

KfK 5020
März 1992

**Synergismus des epidermalen
Wachstumsfaktors (EGF)
und des Steroidhormons
Progesteron bei der Aktivierung
progesteronregulierter Gene**

S. Krusekopf
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5020

**Synergismus
des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF)
und des Steroidhormons Progesteron
bei der Aktivierung progesteronregulierter Gene**

Solveigh Krusekopf

**Dissertation
genehmigt von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe**

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren und Steroidhormone sind Botenstoffe, die über unterschiedliche Wege die Genexpression ihrer Zielzellen beeinflussen. Während Wachstumsfaktoren extrazellulär an ihre in der Zellmembran lokalisierten Rezeptoren binden und durch die Aktivierung dieser Rezeptoren eine Kaskade von Signalen auslösen, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, erfolgt die Bindung von Steroidhormonen an ihre Rezeptoren intrazellulär und führt über Bindung der Hormon-Rezeptor Komplexe an spezifische DNA Sequenzen im Promotorbereich hormonregulierter Gene direkt zur Transkription dieser Gene.

Das Steroidhormon Progesteron und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, Epidermal Growth Factor) beeinflussen die Entwicklung des Mammaepithels und das Wachstum von Mammatumoren. Das Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) wird von Progesteron und EGF synergistisch aktiviert. Die Untersuchung des Mechanismus dieser Aktivierung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Der Synergismus ist nicht spezifisch für MMTV, sondern tritt auch bei anderen progesteronregulierten Promotoren auf. Als cis-regulatorische Sequenz sind für den Synergismus nur eine Progesteronrezeptorbindungsstelle und eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsinitiationskomplex notwendig.

Die Steigerung der progesteroninduzierten Genexpression durch EGF ist bereits nach 15 min nachweisbar und erfolgt transient. Sie ist abhängig von der Aktivierung des EGF Rezeptors und verläuft wahrscheinlich über die Aktivierung von Proteinkinase C.

Die Möglichkeit einer Modifikation des Progesteronrezeptors als molekularer Mechanismus des Synergismus wurde eingehend untersucht. Weder die Gesamtphosphorylierung des hormonaktivierten Progesteronrezeptors noch die phosphorylierten Aminosäurereste oder das Phosphorylierungsmuster von partiell mit Protease verdautem Progesteronrezeptor wird durch EGF verändert. Auch die DNA Bindung des aktivierten Progesteronrezeptors *in vitro* wird durch EGF nicht verändert.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der molekulare Mechanismus der synergistischen Aktivierung progesteronregulierter Gene durch Progesteron und EGF auf einer Interaktion eines durch EGF aktivierten Faktors mit dem Progesteronrezeptor beruht, die *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte.

Synergistic activation of progesterone regulated genes by the epidermal growth factor (EGF) and the steroid hormone progesterone

Summary

Growth factors and steroid hormones influence gene expression of their target cells through different pathways. Growth factors bind to their membrane receptors extracellularly and start a signal cascade which leads to the activation of transcription factors, while binding of steroid hormones to their intracellular receptors induces the transcription of responsive genes by binding of hormone-receptor complexes to specific DNA sequences in the promoter-region of these genes.

The steroid hormone progesterone and the epidermal growth factor (EGF) influence the development of the mammary epithelium and the growth of mammary tumors. The mouse mammary tumor virus (MMTV) is synergistically activated by progesterone and EGF. The object of this work is the investigation of the mechanism of this activation.

The synergism is not specific for MMTV, but is also found with other progesterone regulated promoters. The only necessary cis-regulatory sequences for this synergism are a binding site for the progesterone receptor and a recognition sequence for the transcription initiation complex.

The enhancement of the progesterone induced gene expression by EGF is already detectable 15 min after treatment and is transient. It depends on activation of the EGF receptor and probably involves activation of protein kinase C.

