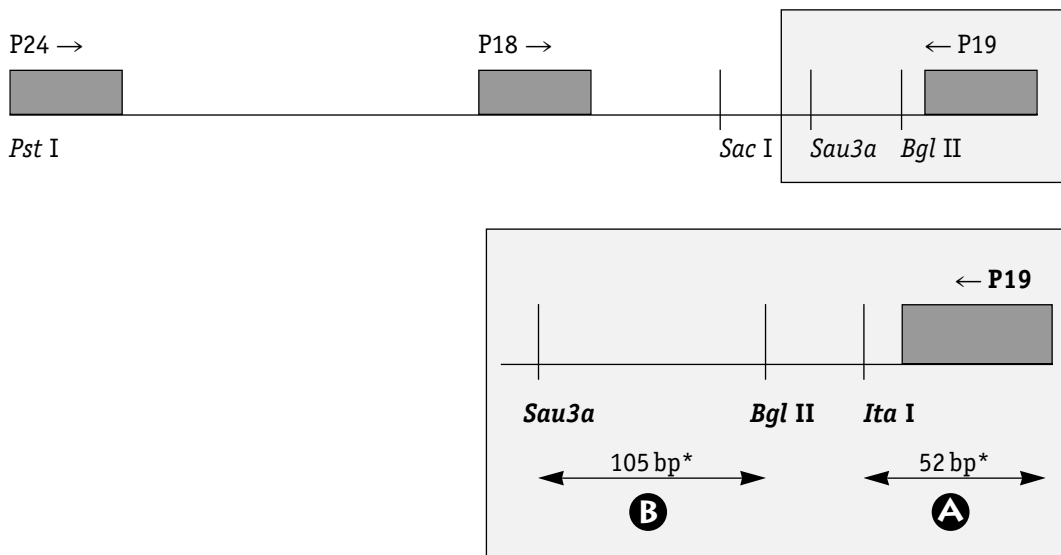


Abb. 6: Schematische Darstellung der Fragmente, die in den 'Mobility Shift'-Analysen eingesetzt wurden

[³²P]-endmarkierte Fragmente A., 52 bp lang und B., 105 bp lang.

4.3. Nachweis von Protein-DNA-Komplexen in der 'basalen Promotorregion' des HGF-Gens

Für die Charakterisierung der Proteinbindung an die unter 4.2. ermittelte 'basale Promotorregion' des HGF-Gens erfolgten 'Elektrophoretic Mobility Shift'-Analysen. Eingesetzt wurden zwei [³²P]-endmarkierte Fragmente aus der 5' flankierenden Region des HGF-Gens, 52 bzw. 105 bp lang, die mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *ItaI* bzw. *Sau3a* und *BglII* hergestellt wurden (Abb. 6). Das 52 bp lange Fragment beinhaltet die Sequenz von -22 bis +30, d. h. es enthielt keine TATA-Box-ähnliche Region sowie keine homologen Bereiche zu bekannten Proteinbindesequenzen. Das 105 bp lange Fragment beinhaltet die Sequenz von -72 bis -176. Für diese Region konnte mit Hilfe der computergestützten Sequenzanalyse ebenfalls kein homologer Bereich zu bereits publizierten Bindesequenzen ermittelt werden.

Für die Inkubation mit der markierten DNA wurden je 5 µg Kernextrakt aus KNRK Zellen bzw. aus KG-1 Zellen verwendet. Die KNRK Zellen exprimieren kein HGF, wohingegen die KG-1 Zellen stark HGF produzieren. Die Inkubation mit dem 52 bp bzw. 105 bp langen Fragment führte sowohl mit den KNRK- als auch mit den KG-1-Kernextrakten zur Bildung von Protein-DNA-Komplexen (Abb. 7). Für das 52 bp lange DNA-Fragment konnten sehr schwache DNA-Protein-Interaktionen mit den Kernextrakten der beiden Zelllinien detektiert werden. Das Bandenmuster deutet auf einen niedermolekularen DNA-Protein-Komplex mit den KNRK-Kernproteinen hin, wohingegen der Komplex mit den KG-1-Kernproteinen ein im Vergleich höheres Molekulargewicht aufweist (Abb. 7A). Für das 105 bp lange DNA-Fragment konnten intensivere DNA-Protein-Wechselwirkungen in der Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Die KNRK-Kernproteine sowie die KG-1-Kernproteine bilden einen DNA-Proteinkomplex. Die Autoradiographie zeigt eine zusätzliche, niedermolekulare Bande mit KG-1-Kernprotein, die jedoch mit steigender Menge Kernprotein schwächer wird (Abb. 7B). Vermutlich ist das Laufverhalten dieser Komplexe durch die Anzahl der höhermolekularen DNA-Protein-Verbindungen im Gel behindert worden, d. h. für eine exaktere Analyse müßte das 105 bp lange DNA-Fragment in kürzere Abschnitte zerlegt werden.

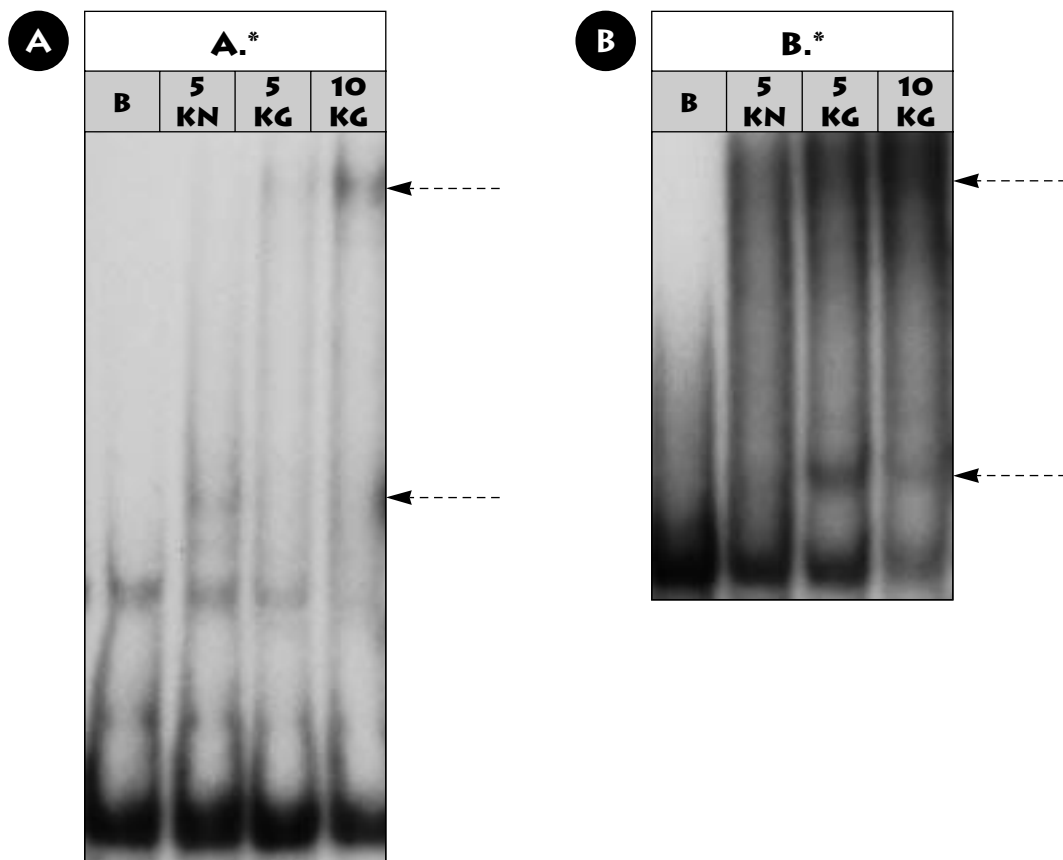


Abb. 7: Proteinbindung an die basale Promotorregion des HGF-Gens

Electrophoretic Mobility Shift-Analyse mit den DNA-Fragmenten A. und B. (Abb. 6), sowie KNRK (KN) bzw. KG-1 (KG) Kernextrakt, 5 bzw. 10 µg (5;10) bzw. BSA (B). Die Autoradiographie wurde über einen Zeitraum von 72 h (A) und 24 h (B) durchgeführt.

4.4. Analyse des TRE-ähnlichen Elements aus der 5' flankierenden Region des HGF-Gens

Zunächst erfolgte die Inkubation der NIH3T3 Kernextrakte mit einem markierten AP-1-Element. Verwendet wurden Extrakte aus Zellen, die mit bzw. ohne Serum kultiviert wurden, letztere zusätzlich stimuliert mit Serum, TPA bzw. TGF β . Die Autoradiographie zeigt Proteinbindungen in allen Ansätzen, die jedoch quantitativ variieren. So induzierte die Inkubation mit TPA bzw. TGF β eine verstärkte Proteinbindung; die Inkubation in serumfreiem Medium bewirkte eine Abnahme der Protein-DNA-Wechselwirkungen. Serumzusatz, unabhängig von der Kultivierungsdauer, zeigte eine positive Wirkung auf die Bildung von Proteinkomplexen. Eine langfristige Kultivierung in normalem serumhaltigem Medium, die, wie unter 4.6. gezeigt, eine vollständige Suppression der HGF-Expression bewirkte, führte zu einer quantitativ gleich starken Bindung an das AP-1-Element wie ein kurzer, einstündiger Serumstimulus nach serumfreier Kultivierung, der eine starke HGF-Expression auslöst (Abb. 8).

Im Anschluß an dieses Experiment erfolgte nun die Inkubation der verschiedenen NIH3T3 Kernextrakte mit [32 P]-endmarkiertem TRE bzw. AP-1 (Abb. 9). Die Proteinbindung an das AP-1-Element erfolgte spezifisch, wie die Verdrängung durch die nicht markierte AP-1-Sequenz zeigt. Dagegen verdrängte das E $_2$ SM-Oligonukleotid, eine nicht homologe Sequenz, die Bindung nicht. Das nicht markierte TRE-ähnliche Element bewirkte eine schwache Verdrängung des markierten AP-1-Elementes, obwohl die Inkubation der Kernextrakte mit der markierten TRE-Sequenz in der rechten Spalte der Abb. 9 keine spezifische Bindung hervorbrachte.

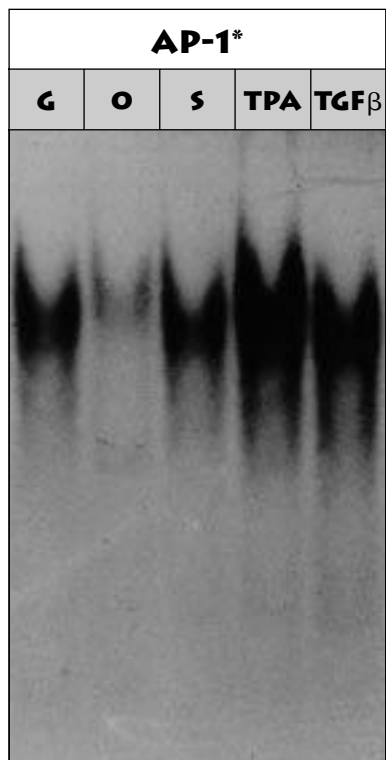


Abb. 8: Proteinbindung an ein AP-1-Element nach Stimulierung mit Serum, TPA und TGF β

Elektrophoretic Mobility Shift-Assay mit je 5 μ g Kernextrakt aus NIH3T3 Zellen. Die Zellen wurden 36 h in 10 % Serum (G) bzw. serumfrei kultiviert (O). Die serumfrei kultivierten Zellen wurden anschließend 1 h mit 10 % Serum (S) bzw. 12 h mit 10 ng TPA/ml (TPA) bzw. 5 ng TGF β 1/ml (TGF β) Kulturmedium inkubiert. 5 fmol an [32 P]-endmarkierten AP-1-Oligonukleotiden (AP-1*) wurden pro Ansatz verwendet.

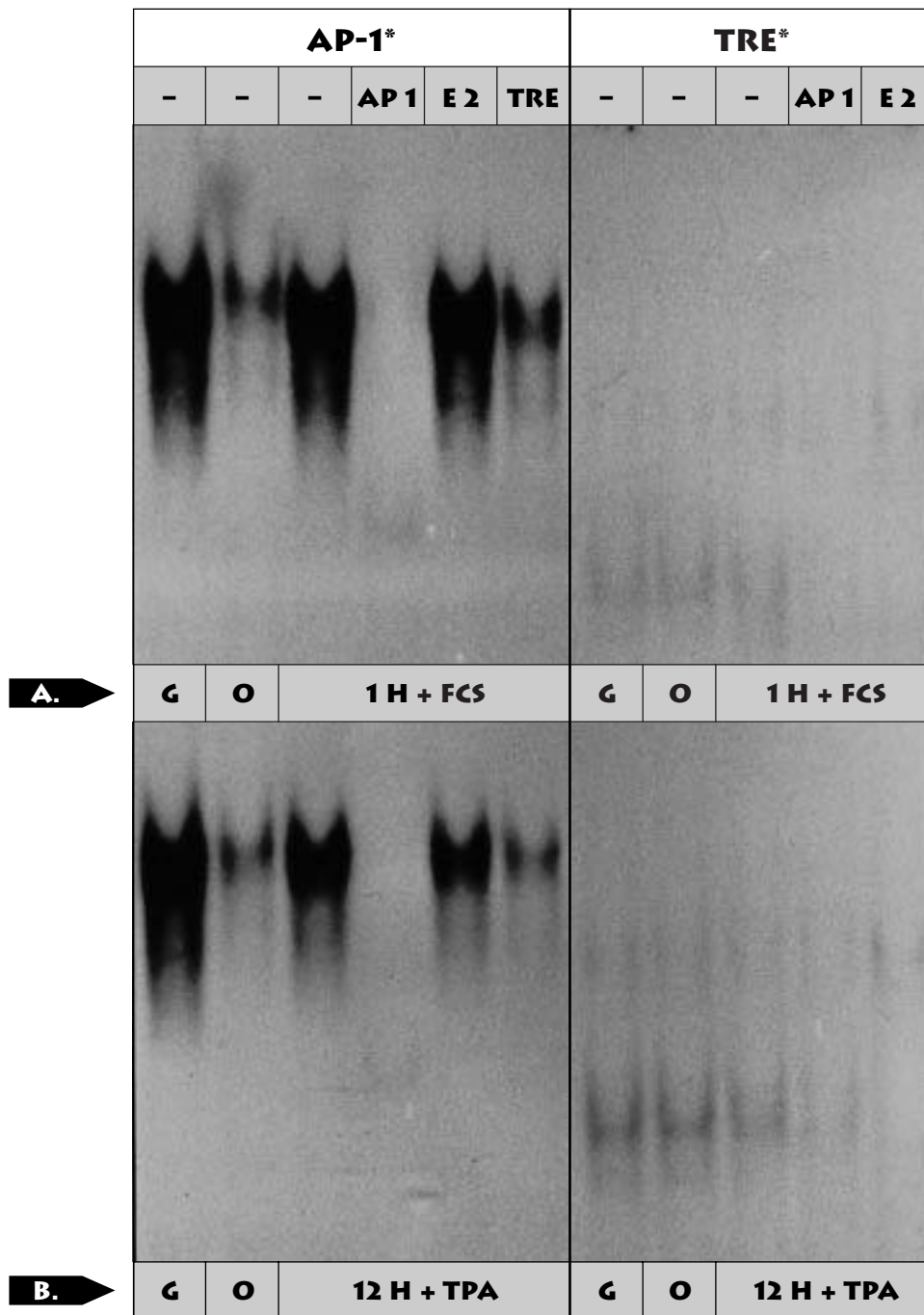


Abb. 9: Vergleichende Analyse der Proteinbindung an ein AP-1-Element bzw. das TRE-ähnliche Element in Abhängigkeit von Serum bzw. TPA

Elektrophoretic Mobility Shift-Assay mit je 5 µg Kernextrakt aus NIH3T3 Zellen. Die Zellen wurden 36 h in 10 % Serum (G) bzw. serumfrei kultiviert (O). Die serumfrei kultivierten Zellen wurden anschließend 1 h mit 10 % Serum (Abb. 9A) bzw. 12 h mit 10 ng TPA/ml Kulturmedium (Abb. 9B) inkubiert. 5 fmol an [³²P]-endmarkierten AP-1- (AP-1*) bzw. TRE-Oligonukleotiden (TRE*) wurden pro Ansatz verwendet. Die Verdrängungsexperimente wurden mit einem 300fachen Überschuss an nicht markierten Oligonukleotiden durchgeführt.

4.5. Analyse der HGF-Genexpression in Abhängigkeit von IL-6 und TPA

Für die Charakterisierung möglicher positiv regulierender Sequenzen im 5' flankierenden Bereich des HGF-Gens erfolgten zunächst Stimulierungsversuche mit IL-6 und TPA in verschiedenen Ansätzen. Zunächst wurden NIH3T3 Zellen mit den Zytokinen IL-6 und TGF β 1 sowie dem Phorbolester TPA für 12 h inkubiert und die HGF-Expression im 'Northern Blot' detektiert (Abb. 10). Die Stimulierung der serumfrei kultivierten NIH3T3 mit TPA sowie mit IL-6 zeigte gegenüber der Kontrolle eindeutig keinen Effekt auf die HGF-Expression. TGF β 1 bewirkte, wie unter 4.7. gezeigt, eine deutliche Suppression der HGF-Genexpression. Im Anschluß an diesen Versuchsansatz erfolgte die Stimulierung mit TPA für 1 h bzw. für 4 h, da die Induktion von *c-fos*, einem 'early response gene', sehr rasch erfolgen kann. Die Inkubation mit IL-6 erfolgte für 24 h und parallel erfolgte ein Ansatz mit IL-6 sowie dem löslichen IL-6-Rezeptor, dem gp80, um so die Möglichkeit fehlender IL-6-Rezeptoren als Grund für die ausbleibende Responsivität auf IL-6 auszuschließen. Die Stimulierung der serumhaltig sowie serumfrei kultivierten NIH3T3 mit TPA für 1 bzw. 4 h, mit IL-6 sowie mit IL-6 + gp80 für 24 h zeigte ebenfalls gegenüber der Kontrolle keinen Effekt auf die HGF-Expression (ohne Abbildung).

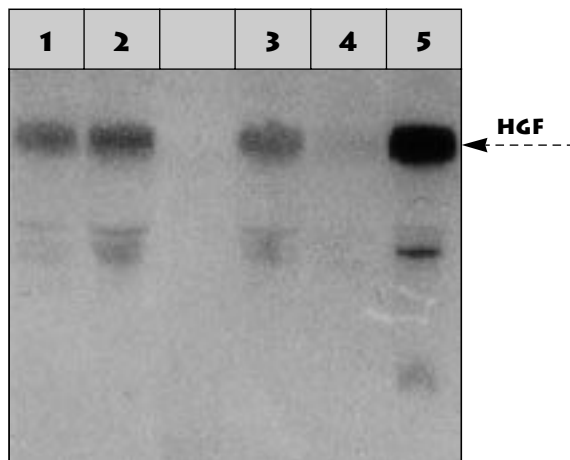


Abb. 10: HGF-Expression in NIH3T3 nach Inkubation mit IL-6, TPA und TGF β

'Northern Blot'-Hybridisierung von 20 μ g Gesamt-RNA aus NIH3T3 (1–4) bzw. FH109 (5) Zellen: Die Zellen wurden 36 h serumfrei (0,5%) kultiviert (1 und 5) und anschließend wurden die NIH3T3 für 12 h mit 500 U IL-6/ml (2), 10 ng TPA/ml (3) bzw. 5 ng TGF β 1/ml (4) Kulturmedium stimuliert. Die FH109 dienten als Positivkontrolle (5).

4.6. Suppression der HGF-Genexpression durch Serum

Die HGF-Expression wurde in verschiedenen Zellen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Serum untersucht. Dafür erfolgte eine 36stündige Inkubation der Zellen in ihrem normalen, serumhaltigen Kulturmedium (5–10 %) bzw. in serumfreiem Medium, das nur 0,5 % Serum enthielt. Die HGF-Expression wurde durch 'Northern Blot'-Hybridisierungen analysiert. Die Kultivierung verschiedener Säugerzellen, die Rattenzelllinien KNRK und Rat2, sowie eine 18 Tage alte Primärkultur von hepatischen Sternzellen aus der Ratte in serumhaltigem bzw. serumfreiem Kulturmedium über einen Zeitraum von 36 h zeigte in den 'Northern Blot'-Analysen keinerlei Auswirkung auf die HGF-Expression dieser Zellen (ohne Abb.).

Eine Analyse der HGF-Expression in NIH3T3 Zellen in Abhängigkeit von Serum zeigte deutlich, daß die langfristige Kultivierung dieser Zellen in serumhaltigem Kulturmedium die HGF-Expression vollständig supprimiert (Abb. 11). Die Kultivierung ohne Serum führte zu einer starken Induktion der HGF-Genexpression. Eine darauffolgende Serumstimulation von 1 Stunde führte sogar zu einer weiteren Aktivierung der HGF-Expression. Dieser Effekt war bei einer 4stündigen Serumstimulation schon nicht mehr nachweisbar.

Die humanen embryonalen Lungenfibroblasten FH109 exprimieren in 10 % serumhaltigem Kulturmedium HGF. Eine Serumdepletion über den Zeitraum von 36 h führte zu keiner Änderung in Bezug auf die HGF-Expression, wohingegen ein 4stündiger Serumstimulus nach der serumfreien Kultivierung zu einer verstärkten HGF-Genexpression führte. Die Analyse der *c-fos*-Expression zeigte eine Induktion von *c-fos* nach 1 h Serumstimulation, die nach 4 h Serumstimulus noch verstärkt wurde. Nach langfristiger Kultivierung in Serum konnten jedoch keine *c-fos*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 12).

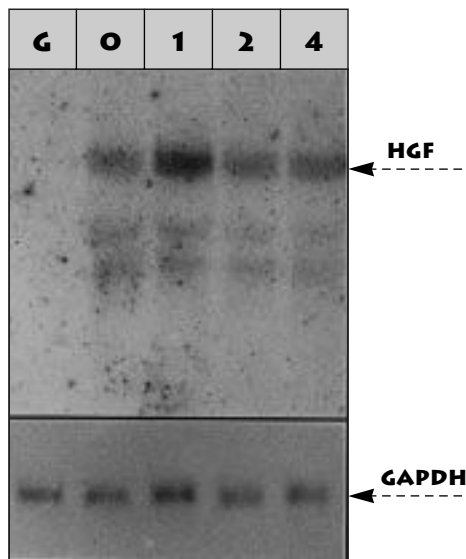


Abb. 11: HGF-Expression in NIH3T3 in Abhängigkeit von Serum

'Northern Blot'-Hybridisierung von 20 µg Gesamt-RNA aus NIH3T3 Zellen: Die Zellen wurden 36 h in 10% Serum (G) bzw. serumfrei (0,5%) kultiviert (O) und anschließend 1 h (1), 2 h (2) bzw. 4 h (4) mit 10% Serum inkubiert.

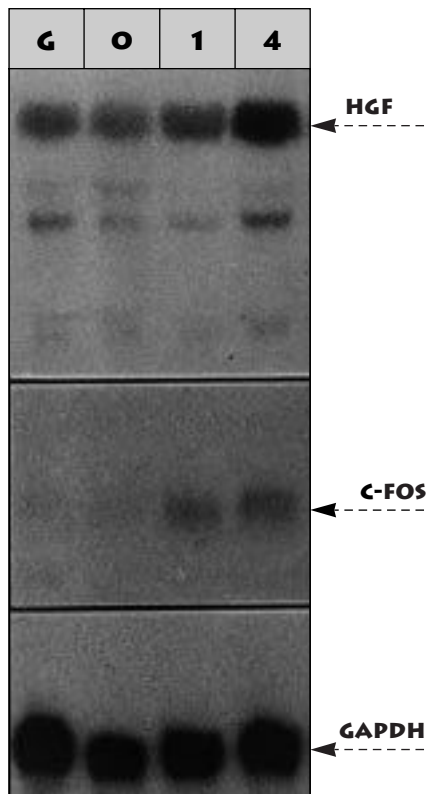


Abb. 12: HGF- und c-fos-Expression in FH109 in Abhängigkeit von Serum

'Northern Blot'-Hybridisierung von 20 µg Gesamt-RNA aus FH109 Zellen: Die Zellen wurden 36 h in 10% Serum (G) bzw. serumfrei (0,5%) kultiviert (O) und anschließend 1 h (1) bzw. 4 h (4) mit 10% Serum inkubiert.

4.7. TGF β vermittelte Suppression der HGF-Genexpression

Zunächst wurden Stimulierungen mit TGF β an FH109 Zellen, humanen embryonalen Lungenfibroblasten, und an der Zelllinie NIH3T3, embryonalen Mausfibroblasten, durchgeführt. Die HGF-Expression wurde durch 'Northern Blot'-Hybridisierungen analysiert (Abb. 13 und 14).

TGF β zeigte einen deutlich supprimierenden Effekt auf die HGF-Expression sowohl in den NIH3T3 Zellen als auch in den FH109 Zellen. Die Suppression war in beiden Versuchsansätzen nach 4 h TGF β Inkubation am stärksten ausgeprägt, nach 12 h deutlich schwächer. In den FH109 Zellen wurde außerdem die *c-fos*-Expression in Abhängigkeit von TGF β untersucht. Die Autoradiographie zeigt eine *c-fos*-Induktion durch TGF β -Stimulus der Zellen, die nach 1 h am stärksten, nach 4 bzw. 12 Stunden TGF β Stimulus schwächer, jedoch immer noch nachweisbar war, während in der Kontrolle keine *c-fos*-Transkripte nachgewiesen werden konnten.

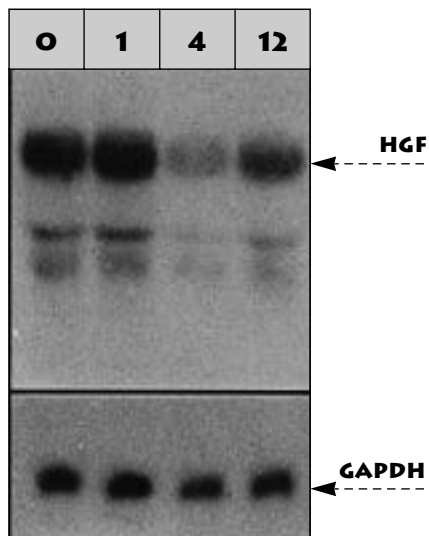


Abb. 13: HGF-Expression in NIH3T3 nach TGF β -Stimulierung

'Northern Blot'-Hybridisierung von 20 μ g Gesamt-RNA aus NIH3T3 Zellen: Die Zellen wurden 36 h serumfrei kultiviert (0) und anschließend 1 h (1), 4 h (4) bzw. 12 h (12) mit 5 ng TGF β 1/ml Kulturmedium inkubiert.

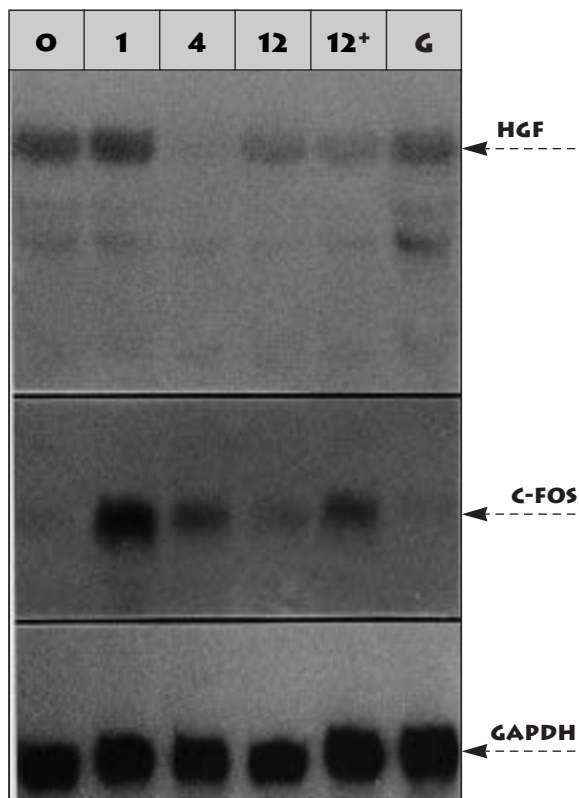


Abb. 14: HGF- und c-fos-Expression in FH109 nach TGF β -Stimulierung

'Northern Blot'-Hybridisierung von 20 μ g Gesamt-RNA aus FH109 Zellen: Die Zellen wurden 36 h in 10 % Serum (G) kultiviert und anschließend 12 h mit 5 ng TGF β 1/ml Kulturmedium inkubiert (12+) bzw. serumfrei kultiviert (0) und anschließend 1 h (1), 4 h (4) bzw. 12 h (12) mit 5 ng TGF β 1/ml Kulturmedium inkubiert.

4.8. Proteinbindungen an das TIE-1- sowie das TIE-2-Element in Abhängigkeit von TGFβ

Für die Untersuchung von Proteinbindungen im 5' flankierenden Bereich des HGF-Gens in Abhängigkeit von TGFβ wurden Elektrophoretic Mobility Shift-Assay's mit TIE-Oligonukleotiden (3.3.6.) und Kernextrakten aus unstimulierten Zellen als auch aus TGFβ-stimulierten Zellen durchgeführt.