A possible modification of the progesterone receptor as the molecular mechanism of the synergism was investigated intensively. Neither the total phosphorylation of the hormone activated progesterone receptor nor the phosphorylated amino acid residues nor the phosphorylation pattern of partially protease digested progesterone receptor is changed by EGF. Also DNA binding of the activated progesterone receptor *in vitro* is not influenced by the growth factor.

These results support the idea that the molecular mechanism of the synergistic activation of progesterone regulated genes by progesterone and EGF is based on an interaction of an EGF-activated factor with the progesterone receptor, which could not be detected *in vitro*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	4
Einleitung	7
Zielsetzung	14
Materialien und Methoden	15
Materialien	15
1. Bezugsquellen	15
Radiochemikalien	17
2. Zellen und Bakterien	18
3. Antikörper	18
4. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	18
5. Plasmidkonstrukte	19
Methoden	20
1. Zellkultur	20
1.1. Kultivieren von Zellen	20
1.2. Trypsinieren von Zellen	20
1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	20
1.4. Stabile Transfektion von T47D Zellen	21
1.5. Behandlung von Zellen mit Induktoren	21
2. Behandlung von Nukleinsäuren	22
2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
2.2. Phenol/Chloroform-Extraktion	22
2.3. Ethanolfällung	22
2.4. Gelfiltration mit Sephadex G50 Säulen	23
2.5. Restriktionsverdau von DNA	23
2.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23