Eine Bindung von Kernproteinen an das TIE-1 konnte für die TGFβ-stimulierten Zellen und auch für den Kontrollansatz gezeigt werden (Abb. 15). Jeweils zwei Proteinkomplexe wurden nach TGFβ-Stimulation detektiert, wobei die Proteinbindungen sich mit steigender TGFβ-Inkubationsdauer verstärkten. Der Kontrollansatz zeigte eine breite Bande, so daß keine einzelnen Komplexe detektiert werden konnten. Die spezifische Verdrängung mit nicht markiertem TIE-1-Oligonukleotid in 100fachem molarem Überschuß erfolgte deutlich. Das TIE-1-Oligonukleotid TIE-1a, das unmittelbar vor der TIE-1-Sequenz eine potentielle SP-1-Bindestelle enthält, führte zu keiner spezifischen Verdrängung. Ebenso bewirkten die nicht homologen HLH- bzw. E₂SM-Oligonukleotide keine Verdrängung.

Die 'Mobility-Shift'-Analysen mit dem TIE-2-Element (Abb. 16) zeigten ebenfalls spezifische Proteinbindungen mit Kernextrakten unstimulierter als auch TGFβ-stimulierter Zellen an das TIE-2 Oligonukleotid. Dabei war das spezifische Signal in der Autoradiographie mit den Kernextrakten aus den TGFβ-stimulierten Zellen stärker ausgeprägt als das im Kontrollansatz. Die Verdrängung mit nicht markiertem TIE-2-Oligonukleotid erfolgte deutlich.

Die Inkubation der Kernextrakte mit einem AP-1-Oligonukleotid zeigte spezifische Protein-DNA-Komplexe auf der gleichen Höhe im Gel wie die Komplexe mit dem TIE-2. Auch in diesen Ansätzen war die Proteinbindung mit den Kernextrakten aus den TGFβ-stimulierten Zellen stärker als im Kontrollansatz. Eine spezifische Verdrängung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte eindeutig mit nicht markierten AP-1-Oligonukleotiden in 100fachem molarem Überschuß.

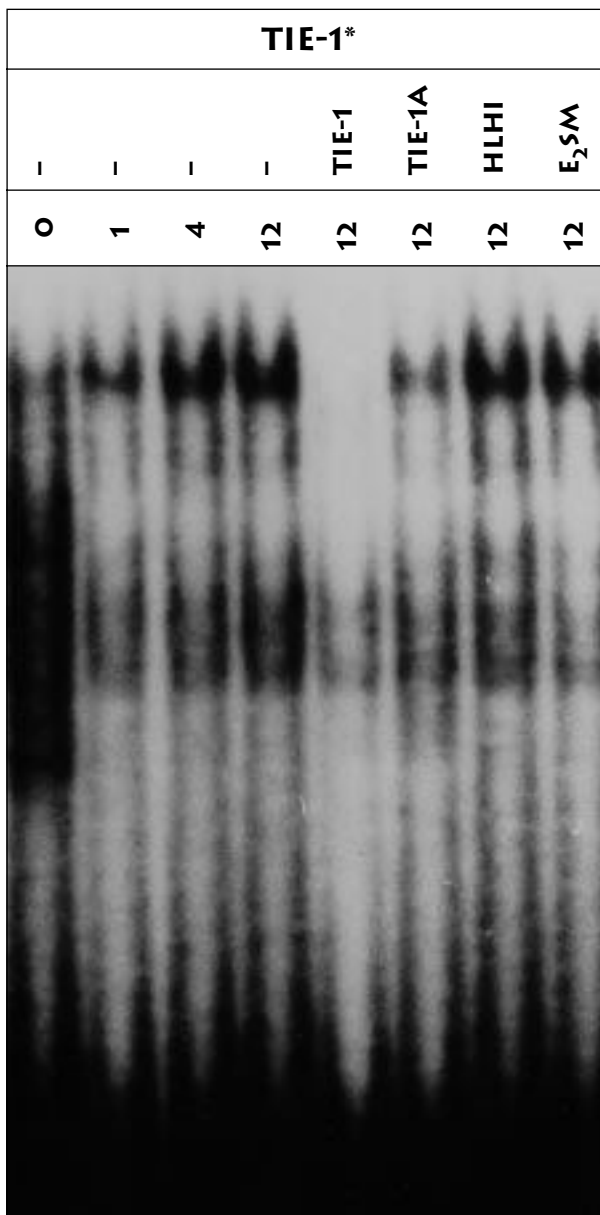


Abb. 15: Proteinbindung an das TIE-1-Element in Abhängigkeit von TGF β

Elektrophoretic Mobility Shift-Assay mit je 5 μ g Kernextrakt aus NIH3T3 Zellen. Die Zellen wurden 36 h serumfrei kultiviert (0) und anschließend 1 h (1), 4 h (4) bzw. 12 h (12) mit 5 ng TGF β 1/ml Kulturmedium inkubiert. 5 fmol an [32 P]-endmarkierten TIE-1-Oligonukleotiden (TIE-1*) wurden pro Ansatz verwendet. Die Verdrängungsexperimente wurden mit einem 100fachen molaren Überschuss an nicht markierten Oligonukleotiden durchgeführt.

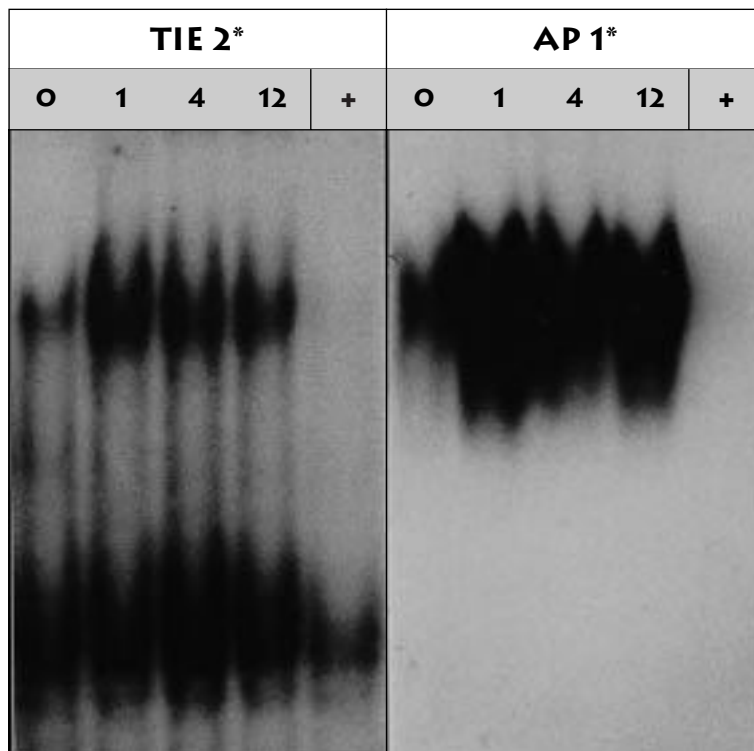


Abb. 16: Proteinbindung an das TIE-2-Element in Abhängigkeit von TGF β

'Electrophoretic Mobility Shift'-Assay mit je 5 μ g Kernextrakt aus NIH3T3 Zellen. Die Zellen wurden 36 h serumfrei kultiviert (0) und anschließend 1 h (1), 4 h (4) bzw. 12 h (12) mit 5 ng TGF β 1/ml Kulturmedium inkubiert. 5 fmol an [32 P]-endmarkierten TIE-1- (TIE-1*) bzw. AP-1-Oligonukleotiden (AP-1*) wurden pro Ansatz verwendet. Die Verdrängungsexperimente (+) wurden mit einem 100fachen molaren Überschuss an nicht markierten TIE-1- bzw. AP-1-Oligonukleotiden durchgeführt.

4.9. Identifizierung einer HLH-Konsensussequenz in der 5' flankierenden Region des HGF-Gens

Ein weiterer Ansatz für die Charakterisierung von proteinbindenden Sequenzen im HGF-Promotor erfolgte mit der DNase I Footprint-Analyse. Dabei wurden 200–400 bp lange Teilfragmente des 1370 bp langen, klonierten DNA-Abschnitts auf proteinbindende Sequenzen hin untersucht. Die durchgeführten Versuche zeigten im 5' Bereich des HGF-Gens von –331 bis –44, einen Footprint von ca. –280 bis –200, der sowohl mit Kernextrakten aus HGF-exprimierenden NIH3T3 Zellen gebildet wurde als auch mit Kernextrakten aus NIH3T3 Zellen, die kein HGF exprimieren (ohne Abbildung). Die genaue Sequenzanalyse dieser Region (Abb. 17, rechtes Schaubild) ergab das Vorhandensein zweier tandemartig aufgebauter E-Box-Konsensussequenzen an der Position –256 bis –236. Daraufhin erfolgte die Synthese von Oligonukleotiden, HLH I, HLH II sowie HLH I/II, die den protektierten Bereich teilweise überspannten; unter Einschluß einer E-Box-Konsensussequenz bzw. im Oligonukleotid HLH I/II beider E-Box-Konsensussequenzen.

Eine weitere DNase I Footprint-Analyse des HGF-Promotorbereiches von –311 bis –72 und –271 bis –72 erfolgte mit Kernextrakten aus Rat2 Zellen. Bei diesem Versuchsansatz wurde zusätzlich eine G/A-Sequenzierungsreaktion des DNA-Fragmentes nach Maxam und Gilbert durchgeführt. Außerdem erfolgten Verdrängungsexperimente mit den Oligonukleotiden HLH I, HLH II sowie HLH I/II, die den Bereich der zu erwartenden DNA-Protein-Interaktion, ermittelt anhand der bereits erfolgten Footprintanalyse, abdecken. Diese Oligonukleotide wurden in 100facher Konzentration der markierten DNA eingesetzt. Die DNase I Footprint-Analyse zeigte ebenfalls eine deutliche DNA-Protein-Interaktion (Abb.17). Die mitaufgetragene Sequenzierungsreaktion ermöglichte die genaue Lokalisation des protektierten Bereiches in der HGF-Promotorsequenz. Die protektierte Sequenz umfaßt 38 bp und erstreckt sich von –266 bis –229. Sie beinhaltet zwei E-Box-Konsensussequenzen, die eine Erkennungssequenz für Transkriptionsfaktoren der Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Familie darstellen. Die Verdrängungsexperimente zeigten eine vollständige Aufhebung des Footprints durch die Oligonukleotide HLH I/II. In dieser Untersuchung konnten die einzelnen Oligonukleotide, HLH I bzw. HLH II, die DNA-Proteinbindung nicht stören.

In einem Proteinbindungsassay (EMSA) wurden die dimerisierten, radioaktiv markierten HLH I-Oligonukleotide mit Kernextrakten verschiedener Zellen inkubiert. Verdrängungsexperimente erfolgten mit nicht markierten HLH I-Oligonukleotiden sowie mit den zwei nicht homologen Oligonukleotiden E₂SM (E-Box des 'Glattmuskel-Aktin'-Promotors) und TIE-2 (Abb. 18). Mit den Kernextrakten aller eingesetzter Zellen konnten Proteinbindungen an die HLH I-Oligonukleotide nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um jeweils zwei DNA-Protein-Komplexe mit unterschiedlicher Größe und damit Laufgeschwindigkeit im Gel. Die Verdrängung mit den nicht markierten HLH I-Oligonukleotiden im 100fachen Überschuß erfolgte eindeutig. Dabei erwies sich der höhermolekulare DNA-Proteinkomplex als spezifisch, der niedermolekulare als unspezifisch, da hier keine Verdrängung durch die HLH I-Oligonukleotide erfolgte. Das Verdrängungsexperiment mit Oligonukleotiden, die die E-Box des 'Glattmuskel-Aktin'-Promotors beinhalteten, zeigte eine schwache Reduktion der DNA-Protein-Interaktion, mit den TIE-2-Oligonukleotiden konnte keine Verdrängung gezeigt werden. Für die HLH II-Oligonukleotide allein konnten in einem Proteinbindungsassay keine spezifischen Proteinbindungen detektiert werden (ohne Abbildung).

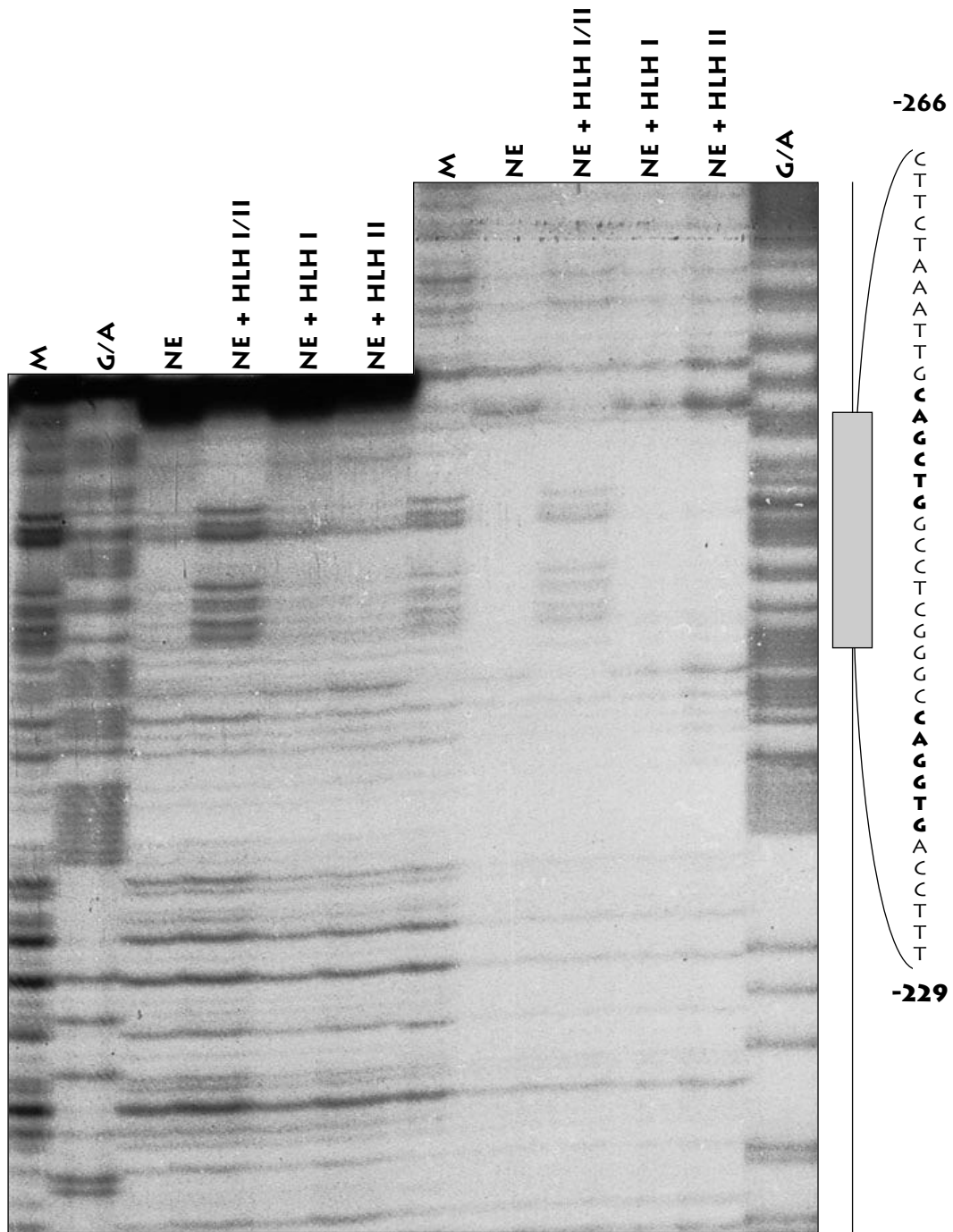


Abb. 17: Identifizierung einer HLH-Konsensussequenz im HGF-Promotor

DNase I Footprint des HGF 5' flankierenden Bereiches von -271 bis -72 (links) und -311 bis -72 (rechts). Eingesetzt wurden pro Ansatz 5 fmol [32 P]-endmarkiertes DNA-Promotorfragment sowie 5 μ g Kernextrakt (NE) aus Rat2-Zellen. Die Oligonukleotide, die in den Verdrängungsexperimenten eingesetzt wurden, sind entsprechend gekennzeichnet (HLH I und/oder II). Anhand der G/A-Sequenzierungsreaktion des DNA-Fragmentes (G/A) läßt sich der proteinbindende Bereich (repräsentiert durch die graue Box) genau identifizieren. Zur Fragmentlängenbestimmung diente zusätzlich ein mitaufgetragener Marker (M).

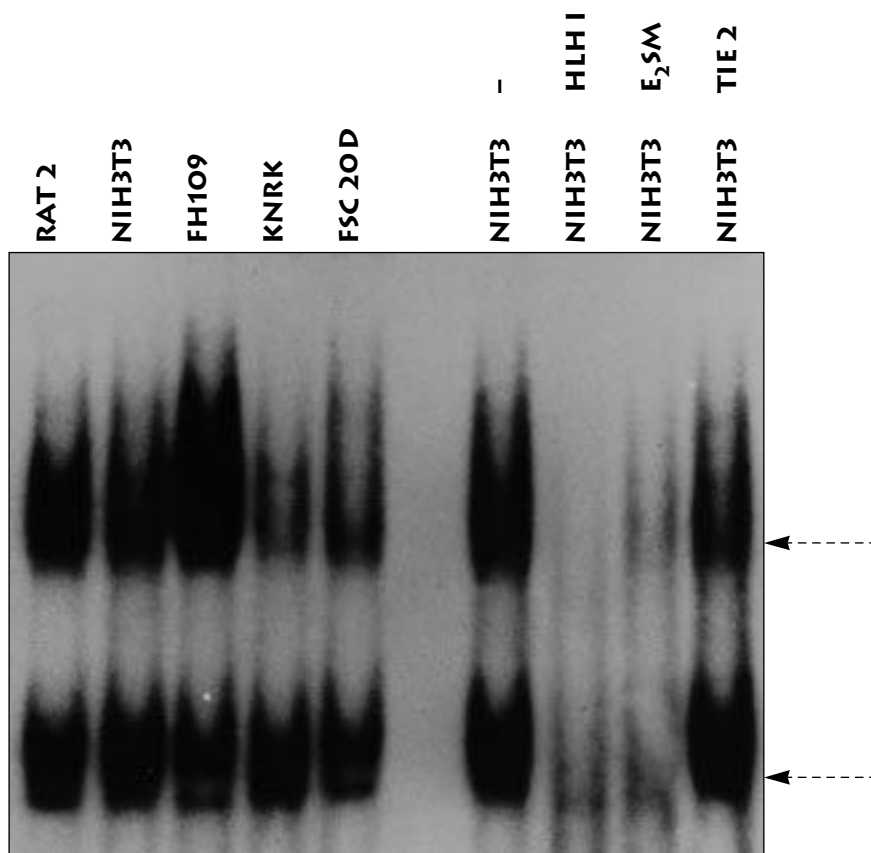


Abb. 18: Proteinbindung an das HLH I-Oligonucleotid

'Elektrophoretic Mobility Shift'-Assay mit je 5 µg Kernextrakt aus Rat2, FH109, KNRK, 20 Tage kultivierten hepatischen Sternzellen und NIH3T3 Zellen. 5 fmol an [³²P]-endmarkierten HLH I-Oligonucleotiden wurden pro Ansatz verwendet. Die Verdrängungsexperimente wurden mit einem 100fachen molaren Überschuss an nicht markierten HLH I-, E₂SM- bzw. TIE-2-Oligonucleotiden durchgeführt.

5. DISKUSSION

HGF ist ein pleiotropes Zytokin, das das Wachstum sowie die Regeneration verschiedener Gewebe unter normalen Bedingungen sowie bei neoplastischem Wachstum reguliert. Seine Genexpression ist auf Zellen mesenchymalen Ursprungs in einer Reihe von Geweben restringiert; sie wird induziert als Antwort auf Gewebsverletzung bzw. -verlust zur effektiven Regeneration. Verschiedene Zytokine und Hormone beeinflussen die HGF-Genexpression. Wie viele Gene wird es erheblich auf Ebene der Transkription reguliert, so daß es anzunehmen ist, daß ein Netzwerk aus *cis*-agierenden Responsiven Elementen innerhalb der 5' genregulatorischen Sequenz des HGF-Gens sowie eine Vielzahl *trans*-agierender bindender Polypeptide in die Genregulation involviert sind.

Für ein besseres Verständnis dieser regulatorischen Mechanismen bezüglich HGF wurde in der vorliegenden Arbeit die 5' flankierende Region des Ratten-HGF-Gens kloniert und mit Hilfe verschiedener Versuchsansätze charakterisiert. Die computergestützte Sequenzanalyse der aus Rattenleber-DNA klonierten, 1367 bp langen Region ermittelte eine Vielzahl an potentiell funktionellen Konsensussequenzen: Interleukin-6-Response Elemente I und II, TGF β -inhibitorische Elemente, ein Interferon-stimuliertes-Response Element, ein TPA-Response Element sowie Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren PEA3 und SP-1 (Abb. 3). Diese große Anzahl potentieller Proteinbindestellen stützt weiter die Annahme einer komplexen transkriptionellen Regulation des HGF-Gens.

Stimulierungsversuche mit IL-6 erbrachten keine Hinweise dafür, daß eine positive Regulation des HGF-Gens durch Interleukin 6 über die IL-6 Response Elemente I bzw. II erfolgt (4.5. und Abb. 10). LIU ET AL. (1994a) konnte mit Hilfe eines stabilen NIH3T3 Fibroblastenzellklons, der ein 2,8 kb langes Maus-HGF-Promotorkonstrukt inseriert hatte, eine schwache Stimulation durch IL-6 zeigen, die vermutlich durch ein IL-6-Response Element II an der Position -2255 in der genregulatorischen Sequenz des Maus-Enhancers hervorgerufen wird. Im Gegensatz hierzu brachten Transfektionsstudien mit rasNIH3T3 Fibroblasten, die mit verschiedenen Deletionskonstrukten, von 0,1 kb bis 2,8 kb, des Maus-HGF-Promotors transient transfiziert waren, keine Hinweise auf eine signifikante Stimulation durch IL-6 (PLASCHKE-SCHLÜTTER ET AL., 1995).

Die Analyse des potentiellen TPA-Response Elementes an der Position -326 des Ratten HGF-Promotors zeigte, daß diese Sequenz für die Stimulierung des HGF-Gens durch TPA keine Bedeutung hat (Abb. 9). PLASCHKE-SCHLÜTTER (1995) konnte mit Hilfe der bereits oben erwähnten Transfektionsstudien ebenfalls keine stimulierenden Effekte durch TPA nachweisen. Die von NISHINO (1991) beschriebene Stimulierung der promyelocytischen Leukämiezelllinie HL60 durch TPA, gezeigt durch den Anstieg der HGF-mRNA, läßt jedoch andere, möglicherweise weiter 5' liegende, TPA-Response Elemente vermuten.

Im Gegensatz hierzu konnten jedoch in den vorliegenden Untersuchungen mehrere Sequenzabschnitte in der 5' flankierenden Region des Ratten-HGF-Gens identifiziert werden, die an der transkriptionellen Regulation des HGF-Gens maßgeblich beteiligt sind.

Konstitutive Suppression des HGF-Gens

Transfektionsstudien in KNRK-Zellen, die verschiedene Promotordeletionskonstrukte stabil in ihr Genom inseriert haben, zeigten eine deutlich höhere Promotoraktivität des kürzesten, am weite-

sten 3' gelegene 100 bp langen Promotorfragmentes. Auch wenn das Ergebnis aufgrund der Verwendung stabil transfizierter Klone mit Einschränkung zu bewerten ist, zeigten die übrigen Zellklone, die jeweils längere Fragmente inseriert haben, eine weitaus geringere Promotoraktivität (Abb. 4b). Dies spricht dafür, daß das HGF-Gen oberhalb der Region -70 Sequenzen aufweist, die eine Suppression der Promotoraktivität bewirken können. Dabei sind zum einen negativ regulierende Sequenzen im Bereich -70 bis -270 zu vermuten, sowie im Bereich -270 bis -620, da die transkriptionelle Aktivität mit der Länge der Promotorfragmente abnimmt. Im Bereich -620 bis -1340 liegen möglicherweise positiv regulierende Sequenzen, da der Klon mit dem längsten Fragment eine leicht erhöhte Promotoraktivität gegenüber dem Klon KNRK620 aufwies. Jedoch überwiegt auch hier die reprimierende Aktivität in Bezug auf das gesamte Fragment, da die Aktivität lediglich ein Zehntel der Promotoraktivität des 100 bp langen Fragments betrug. Diese deutlich erhöhte Promotoraktivität konnten andere Arbeitsgruppen ebenfalls für die ersten 100 bp des Maus-HGF-Promotors zeigen (LIU ET AL., 1994A; PLASCHKE-SCHLÜTTER ET AL., 1995).

Die Stimulierung der Zellklone mit den Mediatoren TGF β , TNF α , EGF, PDGF, INF α , INF γ , TPA, Dexamethason, IL-1 β , IL-6 und LPS zeigte in keinem Ansatz eine signifikante Stimulierung oder Suppression, d. h. die Substanzen hatten keinen signifikanten Einfluß auf die jeweils produzierte CAT-Enzymmenge. Diese fehlende Responsivität ist bei dem Zellklon mit dem kürzesten inserierten Fragment mit vermutlich nicht vorhandenen Proteinbindesequenzen für die entsprechend aktivierten Transkriptionsfaktoren zu erklären, bei den Zellklonen mit den längeren inserierten Promotorfragmenten erscheint diese Erklärung nicht stichhaltig, da eine Reihe entsprechender Konsensussequenzen in den klonierten Sequenzen (s. o.) ermittelt wurde. Diese fehlende Responsivität wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. So konnten rasNIH3T3 Fibroblasten, die transient mit einer Reihe verschiedener Maus-HGF-Promotordeletionskonstrukte transfiziert waren, weder mit TGF β , TPA noch IL-6 stimuliert bzw. supprimiert werden (PLASCHKE-SCHLÜTTER ET AL., 1995). Ebenso konnten die NIH3T3 Fibroblasten sowie die RL95-2, eine humane Endometriumkarzinomzelllinie, jeweils transfiziert mit Maus-HGF-Promotorkonstrukten, weder mit IL-1, TPA noch EGF stimuliert oder supprimiert werden (LIU ET AL., 1994A). Allen untersuchten Zelllinien mit Ausnahme des rasNIH3T3 Klons ist gemein, daß sie kein HGF produzieren. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Responsivität der KNRK-Zellen sowie der anderen Fibroblasten bzw. epithelialen Zellen sind supprimierende Sequenzen, sogenannte Silencer, die im 5' Bereich des HGF-Gens liegen, und in den Zellen, die kein HGF produzieren, über eine Anlagerung zelltypspezifischer Polypeptide für eine konstitutive Suppression der HGF-Expression verantwortlich sein können.

Das Screening der 5' flankierenden Region des Ratten HGF-Gens auf proteinbindende Sequenzen mittels DNase I Footprint-Analyse ergab eine protektierte Region von -266 bis -229, an die spezifisch Proteine aus Rat 2 Kernextrakten binden (Abb. 17). Die Sequenz dieser Region beinhaltet ein Tandem-E-Box-Element, bestehend aus zwei potentiell HLH-Proteine bindenden Sequenzen. Bei den HLH-Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren der basischen HLH-Leucizipper-Familie, die charakterisiert ist durch aneinander angrenzende 'basische' HLH- und Leucizipperdomänen. Mitglieder dieser Familie sind die MYC Onkoproteine, ihr Bindungspartner MAX und die Säuger-Transkriptionsfaktoren USF, TFE3 und TFEB (FISHER ET AL., 1991). Diese Proteine binden die Sequenz CANNTG, eine sogenannte E-Box, benannt nach einer Enhancersequenz in der schweren Kette des Immunglobulins E (EPHRUSSI ET AL., 1985).

Die protektierte Region in der Footprint-Analyse beinhaltet zwei dieser Konsensussequenzen. Die Verdrängungsexperimente mit spezifischen Oligonukleotiden, die eine (HLH I bzw. HLH II) oder beide E-Box-Sequenzen (HLH I/II) enthielten, zeigten, daß für eine vollständige Verdrängung das Vorhandensein beider E-Box-Sequenzen notwendig ist. Die Proteinbindungsassays zeigten deutlich, daß dennoch HLH I alleine, d. h. die 3' gelegene E-Box-Sequenz, spezifisch an Proteine binden kann. Diese Bindung erfolgte sowohl mit HGF-produzierenden Fibroblasten als auch mit Fibroblasten, die kein HGF produzieren (Abb. 18). Das Oligonukleotid HLH II, d. h. die 5' gelegene E-Box-Sequenz, kann alleine nicht spezifisch binden, ist jedoch, wie der Footprint zeigt, an der komplexen Proteinbindung beteiligt.

Fortführende Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß das Oligonukleotid HLH I essentiell für die Bindung ist, das Oligonukleotid HLH II erst nachfolgend bindet, d. h. erst nach Bindung des Oligonukleotids HLH I. Die gemeinsame Bindung von HLH I und HLH II ergibt dann eine vollständige Verdrängung des Footprint, d. h. beide Oligonukleotide sind für eine vollständige Bindung notwendig. Funktionelle Analysen haben weiterhin gezeigt, daß die in der Footprintanalyse protektierte Sequenz von -266 bis -229 eine stark transkriptionssupprimierende Wirkung im heterologen Promotorkontext aufweist, die durch Kotransfektion mit den Oligonukleotiden HLH I/II stark reduziert wurde (DIPLOMARBEIT K. KERRES, PUBLIKATION IN VORBEREITUNG). Ein Sequenzvergleich der protektierten Region mit den Konsensussequenzen bisher bekannter Transkriptionsfaktoren ergab eine starke Homologie mit der Bindesequenz für den Transkriptionsfaktor USF-1, die nur in einem Nukleotid abweichend ist (GREGOR ET AL., 1990). USF-1 gehört zur Familie der basischen HLH-Leucinzipper-Transkriptionsfaktoren.

Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe haben ebenfalls einen negativ regulatorischen Bereich von -258 bis -229 im Maus-HGF-Promotor mittels Footprint-Analyse in HGF-produzierenden als auch in Zellen, die kein HGF produzieren identifiziert. Sie konnten jedoch keinen inhibitorischen Effekt dieser Region im heterologen Promotorkontext feststellen (PLASCHKE-SCHLÜTTER ET AL., 1995).

Die oben aufgeführten Ergebnisse belegen, daß diese Sequenz als Silencer in der 5' genregulatorischen Sequenz wirken kann. Möglicherweise ist die transkriptionshemmende Wirkung dieses Silencers bei einigen Zellpopulationen, wie den KNRK, RL95-2 und Rat2 Zelllinien ausreichend für eine konstitutive Suppression der HGF-Expression. Viele Anhaltspunkte weisen jedoch darauf hin, daß in den meisten Zellpopulationen weit komplexere Vorgänge die HGF-Expression steuern. So konnten auch bei den humanen Lungenfibroblasten FH109, die HGF produzieren, Proteinbindungen an diese potentielle Silencerregion nachgewiesen werden. Die Maus Fibroblastenzelllinie NIH3T3 wies ebenfalls Proteinbindungen an die Silencerregion auf, obwohl einige Zellklone unter bestimmten Umständen HGF produzieren können (s. u.).

LIU ET AL. (1994 b) konnten für die Region -16 bis +11 im HGF-Promotor der Maus zeigen, daß sie eine Suppression der HGF-Expression in epithelialen Zellen bewirkt. Ein 70 kDa Polypeptid, das ausschließlich in epithelialen Zellen, die kein HGF exprimieren, nachgewiesen werden konnte, bindet an die Region. Hervorzuheben ist die Beobachtung, daß dieser Repressor vermutlich notwendig, jedoch alleine nicht ausreichend für eine vollständige Suppression der HGF-Expression ist. Dies wird u. a. dadurch belegt, daß die untersuchte Region nicht konserviert ist, so ist z. B. im 5' genregulatorischen Bereich der Ratte keine homologe Sequenz nachweisbar. Außerdem erfolgt die Wirkweise des Repressorproteins vermutlich über eine Verdrängung des RNA-Polymerase II Komplexes, so daß

die Menge an verfügbarem Repressor einen entscheidenden Einfluß auf die Effektivität der Suppression haben dürfte.

JIANG UND ZARNEGAR (1997 c) identifizierten für den Maus-HGF-Promotor im Bereich von -4 bis +3 eine Konsensussequenz für Proteine der C/EBP-Familie. Diese Proteine werden v. a. durch partielle Hepatektomie sowie durch Gewebsschädigung induziert. Diese C/EBP-Konsensussequenz wird überlappt von einer Proteinbindesequenz, -9 bis -4, an die der Proteinkomplex C1 bindet, welcher durch direkte Verdrängung die Bindung von Proteinen an die C/EBP-Konsensussequenz verhindert. Auch hier liegt in der HGF-Promotorsequenz der Ratte eine verändertes Basenpaar vor, so daß nicht sicher ist, ob diese Bindesequenzen für die Regulation des Ratten-HGF-Gens von Bedeutung sind.

Eine weitere Silencersequenz wurde im Maus-HGF-Promotor an der Position -870 beschrieben (JIANG ET AL., 1997 A). Es handelt sich dabei um ein unvollständiges Glukokortikoid Response Element (GRE), an das der 'chicken ovalbumin upstream promoter'-Transkriptionsfaktor (COUP-TF) bindet und auf diese Weise die transkriptionale Aktivität des HGF-Promotors effektiv reprimiert. Die untersuchte Sequenz ist jedoch nicht konserviert, d. h. in der 5' genregulatorischen Region des Ratten-HGF-Gens läßt sich diese Sequenz ebenfalls nicht nachweisen.

Proteinbindungsassays haben Proteinbindungen im Bereich des 'basalen' Promotors, -22 bis +30, nachgewiesen, sowohl mit Kernextrakten aus HGF-exprimierenden Zellen, den KG-1, als auch nicht exprimierenden Zellen, den KNRK-Zellen (Abb. 7). Diese Ergebnisse weisen auf bisher nicht bekannte Proteinbindesequenzen in dieser Region hin. Untersuchungen des weiter 5' gelegenen Bereiches, -170 bis -70, zeigten für die HGF-exprimierenden Zellen KG-1 eine zusätzliche Proteinbande gegenüber den KNRK Zellen (Abb. 7). In den KNRK Zellen bewirken möglicherweise die bereits oben erwähnten Silencersequenzen im weiter 5' gelegenen Bereich des HGF-Promotors, -266 bis -229, eine Suppression der Bindung von Transkriptionsfaktoren im 5' Bereich, wodurch die konstitutive Suppression der HGF-Expression in diesen Zellen erfolgt.

Erste *in vivo* Untersuchungen des Maus-HGF-Gens zeigten, daß die basale Promotorregion von 100 bp für eine Expression des HGF-Gens nicht ausreichend ist. Erst ein 2,7 kb HGF-CAT-Konstrukt zeigt ein Expressionsmuster, das dem des endogenen HGF-Gens entspricht (BELL ET AL., 1998). Diese funktionalen Unterschiede zu den Transfektionsstudien *in vitro* entstehen möglicherweise durch eine veränderte Chromatinstruktur der transfizierten Genabschnitte. Distale Enhancerregionen benötigen in der Regel eine höher geordnete Chromatinstruktur, da die räumliche Nähe dieser stromaufwärts liegenden Sequenzen zu den entsprechenden basalen Promotorabschnitten eine maximale Genaktivierung bewirkt (WORKMAN AND BUCHMAN, 1993).

Induzierte Suppression durch Serumfaktoren

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von fetalem Kälberserum (FCS), das zu 5–10% dem Kulturmedium der Zellen für ein optimales Wachstum beigegeben wird, auf die HGF-Expression der Zellen untersucht. Die Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 produziert unter normalen Kulturbedingungen kein HGF. Eine serumfreie Kultivierung dieser Zellen führte zu einer starken Induktion der HGF-Expression, die durch einen einstündigen Serumstimulus nochmals verstärkt wurde. Ein Serumstimulus von 4 h zeigte bereits keinen stimulierenden Effekt mehr auf die HGF-Expression (Abb. 11). Diese Ergebnisse zeigen, daß die NIH3T3 Zellen potentiell HGF exprimieren können; unter norma-

len Wachstumsbedingungen erfolgt jedoch eine vollständige Suppression der HGF-Expression in diesen Zellen. Die Fähigkeit, HGF unter serumfreien Bedingungen zu produzieren, ist außerdem abhängig vom jeweiligen Zellklon der NIH3T3 Fibroblasten. Je nach Art des NIH3T3 Zellklons ist die HGF-Expression in diesen Zellen reversibel bzw. irreversibel supprimiert.

Die permanente Anwesenheit von serogenen Faktoren scheint eine vollständige HGF-Suppression in den untersuchten NIH3T3 Zellen zu bewirken. Die im FCS enthaltenen Wachstumsregulatoren wirken mitogen, so daß die Zellen bei entsprechender Verdünnung ständig proliferieren. Die serumfreie Kultivierung der Zellen führt dagegen zu einer Proliferationshemmung, so daß die Zellen einen ruhenden Status einnehmen. In diesem ‚Ruhezustand‘ sind einige Zellklone der NIH3T3 zur HGF-Synthese fähig. Dieser *in vitro* Effekt, hervorgerufen durch die mitogene Stimulation der Zellen durch serogene Faktoren, ist möglicherweise auch bei den kultivierten hepatischen Sternzellen (HSC) für die Proliferation verantwortlich. Die normale, serumhaltige Kultivierung der HSC sowie der NIH3T3 verursacht eine Aktivierung der Zellen, die mit dem Verlust der HGF-Expression einhergeht (Abb. 19).

<i>In vitro</i>	∅ FCS	1 h FCS	>24 h FCS
NIH3T3	+	++	∅
HSC, 16 d in Kultur	∅	n. d.	∅

<i>In vivo</i>	Normale Leber	Akut geschädigte Leber	Chronisch geschädigte Leber
HSC	(+)	(++)	(∅)

+ bis ++: semiquantitativer Nachweis von Transkripten

∅: kein Nachweis von Transkripten

n.d.: nicht durchgeführter Versuchsansatz

(): Nachweise, bzw. Hypothesen erfolgten nicht im Rahmen dieser Arbeit (SCHIRMACHER ET AL., 1993)

Abb.19: Einfluß von Wachstumsregulatoren auf die HGF-Expression

Die Vorgänge, die *in vivo* die Aktivierung der HSC bewirken, sind kaum verstanden. Diskutiert werden infiltrierende Thrombozyten sowie aktivierte Kupffer Zellen, die bei einer Gewebsverletzung der Leber TGFβ, TGFα, TNFα, IL-1 sowie diverse Wachstumsfaktoren wie IGF1, EGF, bFGF und PDGF sezernieren (BACHEM ET AL., 1993A UND B). Diese parakrine Stimulation führt zur Aktivierung der HSC. Im weiteren Verlauf der fibrogenen Kaskade exprimieren die aktivierten HSC Rezeptoren für TGFβ, TGFα und EGF auf ihrer Oberfläche und sezernieren TGFβ und TGFα, so daß die Grundlage für eine autokrine Stimulation der Zellen besteht, die vermutlich für die Transformation der aktivierten HSC in Myofibroblasten von großer Bedeutung ist (BACHEM ET AL., 1992). *In vitro* führt vermutlich die autokrine Stimulation der proliferierenden HSC durch TGFβ zu einer irreversiblen Suppression der HGF-Synthese.

Bei einer akuten Schädigung der Leber finden die beschriebenen initialen Vorgänge vermutlich ebenso statt, jedoch erfolgt die Aktivierung der HSC möglicherweise in einem zeitlich enger begrenzten Rahmen, bzw. die Zusammensetzung und Menge der sezernierten Entzündungsmediatoren differiert gegenüber einer chronischen Schädigung, so daß die Umwandlung in Myofibroblasten nicht erfolgt. Diskutiert wird eine gesteigerte Produktion von HGF durch hepatische Sternzellen in der akut geschädigten Leber (SCHIRMACHER ET AL., 1993). Die durchgeführten Untersuchungen mit NIH3T3 Zellen zeigen ebenfalls eine gesteigerte HGF-Expression durch kurzzeitige Einwirkung von Wachstumsregulatoren. Die myofibroblastartige Transdifferenzierung der HSC ist in Kultur ein irreversibler Vorgang der in vergleichbarer Form auch im Verlauf der fibrogenen Reaktion der Leber eine Schlüsselposition einnimmt. Weitergehende Untersuchungen an NIH3T3 Fibroblasten können möglicherweise die biochemischen Grundlagen für den Verlust der HGF-Expression in diesen Zellen klären, und auf diese Weise Anhaltspunkte liefern für die genauen Abläufe, die an der myofibroblastartigen Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen beteiligt sind. Diesbezügliche Studien mit kultivierten HSC sind in ihrer Aussagekraft stark eingeschränkt, da frisch isolierte HSC ohne Serumzusatz nicht kultivierbar sind und damit Versuche im serumfreien Medium nicht möglich wären.

Die humane embryonale Lungenfibroblastenzelllinie FH109 produziert bei Kultivierung mit 10 % fetalem Kälberserum HGF. Eine Serumdepletion führte zu keiner Änderung der HGF-Expression in den Zellen. Eine Stimulierung der HGF-Expression erfolgte durch eine nachfolgende vierstündige Inkubation der Zellen in Serum. Einhergehend damit erfolgte durch Serumzugabe eine Induktion der *c-fos*-Expression, die nach 4 h am stärksten ausgeprägt war. Nach längerer Seruminkubation waren keine *c-fos* Transkripte mehr nachweisbar (Abb. 12). Diese Ergebnisse zeigen, daß ein Serumschock eine Stimulierung der HGF-Expression in den FH109 Fibroblasten bewirkt und im Rahmen dieser Stimulierung eine *c-fos*-Induktion erfolgt. Serum wirkt mitogen und induziert u. a. die Expression des nukleären Phosphoproteins FOS. Die Transkription des *c-fos*-Gens wird über den 'serum response factor' (SRF), der an das 'serum response element' (SRE) im *c-fos*-Promotor bindet, vermittelt (GREENBERG UND ZIFF, 1984). Möglicherweise ist noch ein weiterer Faktor in die Stimulation der HGF-Expression involviert. PEA3/Ets1, ein Transkriptionsfaktor der Ets-Familie, wird u. a. durch Serumfaktoren aktiviert (WASYLYK ET AL., 1989; MIRALLES ET AL., 1998). Die Mitglieder der Ets-Familie besitzen eine hoch konservierte DNA-bindende Domäne, die Ets-Domäne, die spezifisch mit der Kern-Sequenz GGA interagiert. Über 30 Ets verwandte Proteine wurden bisher in vielen Spezies gefunden. Die meisten dieser Proteine haben eine transkriptionsaktivierende Wirkung. Sie binden als Monomere an die DNA, jedoch konnte gezeigt werden, daß die DNA-Bindungsaktivität in Gegenwart von anderen Faktoren verstärkt werden kann. Die Kooperation von Ets mit AP-1 konnte für die Promotoren der Gene für die Kollagenase, den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) sowie für das Gen des Makrophagen 'Scavenger Rezeptors' (SR) gezeigt werden (KRÄMER ET AL., 1995; WU ET AL., 1994). In der 5' flankierenden Region des Ratten-HGF-Gens befinden sich potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor PEA3 an den Positionen -385, -553, -707 und -976 (Abb. 3). Diese Konsensussequenzen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter charakterisiert, sie stellen jedoch mögliche Bindestellen für *trans*-agierende Faktoren nach Serumstimulation dar.

Für die Zelllinien KNRK und Rat2 konnte keine Induktion der HGF-Expression durch Serumdepletion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der bereits beschriebenen Hypothese,

daß Silencersequenzen im 5' Bereich des HGF-Gens gemeinsam mit zelltypspezifischen Repressorproteinen für diese konstitutive Suppression des HGF-Gens verantwortlich sind.

In einer Kultur von aktivierten hepatischen Sternzellen konnte ebenfalls keine HGF-Expression durch Serumdepletion induziert werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der beschriebenen auto-krienen Stimulation dieser Zellen durch TGF β , wodurch in den HSC offenbar eine dauerhafte Suppression der HGF-Expression aufrechterhalten werden kann.