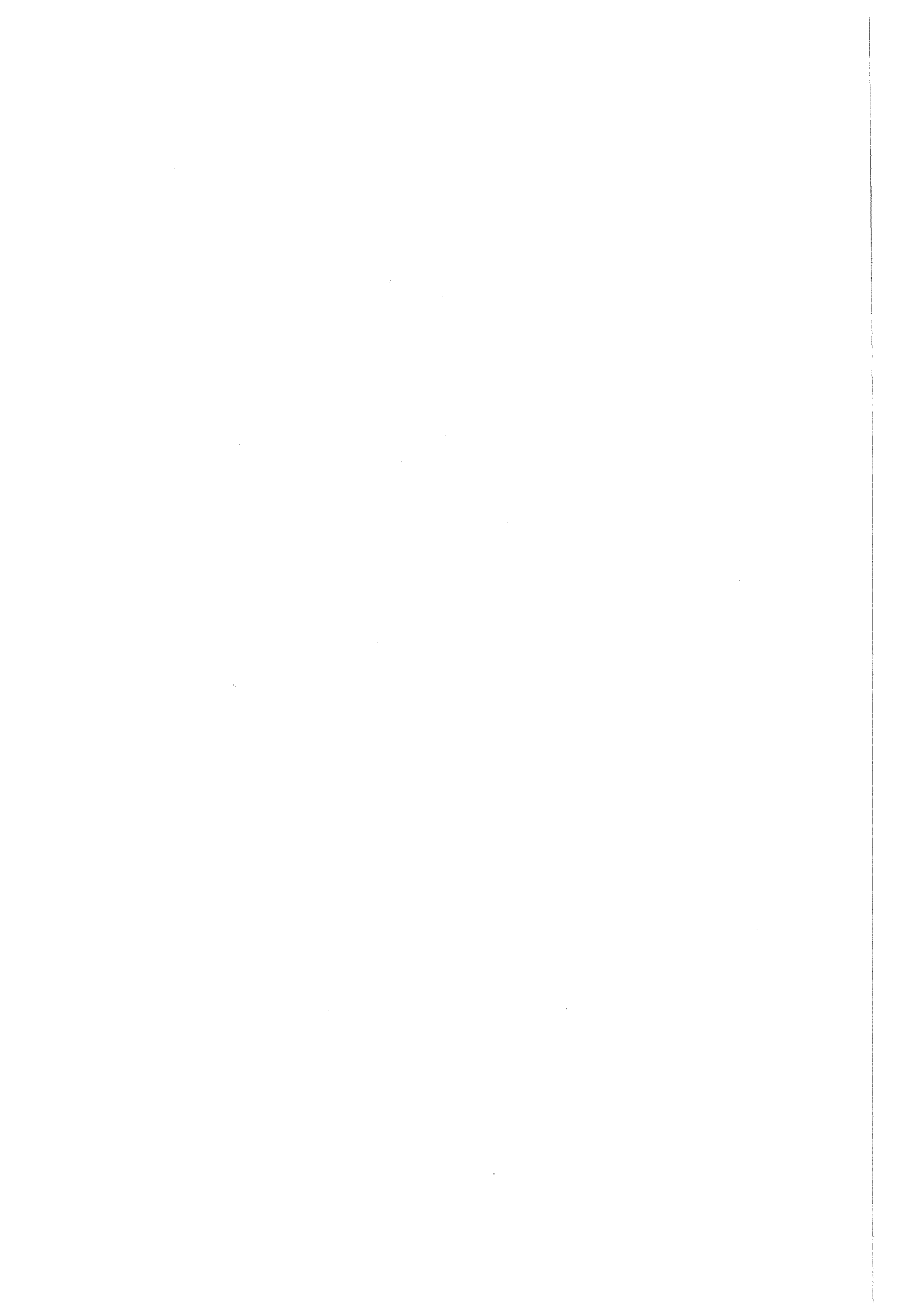
2.7. Dephosphorylierung von DNA-Restriktionsfragmenten und Oligonukleotiden	24
2.8. Kinasierung von DNA-Restriktionsfragmenten und Oligonukleotiden	24
3. DNA Präparation	24
3.1. Herstellung kompetenter Bakterien	24
3.2. Transformation von Bakterien	25
3.3. Präparation von Plasmid-DNA	25
4. DNA Gelelektrophorese	26
4.1. Agarosegele	26
4.2. Polyacrylamidgele	26
4.3. Polyacrylamid-Harnstoffgele	27
5. DNA-Protein Bindungsanalysen	28
5.1. Herstellung von Zellextrakten für Gelretardationsanalysen	28
5.2. Gelretardationsanalysen (Bandshift)	28
6. Poly A ⁺ RNA Präparation	29
7. S1 Nukleasekartierung	30
8. Analyse von Proteinen	31
8.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	31
8.2. CAT Assay	31
8.3. Auswertung von CAT Assays	32
8.4. Immunpräzipitation des Progesteronrezeptors	32
8.5. Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen	33
8.6. Partielle Proteolyse des präzipitierten Progesteronrezeptors.....	34
8.7. Western Blot	34
8.8. Analyse der phosphorylierten Aminosäuren	35
Ergebnisse	37
1. EGF verstärkt die progesteroninduzierte Transkription des MMTV Promotors	37
2. Die cis-regulatorische Sequenz für den EGF Effekt ist identisch mit der Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor	40
3. Hormonspezifität des EGF Effekts	41

3.1. Der EGF Effekt ist abhängig von der eingesetzten Progesteronkonzentration	41
3.2. Wirkung von EGF auf die MMTV Induktion durch andere Steroidhormone	43
4. Der EGF Effekt erfolgt durch Aktivierung des EGF Rezeptors	47
4.1. Der Wachstumsfaktor TGF α stimuliert die progesteronregulierte MMTV Transkription vergleichbar mit EGF	47
4.2. Bestimmung der halbmaximalen Konzentrationen von EGF und TGF α für die Steigerung der R5020 induzierten MMTV Expression ..	49
4.3. Hemmung des EGF Effekts durch Tyrphostin, einen spezifischen Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors	51
5. Mechanismus des EGF Effekts nach Aktivierung des EGF Rezeptors	53
5.1. Kinetik des EGF Effekts	53
5.2. Synergistischer Effekt von TPA und R5020 auf die Aktivierung des HRE	58
5.3. Einfluß von Serin/Threonin-Proteinkinaseinhibitoren auf den EGF Effekt	59
6. Einfluß von EGF auf die R5020 induzierte Phosphorylierung des Progesteronrezeptors	62
6.1. EGF Effekt auf die Gesamtphosphorylierung des Progesteronrezeptors	63
6.2. Analyse der phosphorylierten Aminosäuren	66
6.3. Partielle Proteolyse des radioaktiv phosphorylierten Progesteronrezeptors	69
7. Einfluß von EGF auf die DNA Bindung des Progesteronrezeptors	72
Diskussion	79
Literaturverzeichnis	89