Induzierte Suppression durch TGF β

Es wurde der Einfluß von TGF β auf die HGF-Expression in Fibroblastenzellpopulationen untersucht. Eine starke Suppression der Expression erfolgte nach 4 h TGF β Inkubation, wohingegen eine ein-stündige Inkubation mit TGF β für einen deutlichen Effekt nicht ausreichend war. Nach 12 h Inku-bation waren deutlich weniger Transkripte nachweisbar als im Kontrollansatz, jedoch erfolgte die Suppression schwächer als nach der vierstündigen Inkubation. Diese Ergebnisse stimmen in zwei verschiedenen Fibroblastenzellpopulationen, den NIH3T3 sowie den FH109, gut überein (Abb. 13 und 14). In Abhängigkeit von der TGF β -Stimulierung zeigte sich eine starke Induktion von *c-fos* nach 1 h TGF β Inkubation, die nach 4 bzw. 12 h Inkubation mit TGF β jeweils weniger stark ausgeprägt war (Abb. 14). Eine positive Genregulation durch TGF β wurde bereits für mehrere Gene beschrieben, wie z. B. den murinen TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase gene) und das $\alpha 2(I)$ Kollagen-Gen (CAMPBELL ET AL., 1991; INAGAKI ET AL., 1994). Die dabei involvierten und identifizierten Transkriptionsfaktoren sind AP-1 sowie SP-1. Die transkriptionale Suppression durch TGF β ist wenig verstanden. KERR ET AL. (1990) haben ein TGF β inhibitorisches Element (TIE) beschrieben, das in die negative Regulation des Transin-Gens, das für eine matrixabbauende Metalloprotease codiert, involviert ist. An dieses TIE-Element bindet ein Komplex aus verschiedenen Faktoren. Bekannt ist lediglich, daß FOS für die Bildung des Komplexes notwendig ist. Die durchgeführten Versuche, die eine deutliche Transkriptionssuppression durch TGF β zeigen, weisen auf eine Beteiligung von FOS an der TGF β vermittelten negativen Genregulation hin. Zum einen durch den direkten Nachweis von *c-fos*-Transkripten in TGF β stimulierten Zellen, zum anderen durch den zeitlichen Verlauf der TGF β vermittelten Suppression. *c-fos* gehört zur Gruppe der 'early response genes', so daß eine FOS-vermittelte Transkriptionsregulation der HGF-Expression bereits nach wenigen Stunden zu erwarten ist.

Ausgehend von den beschriebenen Ergebnissen wurden die zwei potentiellen TIE-Elemente, die in der 5' flankierenden Region des Ratten HGF-Gens in sense-Richtung (TIE-1: -422 bis -413) und anti-sense-Richtung (TIE-2: -1116 bis -1107) vorhanden sind, untersucht. Für beide TIE-Elemente konnte eine spezifische Bindung von Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 15 und 16). Die Proteinbindung an das TIE-1 wurde durch TGF β verstärkt, wobei der Effekt erst nach längerer TGF β -Inku-bation deutlich wurde. Eine Stimulierung mit TGF β führte bereits nach einer Stunde zu einer deutlich verstärkten Proteinbindung an das TIE-2 gegenüber der Kontrolle. Ein paralleler Ansatz mit einer AP-1 Konsensussequenz zeigte den gleichen Effekt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß FOS an der Proteinbindung an das TIE-2 beteiligt ist. *c-fos* gehört zur FOS-Familie der Protoonkogene. In unstimulierten Zellen besteht nur eine sehr geringe Expression; bei Stimulation kommt es zu einer schnellen, aber nur kurzzeitigen Expression. FOS heterodimerisiert mit bereits vorliegendem JUN zum AP-1 (activator protein 1), einem Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle als terminal akti-

vierter Transkriptionsfaktor der Signaltransduktion, Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielt. Die Transkription des *c-fos*-Gens wird über das SRE (serum response element) im *c-fos*-Promotor initiiert. Der *c-fos*-Promotor besitzt außerdem zwei AP-1 Bindestellen, die eine negative Autoregulation durch AP-1 vermitteln. Das FOS-Protein wird sehr schnell umgesetzt, so daß AP-1 nach Aktivierung rasch wieder auf Normalkonzentrationen zurückfällt (CURRAN UND FRANZA, 1988; KARIN UND SMEAL, 1992).

TGF β ist ein Wachstumsfaktor mit vielen biologischen Wirkungen, die in die Zellproliferation und Differenzierung vieler Zellpopulationen eingreifen. TGF β stimuliert die Proliferation einer Reihe mesenchymaler Zelltypen, aber es wirkt gleichzeitig auch als Wachstumsinhibitor vieler anderer Zellen, einschließlich Epithelzellen. Ferner induziert TGF β die Synthese von extrazellulärer Matrix, es moduliert die Expression von Matrixproteasen und Proteaseinhibitoren und erhöht die Integrinexpression wodurch die Zelladhäsion verstärkt wird. TGF β hat Einfluß auf die mesenchymale Differenzierung und ist ein sehr potentes chemotaktisches Agens für viele Zellpopulationen, besonders Monozyten und Fibroblasten (ROBERTS UND SPORN, 1990). Während der Leberregeneration wirkt TGF β als Effektor eines parakrinen inhibitorischen Mechanismus, indem es die Proliferation der Hepatozyten hemmt. *In vitro* inhibiert TGF β die Hepatozytenproliferation, indem es die EGF induzierte DNA-Synthese inhibiert (BRAUN ET AL., 1988). TGF β inhibiert die EGF induzierte Expression des Transin-Gens auf der Ebene der Transkription, wobei das TGF β inhibitorische Element und ein daran bindender Proteinkomplex, der u. a. das FOS-Protein enthält, die Suppression vermittelt. Sowohl die EGF induzierte Stimulation der Transin-Genexpression als auch die TGF β vermittelte Suppression der Transin-Genexpression korreliert mit einer Induktion des *c-fos*-Gens (KERR ET AL., 1990; MATRISIAN ET AL., 1992). Der mitogene Effekt von TGF β auf das Zellwachstum von Osteoblasten wird ebenfalls durch Induktion des *c-fos*-Gens vermittelt (MACHWATE ET AL., 1995). Die TGF β -Stimulation initiiert somit eine Kaskade von Vorgängen, die zu einem spezifischen Genexpressionsmuster führt: die direkte Stimulation von early-response Genen kann zu nachfolgender Induktion oder Repression anderer Gene führen (MATRISIAN ET AL., 1992). Übereinstimmend mit den beschriebenen Untersuchungen konnte die Beteiligung von FOS an der TGF β vermittelten transkriptionellen Suppression des HGF-Gens gezeigt werden.

TGF β ist ein fibrogener Faktor bei chronischen Organschädigungen insbesondere der Leber, indem er die Synthese der extrazellulären Matrix stimuliert (WEINER ET AL., 1993). Als physiologischer Gegenspieler des TGF β fungiert vermutlich der Hepatocyte Growth Factor, der in der gesunden Leber von den hepatischen Sternzellen gebildet wird und ein potentes Mitogen für Hepatozyten ist und hierdurch die Leberregeneration stimuliert. Diese Sternzellen werden während eines fibrogenen Prozesses der Leber aktiviert und zu myofibroblastartigen Zellen umgewandelt, die verstärkt Matrixproteine wie verschiedene Kollagene, Laminin, Fibronectin sowie Proteoglykane synthetisieren und somit eine Schlüsselposition bei der Entstehung einer Fibrose einnehmen (GRESSNER UND BACHEM, 1990; CASINI ET AL., 1993; MAHER ET AL., 1988; WEINER ET AL., 1990). Die Myofibroblasten der zirrhotischen Leber sezernieren außerdem durch autokrine Aktivierung erhöhte Mengen TGF β (WEINER ET AL., 1989). *In vitro* verhalten sich isolierte HSC ähnlich wie in der fibrotischen Leber. Sie wandeln sich in myofibroblastartige Zellen um, die kein HGF mehr produzieren (SCHIRMACHER ET AL., 1992). Da HSC in Kultur TGF β sezernieren und gleichzeitig auch durch TGF β fibro- und mitogen stimuliert werden, liegt die Hypothese nahe, daß durch TGF β in den Zellen nicht nur ein positiv TGF β -regulatorischer

autokriner Kreislauf induziert wird, sondern hierdurch auch eine autokrine Suppression der HGF-Expression erfolgt.

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgt vermutlich auch in den Myofibroblasten *in vivo* eine TGF β vermittelte Suppression der HGF-Expression. Somit kann TGF β nicht nur direkt durch Proliferationshemmung der Hepatozyten sowie Stimulation der Matrixsynthese zur fibrogenetischen Reaktion beitragen, sondern auch indirekt über die Suppression der HGF-Produktion, das mitogen auf die Hepatozyten wirkt. Die Myofibroblasten stellen außerdem eine dauerhafte Quelle für die TGF β -Produktion sowie die Synthese von Matrixkomponenten dar (Abb. 20).

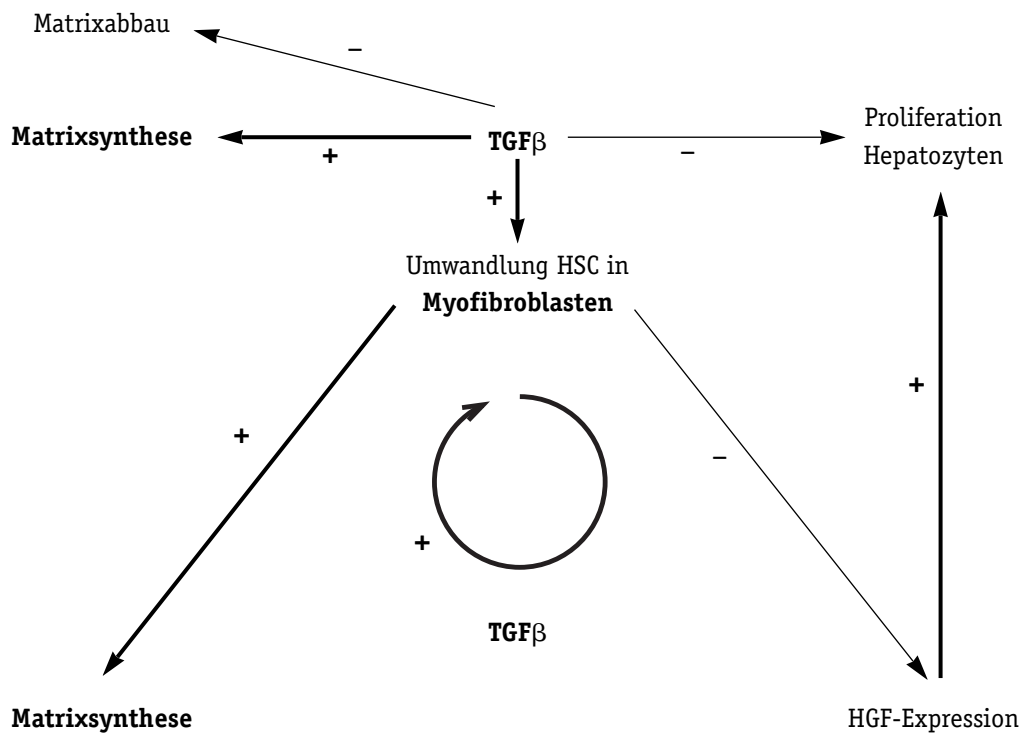


Abb.20: Direkte und indirekte Wirkungen von TGF β als fibrogener Mediator

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist involviert in die Vorgänge der induzierten Suppression durch TGF β bzw. Serum

Mobility Shift-Assays haben gezeigt, daß die Bindung von Proteinen aus Kernextrakten der NIH3T3 an eine AP-1 Konsensussequenz in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der Zellen in serumhaltigem Medium erfolgt. So bewirkte die serumfreie Kultivierung eine Abnahme der Proteinbindungen gegenüber der langfristigen serumhaltigen Kultivierung sowie einem einstündigen Serumstimulus (Abb. 8). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß AP-1 sowohl an der Stimulation als auch an der Suppression der HGF-Expression durch Serumfaktoren in den NIH3T3 Zellen beteiligt ist. Die Inkubation der NIH3T3 mit TGF β führte zu einer verstärkten Proteinbindung an die AP-1 Konsensussequenz (Abb. 8). Dieses Ergebnis zeigt wiederum, daß AP-1 bzw. *c-fos* auch an der Suppression der HGF-Expression durch TGF β in diesen Zellen maßgeblich beteiligt sein kann.

Im Gegensatz dazu führte eine kurze Stimulation der FH109 Zellen mit Serum sowie mit TGF β zu einer verstärkten *c-fos*-Expression, die jedoch langfristig abnahm bzw. völlig verschwand (Abb. 12 und 14). Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen einer Suppression der HGF-Expression und der andauernden Expression des AP-1 Proteins, daß aus FOS und JUN, oder auch als Homodimer nur aus JUN-Proteinen besteht, hin. Die permanente Expression dieses Transkriptionsfaktors in NIH3T3-Zellen erfolgt möglicherweise durch eine autokrine Stimulation in diesen Zellen. Der TGF β 1-Promotor enthält zwei AP-1 Bindestellen, so daß eine Induktion des TGF β 1-Promotors durch AP-1 erfolgt (KIM ET AL., 1990). Die autoregulatorische TGF β -Stimulation wurde bereits beschrieben (LAFYATIS ET AL., 1990). Der permanent hohe AP-1 Level in den NIH3T3 ist somit durch direkte Stimulation durch TGF β sowie durch indirekte Stimulation durch Serumfaktoren, die über die AP-1-Induktion eine Stimulation des TGF β -Promotors und damit die Expression von TGF β bewirken, zu erklären. DERYNCK (1994) vertritt die Hypothese, daß die Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie z. B. PDGF, für die wachstumsstimulierende Wirkung von TGF β auf Fibroblasten und andere mesenchymale Zellen eine größere Bedeutung hat als die direkte TGF β -Rezeptor-Signaltransduktion. Die Verknüpfung der Signaltransduktionswege von TGF β und anderen Wachstumsfaktoren ist möglicherweise auch für die initialen Vorgänge bei der Aktivierung der hepatischen Sternzellen in der chronisch geschädigten Leber sowie *in vitro* durch Serumfaktoren verantwortlich.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, daß das Ratten-HGF-Gen in signifikantem Ausmaß negativ reguliert wird. Die zelltypspezifische konstitutive Suppression in epithelialen Zellen sowie in einer Reihe von Fibroblasten Zelllinien ist vermutlich durch eine oder mehrere Silencersequenzen im 5' Bereich des HGF-Gens zu erklären. Die induzierte Suppression durch TGF β wird über die *cis*-agierenden Sequenzen TIE-1 und TIE-2 vermittelt (Abb. 21). Die Suppression durch Serumfaktoren nach längerer Inkubation ist ein bisher unverstandener Vorgang, der jedoch bei weiterer Charakterisierung wertvolle Informationen über die *in vivo* Abläufe der HGF-Suppression liefern kann.