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BSA	Bovine (Rinder-) Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
Ci	Curie (1 Ci = 37 Gigabecquerel)
CIP	Calf Intestinal Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
DC	Dünnschichtchromatographie
Dex	Dexamethason
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G418	Geneticinsulfat
h	Stunde
H7	1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine Dihydrochlorid
H9	N-(2-aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamid Dihydrochlorid
HA1004	N-(2-guanidinoethyl) -5-isoquinolinesulfonamid Dihydrochlorid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRE	Hormone Response Element (DNA Sequenz, an die Hormonrezeptoren binden)

IGFI	Insulinlike Growth Factor I (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I)
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
LTR	Long Terminal Repeat (Lange terminale Wiederholungssequenz)
M	Molar
m	mili (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
min	Minute(n)
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
NFI	Nuclear Factor I (Transkriptionsfaktor)
NP40	Nonidet P-40
NTB	Nitro Blue Tetraclolum
oD	optische Dichte
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRE	Progesterone Response Element (DNA Bindestelle für den Progesteronrezeptor)
R5020	17,21-Dimethyl-19-nor-4,9-pregnadien-3,20-dion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions (Umdrehungen) pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAT	Tyrosin-Amino-Transferase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF α	Transforming Growth Factor α (Transformierender Wachstumsfaktor α)
TGF β_1	Transforming Growth Factor β_1 (Transformierender Wachstumsfaktor β_1)
tk	Thymidinkinase
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s) (Einheiten)
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel



Einleitung

Vielzellige Organismen zeichnen sich durch Aufgabenteilung bei den verschiedenen für die Lebenserhaltung notwendigen Funktionen aus. Zur Wahrnehmung unterschiedlicher Aufgaben haben sich im Verlauf der Evolution verschiedene Gewebe herausgebildet, deren Zellen sich trotz in der Regel gleichen Erbguts in der Zusammensetzung ihrer Proteine unterscheiden. Die Herausbildung und Aufrechterhaltung solcher gewebespezifischen Unterschiede sowie die Anpassung an veränderte äußere Bedingungen erfordert Kommunikation von Zellen untereinander.

Diese interzelluläre Kommunikation wird durch Botenstoffe vermittelt, die nach Wirkmechanismus und Aufbau in die Gruppen Neurotransmitter, Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren unterteilt werden. Auf die Neurotransmitter, die Signale zwischen Nervenzellen sowie zwischen Nerven- und Muskelzellen übertragen, und auf die Cytokine, die hauptsächlich von Zellen des Blutbildenden- und Immunsystems gebildet werden und an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind, soll im Folgenden nicht näher eingegangen werden.

Unter dem Begriff Hormone werden eine Reihe unterschiedlich aufgebauter Substanzen wie Aminosäurederivate (z.B. Adrenalin, Thyroxin), Peptidhormone (z.B. Prolaktin, Insulin) und Steroidhormone zusammengefaßt, wobei letztere wiederum in Mineralokortikoide (z.B. Aldosteron), Glukokortikoide (z.B. Kortison) und Sexualhormone (z.B. Progesteron) unterteilt werden. Charakteristisch für Hormone ist ihre Bildung in dafür spezialisierten Organen oder Gewebeteilen (z.B. Hypophyse, Nebennierenrinde), ihre Verteilung im gesamten Körper über das Blutsystem und ihre Wirkung auf verschiedene Gewebe, die in der Regel nicht mit den Bildungsorten identisch sind.

Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich um kleinere Proteine oder Peptide, die von verschiedenen Zellen gebildet und ausgeschleußt werden können und bevorzugt auf ihre Ursprungszellen oder benachbarte Zellen wirken (autokrin oder parakrin, im Gegensatz zur endokrinen Wirkungsweise

von Hormonen). Die meisten Wachstumsfaktoren stimulieren das Wachstum ihrer Zielzellen. So fördern der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, Epidermal Growth Factor) und der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α , Transforming Growth Factor α) das Wachstum von epidermalen Zellen und Fibroblasten (Schreiber et al. 1986). Andere Wachstumsfaktoren wie der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β , Transforming Growth Factor β) können sowohl wachstumsstimulierend als auch wachstumshemmend wirken (Moses et al. 1990).

Die vielfältigen und häufig komplexen Wirkungen einzelner Botenstoffe gestatten nicht in jedem Fall eine eindeutige Zuordnung zu einer der beschriebenen Gruppen. So wirkt das in der Bauchspeicheldrüse gebildete Peptid Insulin einerseits als Hormon bei der Regulierung des Blutzuckerspiegels, andererseits als Wachstumsfaktor bei der Stimulierung des Wachstums verschiedener Zellen (Topper und Freeman 1980, Contreas et al. 1989).

Wachstumsfaktoren und Peptidhormone treten mit ihren Zielzellen durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor in Verbindung. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, deren Bindungsstelle für ihren jeweiligen Botenstoff an der Membranaußenseite liegt.

Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt bei Wachstumsfaktoren zur Phosphorylierung einer Kinase, die Bestandteil des Rezeptors oder mit dem Rezeptor assoziiert ist. Diese Kinase löst durch Phosphorylierung spezifischer Proteine eine Kaskade von Veränderungen in der Zelle aus, die die Expression bestimmter Gene beeinflussen.

Die durch die Ligandbindung ausgelöste Folge von Reaktionen in der Zelle ist unter anderem am Beispiel des in vielen epidermalen Zellen vorkommenden EGF Rezeptors untersucht worden. Die Bindung von EGF an diesen Rezeptor führt zur Aktivierung der EGF Rezeptor-Tyrosinkinase, die den Rezeptor und andere Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert (Ushiro und Cohen 1980, Hunter und Cooper 1981). Diese Tyrosinkinaseaktivität ist eine Voraussetzung für die Stimulierung von Genexpression und Zellwachstum durch EGF. Inaktivierung der Tyrosinkinase durch Mutation des Rezeptors führt zum

Ausfall dieser Wirkungen (*Chen et al. 1987, Honegger et al. 1987*). Als Folge der Phosphorylierungsreaktionen durch die EGF Rezeptor-Tyrosinkinase steigt die Aktivität von Phospholipase C, die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat katalysiert (*Berridge 1987, Wahl et al. 1988, Posner et al. 1989*). Inositol-1,4,5-triphosphat bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} innerhalb der Zelle, während Diacylglycerol Proteinkinase C (PKC) aktiviert (*Berridge 1987*). Im weiteren Verlauf der durch EGF ausgelösten Signalkette kommt es zur Expression der Proto-Onkogene *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* (*Müller et al. 1984, Quantin und Breathnach 1988*), deren Genprodukte als Transkriptionsfaktoren die Aktivierung einer Reihe weiterer Gene wie zum Beispiel des Gens für die Matrix-Metalloproteinase Stromelysin bewirken (*McDonnell et al. 1990*). Die durch EGF indirekt über die beschriebene Signalkette hervorgerufenen Änderungen der Genexpression führen schließlich zu einer Stimulierung des Zellwachstums.

Der Wachstumsfaktor $\text{TGF}\alpha$ (Transforming Growth Factor α) weist eine Homologie von 30% auf Proteinebene zu EGF auf einschließlich Konservierung aller sechs Cysteinreste und kompetiert mit EGF um die Bindung an den EGF Rezeptor (*Marquardt et al. 1983 und 1984, Massagué 1983, Carpenter et al. 1983*). Im Gegensatz zu dem in der Speicheldrüse gebildeten Wachstumsfaktor EGF wird $\text{TGF}\alpha$ in einigen embryonalen und adulten Geweben und in einer Reihe von Tumorzellen exprimiert (*Derynck 1988, Goustin et al. 1986, Salomon et al. 1984, Bates et al. 1988, Valverius et al. 1989*). Obwohl die Bindungsaffinität von $\text{TGF}\alpha$ an den EGF Rezeptor nur 55% der Affinität von EGF beträgt, bestehen in der biologischen Aktivität nur geringe Unterschiede zwischen $\text{TGF}\alpha$ und EGF (*Winkler et al. 1986, Derynck 1988*).

Im Gegensatz zu Wachstumsfaktoren können Steroidhormone die Zellmembran passieren und innerhalb der Zelle an ihren Rezeptor binden. Die Hormonbindungsdomäne ist im C-terminalen Bereich des Rezeptors lokalisiert (*Evans 1988*). Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur

Dissoziation des Hitzeschockproteins hsp90, das in Abwesenheit von Hormon mit dem Rezeptor in einem Komplex vorliegt (Joab et al. 1984, Catelli et al. 1985, Sanchez et al. 1985, Redeuilh et al. 1987). Nach Abspaltung von hsp90 dimerisiert der Rezeptor und bindet an spezifische DNA Sequenzen im Promotorbereich steroidhormonregulierter Gene (Beato 1989). Die Bindung des durch Steroidhormon aktivierten Rezeptors an die DNA führt, im Gegensatz zu dem für den Wachstumsfaktor EGF beschriebenen Mechanismus der Genaktivierung über Signaltransduktion, direkt zur Transkription des hormonregulierten Gens (Beato 1989).

Steroidhormonrezeptoren sind Phosphoproteine. Für den Glukokortikoidrezeptor wurde gezeigt, daß diese Phosphorylierung notwendig ist für die Ligandbindung und damit für die Aktivierbarkeit des Rezeptors durch Hormon. Durch Behandlung mit Phosphatasen wird die Bindungsfähigkeit des Rezeptors für Hormon zerstört (Nielsen et al. 1977, Housley et al. 1982).

Für den Progesteronrezeptor, den Glukokortikoidrezeptor und ein weiteres Mitglied der Steroidhormonfamilie, den Vitamin D₃ Rezeptor, konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung durch Hormon von einer Veränderung der Phosphorylierung des Rezeptorproteins begleitet ist (Logeat et al. 1985, Rao et al. 1987a, Hoeck et al. 1989, Hoeck und Groner 1990, Pike und Sleator 1985). Diese hormonabhängige Phosphorylierung ist vermutlich eine Voraussetzung für die Transaktivierung der Genexpression durch diese Rezeptoren.

Die DNA bindende Domäne ist im zentralen Bereich des Rezeptormoleküls lokalisiert und innerhalb der Familie der Steroidhormonrezeptoren stark konserviert (Evans 1988, Beato 1989). Die Bindung dieser Rezeptoren an die DNA wurde am Beispiel des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) untersucht. Das MMTV ist ein Retrovirus, das hormonabhängig in Mäusen Tumore auslöst. Die genetische Information dieses Virus besteht aus einem RNA Molekül, das nach Eindringen in eine Wirtszelle von dem viruskodierte Enzym Reverse Transkriptase in ein doppelsträngiges DNA Molekül übersetzt wird. Diese DNA kann mit Hilfe von repetitiven Sequenzen an beiden Enden des Moleküls, den sogenannten Long Terminal Repeats (LTR), unspezifisch ins Genom der Wirtszelle integrieren (Varmus 1982). Das MMTV Genom enthält kein Onkogen

(Hynes et al. 1984). Es besteht neben den LTR Sequenzen aus den Genen *gag*, *pol* und *env*, die für die Reverse Transkriptase und für Hüllproteine des Virus kodieren (Sen et al. 1979, Hynes et al. 1984). Die Bildung von Mammatumoren in Mäusen ist korreliert mit einer Integration des MMTV in der Nähe von Proto-Onkogenen, die als *int-1* bis *int-4* bezeichnet werden (Nusse und Varmus 1982, Dickson et al. 1984, Peters et al. 1986, Gallahan und Callahan 1987, Nusse et al. 1988). Die Aktivierung dieser *int* Gene durch Promotorsequenzen im LTR des MMTV wird als tumorauslösendes Ereignis betrachtet (Nusse 1988).