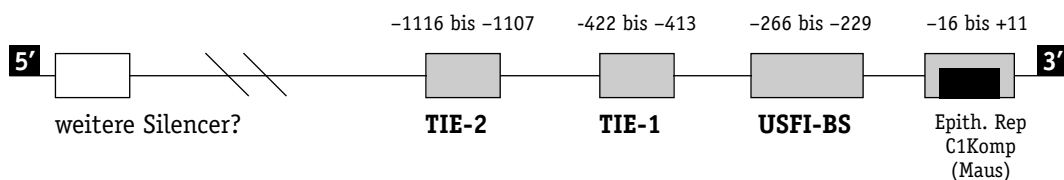


Abb. 21: *Negativ regulierte Sequenzen im HGF-Promotor/Enhancer*

6. ZUSAMMENFASSUNG

HGF ist ein multifunktionelles Zytokin, das in der normalen Leber ausschließlich von den hepatischen Sternzellen gebildet wird. Seine biologische Funktion in der Leber umfaßt v.a. die homöostatische Kontrolle der Leberzellproliferation. Die Umwandlung der Sternzellen in proliferierende Myofibroblasten in der chronisch erkrankten Leber geht einher mit dem Verlust der HGF-Expression, wodurch ein genaueres Verständnis der HGF-Genregulation von großer Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der HGF-Promotor der Ratte kloniert und nachfolgend charakterisiert. Zunächst wurden Transfektionsstudien durchgeführt und es erfolgten Stimulierungsversuche an verschiedenen Zelllinien bzw. Primärzellen, die nachfolgend auf ihre HGF- bzw. *c-fos*-Expression untersucht wurden. Für die Charakterisierung und Identifizierung von Promotorsequenzen, die für die Regulation der HGF-Transkription von Bedeutung sind, wurden schließlich Mobility Shift- sowie Footprint-Analysen durchgeführt.

Die Transfektionsanalysen ermittelten eine 'basale' Promotoraktivität für die ersten 70 bp des HGF-Promotors. Im weiteren 5' liegenden Bereich, -266 bis -229, konnte eine Sequenz mittels Footprint-Analyse identifiziert werden, an die vermutlich zelltypspezifische Repressorproteine binden.

Mobility Shift-Analysen ermittelten für die 'basale' Promotorsequenz DNA-Protein-Wechselwirkungen, die auf bisher unbekannte Transkriptionsfaktoren hinweisen.

Die Mobility Shift-Analyse des TRE aus dem HGF-Promotor konnte keine bindenden Proteine an die Sequenz nachweisen. AP-1 ist jedoch in die Suppression des HGF-Gens involviert.

Serumfaktoren induzierten eine kurzzeitige, vermutlich *c-fos* vermittelte verstärkte HGF-Expression in FH109 Zellen.

Ferner bewirkten sie eine reversible Suppression des HGF-Gens in der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 durch langfristige Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Kulturmedium. Ein kurzer Stimulus mit Serumfaktoren bewirkte eine verstärkte Expression von HGF, die vermutlich ebenfalls mit einer Induktion von *c-fos* einhergeht.

TGF β induzierte eine Suppression des HGF-Gens, die zum Teil *c-fos* vermittelt erfolgte. Für das TIE-2 aus dem HGF-Promotor konnte eine Bindung von FOS nach TGF β -Stimulation nachgewiesen werden. An das TIE-1 aus dem HGF-Promotor banden spezifische, noch nicht identifizierte Proteine, die durch TGF β -Inkubation der Zellen verstärkt wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Transkription des HGF-Gens in großem Umfang negativ reguliert wird. Dabei erfolgt einerseits eine konstitutive Suppression durch zelltypspezifische Repressorproteine, die an eine oder mehrere Silencerregionen im Promotor/Enhancer des HGF-Gens binden. Andererseits kann eine Suppression der HGF-Expression durch TGF β induziert werden, die über die *cis*-agierenden Sequenzen TIE-1 und TIE-2 vermittelt wird. Ferner können serogene Faktoren eine Suppression induzieren. Das Protein FOS bzw. der Transkriptionsfaktor AP-1 sind vermutlich in die Vorgänge der induzierten Suppression involviert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- AARONSON S. A. AND WEAVER C. A. (1971):** Characterization of murine sarcoma virus (Kirsten) transformation of mouse and human cells.
J. Gen. Virol. **13**, 245-252.
- ALWINE J. C., KEMP D. J., STARK G. R. (1977):** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5350-5354.
- ANDERSON P., GOLDFARB M. P., WEINBERG R. A. (1979):** A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection.
Cell **16**, 63-75.
- ARAVAMUDAN B., WATABE M., WATABE K. (1993):** Characterization of the 5'-flanking region of the hepatocyte growth factor gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **195**, 346-353.
- BACHEM M. G., MEYER D., MELCHIOR R., SELL K. M., GRESSNER A. M. (1992):** Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblast-like cells – a potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis.
J. Clin. Invest. **89**, 19-27.
- BACHEM M. G., MEYER D., SCHAFER W., RIESS U., MELCHIOR R., SELL K. M., GRESSNER A. M. (1993 A):** The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regulator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture.
J. Hepatol. **18**, 40-52.
- BACHEM M. G., SELL K. M., MELCHIOR R., KROPF J., ELLER T., GRESSNER A. M. (1993 B):** Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts.
Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. **63**, 123-30.
- BELL A. W., JIANG J. G., CHEN Q., LIU Y., ZARNEGAR R. (1998):** The Upstream Regulatory Regions of the Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter Are Essential for its Expression in Transgenic Mice.
J. Biol. Chem. **273**, 6900-6908.
- BIRNBOIM H. C. AND DOLY J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1517.

- BLANK R. S., McQUINN T. C., YIN K. C., THOMPSON M. M., TAKEYASU K., SCHWARTZ R. J., OWENS G. K. (1992):** Elements of the smooth muscle alpha-actin promoter required in cis for transcriptional activation in smooth muscle. Evidence for cell type-specific regulation. *J. Biol. Chem.* **267**, 984–989.
- BLOCK G. D., LOCKER J., BOWEN W. C., PETERSEN B. E., KATYAL S., STROM S. C., RILEY T., HOWARD T. A., MICHALOPOULOS G. K. (1996):** Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J. Cell Biol.* **132**, 1133–1149.
- BOTTARO D. P., RUBIN J. S., FALETTO D. L., CHAN A. M.-L., KMIECIK T. E., VANDE WOUDE G. F., AARONSON S. A. (1991):** Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science* **251**, 802–804.
- BRAUN L., MEAD J. E., PANZICA M., MIKUMO R., BELL G. I., FAUSTO N. (1988):** Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: A possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1539–1543.
- BUSSOLINO F., DI RENZO M. F., ZICHE M., BOCCHIETTO E., OLIVERO M., NALDINI L., GAUDINO G., TAMAGNONE L., COFFER A., COMOGLIO P. M. (1992):** Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* **119**, 629–641.
- CAMPBELL, C. E., FLENNIKEN A. M., SKUP D., WILLIAMS B. R. G. (1991):** Identification of a serum- and phorbol ester-responsive element in the murine tissue inhibitor of metalloproteinase gene. *J. Biol.Chem.* **266**, 7199–7206.
- CARR B. I., HAYASHI I., BRANUM E. L., MOSES H. L. (1986):** Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type transforming growth factor. *Cancer Res.* **46**, 2330–2334.
- CASINI A., PINZANI M., MILANI S., GRAPPONE C., GALLI G., JEZEQUEL A. M., SCHUPPAN D., ROTELLA C. M., SURRENTI C. (1993):** Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor β 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterol.* **105**, 245–253.
- CHAN A. M.-L., RUBIN J. S., BOTTARO D. P., HIRSCHFELD D. W., CHEDID M., AARONSON S. A. (1991):** Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science* **254**, 1382–1385.

- CHIRGWIN J. M., PRZYBYLA A. E., MACDONALD R. J., RUTTER W. J. (1979):** Isolation of biologically active ribonucleic acid from source enriched in ribonuclease.
Biochemistry **18**, 5294–5299.
- CLAEYS H., SOTTRUP-JENSEN L., ZADJEL M., PETERSON T. E., MAGNUSSEN S. (1976):** Multiple gene duplication in the evolution of plasminogen. Five regions of sequence homology with the two internally homologous structures in prothrombin.
FEBS Lett. **61**, 20–24.
- CURRAN AND FRANZA (1988):** Fos and Jun: The AP-1 connection.
Cell **55**, 395–397.
- DERYNCK R. (1994):** The Cytokine Handbook (Thompson A., ed.)
Academic Press, 319–342.
- DIGNAM J. D., LEBOWITZ R. M., ROEDER R. G. (1983):** Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.
Nucl. Acids Res. **11(5)**, 1475–1489.
- EPHRUSSI A., CHURCH G. M., TONEGAWA S., GILBERT W. (1985):** B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo.
Science **227**, 134–40.
- FAISST S. AND MEYER S. (1992):** Compilation of vertebrate-encoded transcription factors.
Nucleic Acids Res. **20**, 3–26.
- FEINBERG A. P. AND VOGELSTEIN B. (1983):** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132**, 6–13.
- FISHER D. E., CARR C. S., PARENT L. A., SHARP P. A. (1991):** TFEB has DNA-binding and oligomerization properties of a unique helix-loop-helix/leucine-zipper family.
Genes Dev. **5**, 2342–2352.
- FLANDERS K. C. (1992):** Transforming growth factor- β and the fibrotic response.
Marburg Symposium, 241–254.
- GEERTS A., VRIJSEN R., RAUTERBERG J., BURT A., SCHELLINCK P., WISSE E. (1989):** Differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion.
J. Hepatol. **9**, 59–68.
- GHERARDI E., GRAY J., STOKER M., PERRYMAN M., FURLONG R. (1989):** Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 5844–5848.

- GHERARDI E. AND STOKER M. (1990):** Hepatocytes and scatter factor.
Nature **346**, 228.
- GIORDANO S., PONZETTO C., DI RENZO M. F., COOPER C. S., COMOGLIO P. M. (1989):** Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the *c-met* protein.
Nature **339**, 155–156.
- GOHDA E., TSUBOUCHI H., NAKAYAMA H., HIRONO S., SAKIYAMA O., TAKAHASHI K., MIYAZAWA H., HASHIMOTO S., DAIKUHARA Y. (1988):** Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure.
J. Clin. Invest. **81**, 414–419.
- GREENBERG M. E. AND ZIFF E. B. (1984):** Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene.
Nature **311**, 433–438.
- GREGOR P. D., SAWADOGO M., ROEDER R. G. (1990):** The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a Dimer.
Genes Dev. **4**, 1730–1740.
- GRESSNER A. M. AND BACHEM M. G. (1990):** Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: Role of fat-storing cells in fibrogenesis.
Sem. In liver disease **10**, 30–46.
- HENDRIKS H., VERHOOFSTAD W., BROUWER A., DE LEEUW A., KNOOK D. L. (1985):** Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage site in the liver.
Exp. Cell. Res. **160**, 138–149.
- HIGASHIO K., SHIMA N., GOTO M., ITAGAKI Y., NAGAO M., YASUDA H., MORINAGA T. (1990):** Identity of a tumor cytotoxic factor from human fibroblasts and hepatocyte growth factor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **170**, 397–404.
- INAGAKI Y., TRUTER S., RAMIREZ F. (1994):** Transforming growth factor- β stimulates $\alpha 2(I)$ collagen gene expression through a cis-acting element that contains an SP1-binding site.
J. Biol. Chem. **269**, 14828–14834.
- JIANG J. G., BELL A., ZARNEGAR R. (1997A):** Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor gene by the nuclear receptors chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor and estrogen receptor.
J. Biol. Chem. **272**, 3928–3934.
- JIANG J. G., CHEN Q., BELL A., ZARNEGAR R. (1997B):** Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors.
Oncogene **14**, 3039–3049.

- JIANG J. G. AND ZARNEGAR R. (1997 c):** A novel transcriptional regulatory region within the core promoter of the hepatocyte growth factor gene is responsible for its inducibility by cytokines via the C/EBP family of transcription factors.
Mol. Cell. Biol. **17**, 5758–5770.
- JUNG W., CASTREN E., ODENTHAL M., VANDE WOUDE G. F., ISHII T., DIENES H. P., LINDHOLM D., SCHIRMACHER P. (1994):** Expression and functional interaction of Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and its receptor *c-met* in mammalian brain.
J. Cell. Biol. **126**, 485–494.
- KAN M., ZHANG G. H., ZARNEGAR R., MICHALOPOULOS G. K., MYOKEN Y., MCKEEHAN W. L., STEVENS J. (1991):** Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A stimulates the growth of rat kidney proximal tubule epithelial cells (RPTE), rat nonparenchymal liver cells, human melanoma cells, mouse keratinocytes and stimulates anchorage-independent growth of SV-40 transformed RPTE.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **174**, 331–337.
- KARIN AND SMEAL (1992):** Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end.
TIBS **17**, 418–422.
- KERR L. D., MILLER D. B., MATRISIAN L. M. (1990):** TGF- β 1 Inhibition of Transin/Stromelysin Gene Expression Is Mediated through a Fos Binding Sequence.
Cell **61**, 267–278.
- KIM S. J., JEANG K. T., GLICK A. B., SPORN B. M., ROBERTS A. B. (1989 A):** 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.
- KIM S. J., DENHEZ F., KIM K. Y., HOLT J. T., SPORN B. M., ROBERTS A. B. (1989 B):** Activation of the Second Promoter of the Transforming Growth Factor- β 1 Gene by Transforming Growth Factor- β 1 and Phorbol Ester occurs through the same Target Sequences.
J. Biol. Chem. **264**, 19373–19378.
- KINOSHITA T., TASHIRO K., NAKAMURA T. (1989):** Marked increase of HGF mRNA in non-parenchymal liver cells of rats treated with hepatotoxins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **165**, 1229–1234.
- KINOSHITA T., HIRAO S., MATSUMOTO K., NAKAMURA T. (1991):** Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **177**, 330–335.