Obwohl MMTV neben der Brustdrüse auch lymphatisches Gewebe, Speicheldrüsen und männliche Geschlechtsorgane infiziert, ist die Tumorbildung auf das Mammaepithelgewebe weiblicher Mäuse beschränkt und erfolgt in Abhängigkeit von Trächtigkeit und Laktation (Hagemann et al. 1981). Während der Trächtigkeit der Mäuse, die mit einer Erhöhung der Konzentrationen von Progesteron und Glukokortikoid einhergeht, steigt die MMTV Transkription im Mammaepithelgewebe stark an und sinkt bei Rückbildung des Mammagewebes nach Beendigung der Laktation wieder ab (Muñoz und Bolander 1989). Für das Glukokortikoid Dexamethason konnte in aus Mammatumoren etablierten Zelllinien sowie in mit MMTV DNA transfizierten Zellen eine hormonabhängige Steigerung der MMTV Transkription nachgewiesen werden (Parks et al. 1974, Buetti und Diggelmann 1981).

Diese Hormonregulation wird durch eine Region im LTR des MMTV vermittelt, die die DNA Sequenz von -202 bis -59 bezogen auf den Transkriptionsstart umfaßt und als HRE (Hormone Response Element) bezeichnet wird (Fasel et al. 1982, Hynes et al. 1983, Ponta et al. 1985). Die Transkriptionsinduktion durch das HRE ist nicht spezifisch für Glukokortikoid, sondern wurde auch für die Steroidhormone Progesteron, Androgen und Mineralokortikoid gezeigt (Cato et al. 1986 und 1987, Cato und Weinmann 1988). Das HRE enthält vier Wiederholungen der Sequenz 5' TGTTCT 3'. Für den Glukokortikoidrezeptor und den Progesteronrezeptor wurde eine Bindung an diese Sequenz gezeigt (Scheidereit et al. 1983, Payvar et al. 1983, von der Ahe et al. 1985).

Die Regulation der MMTV Transkription erfolgt jedoch nicht ausschließlich durch Steroidhormone. Außerhalb der Bindungsstellen für die Steroidhormonrezeptoren wurden Sequenzen identifiziert, die die MMTV Transkription durch Bindung trans-aktivierender Faktoren unabhängig von der Induktion durch Steroidhormone beeinflussen können (*Mink et al. 1990*). Prolaktin stimuliert die MMTV Transkription (*Muñoz und Bolander 1989*), während der Wachstumsfaktor TGF β einen hemmenden Einfluß ausübt (*Cato et al. 1989*).

Steroidhormone und Wachstumsfaktoren können sich in ihren Wirkungen auf Zellen gegenseitig beeinflussen. Im Folgenden soll auf die Wechselwirkungen zwischen dem Steroidhormon Progesteron und dem Wachstumsfaktor EGF näher eingegangen werden. Mammaepithelzellen sind Zielzellen für beide Botenstoffe. Progesteron und EGF beeinflussen die Reaktion dieser Zellen auf den jeweils anderen Botenstoff. So führt Progesteron in der menschlichen Mammaepitheltumorzelllinie T47D zur Expression der Gene für EGF und TGF α (*Murphy et al. 1988, Musgrove et al. 1991*) und zu einer Erhöhung der Anzahl der EGF Rezeptormoleküle in der Zellmembran (*Murphy et al. 1985 und 1986, Sarup et al. 1988*). EGF hemmt die Bindung von Progesteron an den Progesteronrezeptor und vermindert die Anzahl der Progesteronrezeptormoleküle in der Zelle (*Sarup et al. 1988*).