- KOEFFLER H. P., GOLDE D. W. (1978):** Acute Myelogenous Leukemia: A Human Cell Line Responsive to Colony-Stimulating Activity.
Science **200**, 1153–1154.
- KRÄMER B., WIEGMANN K., KRÖNKE M. (1995):** Regulation of the Human TNF Promoter by the Transcription Factor Ets.
J. Biol. Chem. **270**, 6577–6583.
- LINDROOS P. M., ZARNEGAR R., MICHALOPOULOS G. K. (1991):** Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration.
Hepatology **13**, 743–750.
- LIU Y., MICHALOPOULOS G. K., ZARNEGAR R. (1994 A):** Struktural and Functional Characterization of the Mouse Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter.
J. Biol. Chem. **269**, 4152–4160.
- LIU Y., BEEDLE A. B., LIN L., BELL A. W., ZARNEGAR R. (1994 B):** Identification of a Cell-Type-Specific Transcriptional Repressor in the Promoter Region of the Mouse Hepatocyte Growth Factor Gene.
Mol. Cell. Biol. **14**, 7046–7058.
- MACHWATE M., JULLIENNE A., MOUKHTAR M., LOMRI A., MARIE P. J. (1995):** *c-fos* protooncogene is involved in the mitogenic effect of transforming growth factor-beta in osteoblastic cells.
Mol. Endocrinol. **9**, 187–198.
- MAHER J. J., FRIEDMAN S. L., ROLL F. J., BISSEL D. M. (1988):** Immunolocalization of laminin in normal rat liver and biosynthesis of laminin by hepatic lipocytes in primary culture.
Gastroenterology **94**: 1053–1062.
- MAHER J. J. (1993):** Cell-specific Expression of Hepatocyte Growth Factor in Liver.
J. Clin. Invest. **91**, 2244–2252.
- MALINOWSKI D. P., SADLER J. E., DAVIE E. W. (1984):** Characterization of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human and bovine plasminogen.
Biochemistry **23**, 4243–4250.
- MASUMOTO A. AND YAMAMOTO N. (1991):** Sequestration of a hepatocyte growth factor in extracellular matrix in normal adult rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **174**, 90–95.
- MATRISIAN L. M., GANSER G. L., KERR L. D., PELTON R. W., WOOD L. D. (1992):** Negative regulation of gene expression by TGF-beta.
Mol. Reprod. Dev. **32**, 111–120.

- MATSUMOTO K., TAJIMA H., NAKAMURA T. (1991A):** Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **176**, 45–51.
- Matsumoto K., Hashimoto K., Yoshikawa K., Nakamura T. (1991 b):** Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor.
Exp. Cell Res. **196**, 114–120.
- MATSUMOTO K., OKAZAKI H., NAKAMURA T. (1992 A):** Up-Regulation of Hepatocyte Growth Factor Gene Expression by Interleukin-1 in Human Skin Fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **188**, 235–243.
- MATSUMOTO K., TAJIMA H., OKAZAKI H., NAKAMURA T. (1992 B):** Negative Regulation of Hepatocyte Growth Factor Gene Expression in Human Lung Fibroblasts and Leukemic Cells by Transforming Growth Factor- β 1 and Glucocorticoids.
J. Biol. Chem. **267**, 24917–24920.
- MAXAM A. M. AND GILBERT W. (1980):** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
Meth. Enzymol. **65**, 499–560.
- MCCARTNEY-FRANCIS N., MIZEL D., WONG H., WAHL L., WAHL S. (1988):** Transforming growth factor-beta (TGF β) as an immunoregulatory molecule.
FASEB J. **2**, A:875
- MICHALOPOULOS G. K., HOUCK K. A., DOLAN M. L., LUETTEKE N. C. (1984):** Control of Hepatocyte Replication by Two Serum Factors.
Cancer Res. **44**, 4414–4419.
- MICHALOPOULOS G. K. AND ZARNEGAR R. (1992):** Hepatocyte Growth Factor.
Hepatology **15**, 149–155.
- MIRALLES F., RON D., BAIGET M., FELEZ J., MUNOZ-CANOVES P. (1998):** Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by basic fibroblast growth factor and serum in myogenesis. Requirement of a common mitogen-activated protein kinase pathway.
J. Biol. Chem. **273**, 2052–2058.
- MIYAZAWA K., KITAMURA A., KITAMURA N. (1991 A):** Structural Organization and the Transcription Initiation Site of the Human Hepatocyte Growth Factor Gene.
Biochemistry **30**, 9170–9176.
- MIYAZAWA K., KITAMURA A., NAKA D., KITAMURA N. (1991 B):** An alternatively processed mRNA generated from human hepatocyte growth factor gene.
Eur. J. Biochem. **197**, 15–22.

- MIYAZAWA K., SHIMOMURA T., NAKA D., KITAMURA N. (1994):** Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury.
J. Biol. Chem. **269**, 8966–8970.
- MONTESANO R., MATSUMOTO K., NAKAMURA T., ORCI L. (1991):** Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor.
Cell **67**, 901–908.
- NAKAMURA T., NAWA K., ICHIHARA A. (1984):** Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **122**, 1450–1459.
- NAKAMURA T., NAWA K., ICHIHARA A., KAISE A., NISHINO T. (1987):** Subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets.
FEBS Lett. **224**, 311–318.
- NAKAMURA T., NISHIZAWA T., HAGIYA M., SEKI T., SHIMONISHI M., SUGIMURA A., TASHIRO K., SHIMIZU S. (1989):** Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor.
Nature **342**, 440–443.
- NALDINI L., WEIDNER K. M., VIGNA E., GAUDINO G., BARDELLI A., PONZETTO C., NARSIMHAN R. P., HARTMANN G., ZARNEGAR R., MICHALOPOULOS G. K., BIRCHMEIER W., COMOGLIO P. M. (1991):** Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor.
EMBO J. **10**, 2867–2878.
- NISHINO T., KAISE N., SINDO Y., NISHINO N., NISHIDA T., YASUDA S., MASUI Y. (1991):** Promyelocytic leukemia cell line, HL-60, produces human hepatocyte growth factor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **181**, 323–330.
- NOJI S., TASHIRO K., KOYAMA E., NOHNO T., OHYAMA K., TANIGUCHI S., NAKAMURA T. (1990):** Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by in situ hybridization.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **173**, 42–47.
- NY T., ELGH F., LUND B. (1984):** The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structure to functional and structural domains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 5355–5359.
- OKAJIMA A., MIYAZAWA K., KITAMURA N. (1993):** Characterization of the promoter region of the rat hepatocyte-growth-factor/scatter-factor gene.
Eur. J. Biochem. **213**, 113–119.
- PARK M., DEAN M., KAUL K., BRAUN M. J., GONDA M. A., VANDE WOUDE G. F. (1987):** Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine family of growth-factor receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6379–6383.

- PATTHY L. (1985):** Evolution of proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules.
Cell **41**, 657–663.
- PLASCHKE-SCHLÜTER A., BEHRENS J., GHERARDI E., BIRCHMEIER W. (1995):** Characterization of the Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter.
J. Biol. Chem. **270**, 830–836.
- PRAT M., CREPALDI T., GANDINO L., GIOLANO S., LONGATI P., COMOGLIO P. M. (1991):** C-terminal truncated forms of Met, the Hepatocyte Growth Factor receptor.
Mol. Cell. Biol. **11**, 5954–5962.
- RAGHOW R., POSTLETHWAITE A. E., KESKI-OJA J., MOSES H. L., KANG A. H. (1987):** Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts.
J. Clin. Invest. **79**, 1285–1288.
- RAMADORI G., NEUBAUER K., ODENTHAL M., NAKAMURA T., KNITTEL T., SCHWÖGLER S., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE K.-H. (1992):** The Gene of Hepatocyte Growth Factor is expressed in Fat-Storing Cells of Rat Liver and is downregulated during Cell Growth and by Transforming Growth Factor- β .
Biochem. Biophys. Res. Commun. **183**, 739–742.
- ROBERTS A. B. AND SPORN M. B. (1990):** The transforming growth factor-betas.
Handbook of experimental pharmacology (Roberts and Sporn, eds.), Springer Verlag, **95**, 419–472.
- ROSEN E. M., GOLDBERG I. D., KACINSKI B. M., BUCKHOLZ T., VINTER D. W. (1989):** Smooth muscle releases an epithelial cell scatter factor which binds to heparin.
In Vitro Cell. Dev. Biol. **25**, 163–173.
- ROSSI P., KARSENTY G., ROBERTS A. B., ROCHE N. S., SPORN M. B., DE CROMBRUGGHE B. A. (1988):** Nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor- β .
Cell **52**, 405–414.
- RUBIN J. S., CHAN A. M.-L., BOTTARO D. P., BURGESS W. H., TAYLOR W. G., CECH A. C., HIRSCHFELD D. W., WONG J., MIKI T., FINCH P. W., AARONSON S. A. (1991):** A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 415–419.
- RUSSELL W. E., COFFEY R. J., OUELLETTE A. J., MOSES H. L. (1988):** Type β transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 5126–5130.

- SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN G. T., ERLICH H. A., ARNHEIM N. (1985):** Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230**, 1350–1354.
- SAIKI R. K., GELFRAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science **239**, 487–491.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. (1989):** Molecular cloning, a laboratory manual (2nd Ed).
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SANGER F. (1981):** Determination of nucleotide sequences in DNA.
Science **214**, 1205–1210.
- SCHIRMACHER P., GEERTS A., PIETRANGELO A., DIENES H. P., ROGLER C. E. (1992):** Hepatocyte Growth Factor/Hepatopoietin A is Expressed in Fat-storing Cells from Rat Liver But Not Myofibroblast-like Cells Derived from Fat-storing Cells.
Hepatology **15**, 5–11.
- SCHIRMACHER P., GEERTS A., JUNG W., PIETRANGELO A., ROGLER C. E., DIENES H. P. (1993):** The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver.
In: **GOLDBERG I. D., ROSEN E. M. (1993):** Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGF-SF) and the c-Met Receptor.
Birkhäuser Verlag, Basel (285–299).
- SCHMIDT C., BLADT F., GOEDECKE S., BRINKMANN V., ZSCHIESCHE W., SHARPE M., GHERARDI E., BIRCHMEIER C. (1995):** Scatter Factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development.
Nature **373**, 699–702.
- SELDEN C., JONES M., WADE D., HODGSON H. (1990):** Hepatotropin mRNA expression in human foetal liver development and in liver regeneration.
FEBS Lett. **270**, 81–84.
- SHIMA N., NAGAYA M., OGAKI F., TSUDA E., MURAKAMI A., HIGASHIO K. (1991):** Tumor Cytotoxic Factor/Hepatocyte Growth Factor From Human Fibroblasts: Cloning Of Its cDNA, Purification And Characterization Of Recombinant Protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **180**, 1151–1158.
- SHIOTA G., RHOADS D. B., WANG T. C., NAKAMURA T., SCHMIDT E. V. (1992):** Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 373–377.

- SONNENBERG E., MEYER D., WEIDENER K. M., BIRCHMEIER C. (1993):** Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor, the c-met Tyrosine Kinase, Can Mediate a Signal Exchange between Mesenchyme and Epithelia during Mouse Development.
J. Cell Biol. **123**, 223–235.
- STOKER M., GHERARDI E., PERRYMAN M., GRAY J. (1987):** Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility.
Nature **327**, 239–242.
- STOKER M. (1989):** Effects of Scatter Factor on Motility of Epithelial Cells and Fibroblasts.
J. Cell. Physiol. **139**, 565–569.
- TAJIMA H., MATSUMOTO K., NAKAMURA T. (1992 A):** Regulation of Cell Growth and Motility by Hepatocyte Growth factor and Receptor Expression in Various Cell Spezies.
Exp. Cell Res. **202**, 423–431.
- TAJIMA H., HIGUCHI O., MIZUNO K., NAKAMURA T. (1992 B):** Tissue distribution of hepatocyte growth factor receptor and its exclusive downregulation in a regenerating organ after injury.
J. Biochem. **111**, 401–406.
- TAMURA M., ARAKAKI N., TSUBOUCHI H., TAKADA H., DAIKUHARA Y (1993):** Enhancement of Human Hepatocyte Growth Factor Production by Interleukin-1 α and -1 β and Tumor Necrosis Factor- α by Fibroblasts in Culture.
J. Biol. Chem. **268**, 8140–8145.
- THALER J. AND MICHALOPOULOS G. K. (1985):** Hepatopoietin A: partial characterization and trypsin activation of a hepatocyte growth factor.
Cancer Res. **45**, 2545–2549.
- TOPP W. C. (1981):** Normal Rat Cell Lines Deficient in Nuclear Thymidine Kinase.
Virology **113**, 408–411.
- VOGELSTEIN A. AND GILLESPIE D. (1979):** Elution of DNA from Agarose gels-glass beads/NaJ method.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 615–619.
- WAHL S. M., HUNT D. A., WAKEFIELD L. M., MC CARTNEY-FRANCIS N., WAHL L. M., ROBERTS A. B., SPORN M. B. (1987):** Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces monocyte chemotaxis and growth factor production.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 5788–5792.
- WAKE K. (1971):** Sternzellen in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A.
Am. J. Anat. **132**, 429–462.

- WASYLYK C., FLORES P., GUTMAN A., WASYLYK B. (1989):** PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes.
EMBO J **8**, 3371–3378.
- WEIDNER K. M., BEHRENS J., VANDEKERCKHOVE J., BIRCHMEIER W. (1990):** Scatter Factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells.
J. Cell. Biol. **111**, 2097–2108.
- WEIDNER K. M., ARAKAKI N., HARTMANN G., VANDEKERCKHOVE J., WEINGART S., RIEDER H., FONATSCH C., TSUBOUCHI H., HISHIDA D., DAIKUCHARA Y., BIRCHMEIER W. (1991):** Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 7001–7005.
- WEIDNER K. M., SACHS M., BIRCHMEIER W. (1993):** The Met Receptor Tyrosine Kinase Transduces Motility, Proliferation, and Morphogenic Signals of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor in Epithelial Cells.
J. Cell Biol. **121**, 145–154.
- WEINER F. R., SHAH A., BIEMPICA L., ZERN M. A., CZAYA M. J. (1989):** Cellular sources of increased collagen and transforming growth factor β 1 gene expression in fibrotic rat liver.
Hepatology **10**, 629.
- WEINER F. R., GIAMBRONE M. A., CZAYA M. J., SHAH A., ANNONI G., TAKAHASHI S., EGHBALI M., ZERN M. A. (1990):** Ito-cell gene expression and collagen regulation.
Hepatology **11**, 111–117.
- WEINER F. R., ESPOSTI S. D., ZERN M. A. (1993):** A role for cytokines as regulators of hepatic fibrogenesis.
Gastroenterol. Jpn. **28** (Suppl. 4), 97–101.
- WIESER, R. J., HECK R., OESCH F. (1985):** Involvement of plasmamembrane glycoproteins in the contactdependent inhibition of growth of human fibroblasts.
Exp. Cell. Res. **158**, 493–499.
- WORKMAN J. L. AND BUCHMAN A. R. (1993):** Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription.
TIBS **18**, 90–95.
- WU H., MOULTON K., HORVAL A., PARIK S., GLASS C. K. (1994):** Combinatorial Interactions between AP-1 and ets Domain Proteins Contribute to the Developmental Regulation of the Macrophage Scavenger Receptor Gene.
Mol. Cell. Biol. **14**, 2129–2139.
- ZARNEGAR R. AND MICHALOPOULOS G. K. (1989):** Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes.
Cancer Res. **49**, 3314–3320.

ZARNEGAR R., DE FRANCES M. C., KOST D. P., LINDROOS P., MICHALOPOULOS G. K. (1991): Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 559–565.

ZARNEGAR R., PETERSEN B., DE FRANCES M. C., MICHALOPOULOS G. K. (1992): Localization of the hepatocyte growth factor (HGF) gene on human chromosome 7. *Genomics* **12**, 147–150.