In menschlichen Mammatumorzelllinien und Mammatumoren wurden antagonistische Wirkungen von Progesteron und EGF auf das Zell- bzw. Tumorstadium beschrieben. EGF stimuliert das Wachstum von Mammatumorzellen (*Singletery et al. 1987, Karey und Sirbaska 1988*), während Progesteron wachstumshemmend wirkt (*Horwitz und Freidenberg 1985, Sarup et al. 1988, Koga et al. 1989*). Die progesteroninduzierte Wachstumshemmung von T47D Zellen kann durch EGF teilweise aufgehoben werden (*Sarup et al. 1988, Koga et al. 1989*). In Mammatumoren können neben der Anzahl der Rezeptoren für Östrogen in den Tumorzellen auch die Rezeptorzahlen für Progesteron und EGF als prognostische Faktoren für die Überlebenszeit verwendet werden. Die Zahl der Progesteronrezeptoren

korreliert positiv mit der Überlebenszeit (*Clark et al. 1983, Foekens et al. 1989*) und negativ mit der EGF Rezeptorzahl (*Cappelletti et al. 1990*).

Agonistische Wirkungen von Progesteron und EGF sind für die Differenzierung des Mammaepithelgewebes in trächtigen Mäusen (*Tonelli und Sorof 1980, Taketani und Oka 1983, Snedeker et al. 1991*) und für die Hemmung der Synthese von Milchproteinen während der Schwangerschaft (*Taketani und Oka 1983*) postuliert worden.

Einen Hinweis auf eine agonistische Wirkung von Progesteron und EGF auf die Genexpression des MMTV gibt ein Experiment von *Kurachi et al. 1985*. In mit MMTV infizierten Mäusen wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des Wachstumsfaktors EGF und dem Auftreten und Wachstum von Mammatumoren während der Trächtigkeit und Laktation festgestellt (*Kurachi et al. 1985*). EGF ist zur Differenzierung des Mammaepithels notwendig und liegt während der Schwangerschaft in hohen Konzentrationen vor (*Taketani und Oka 1983*). Entfernen der Speicheldrüsen, in denen EGF hauptsächlich produziert wird, führt zu deutlich vermindertem Auftreten und geringerem Wachstum von Mammatumoren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Behandlung der operierten Tiere mit EGF erhöht die Tumorraten und das Tumorstadium annähernd auf die Werte der Kontrolltiere. Um näheren Aufschluß über das Zusammenwirken von Progesteron und EGF bei der Expression von Genen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von EGF auf die Transkription progesteronregulierter Gene untersucht.

Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde der Synergismus zwischen dem Steroidhormon Progesteron und dem Wachstumsfaktor EGF bei der Aktivierung der vom MMTV-LTR regulierten Transkription untersucht (*Cato et al. 1989, Krusekopf et al. 1991*). Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Ist der DNA Bereich des MMTV-LTR, an den der Progesteronrezeptor bindet, ausreichend, um den EGF Effekt auf die Progesteroninduktion der Transkription hervorzurufen?
- Ist der EGF Effekt spezifisch für das Steroidhormon Progesteron?
- Erfordert dieser Effekt die Aktivierung des EGF Rezeptors? Falls ja, über welche Zwischenstufen gelangt das Signal vom EGF Rezeptor zur Progesteronrezeptorbindungsstelle?
- Findet ein Zusammenwirken des vom EGF Rezeptor ausgehenden Signals mit der Hormonaktivierung des Progesteronrezeptors statt?
 - Wird die progesteronabhängige Phosphorylierung des Progesteronrezeptors durch zusätzliche Behandlung von Zellen mit EGF verändert?
 - Beeinflußt EGF die hormonabhängige Bindung des Progesteronrezeptors an die PRE (Progesterone Response Element) Sequenz?

Materialien und Methoden

Materialien

1. Bezugsquellen

Soweit nicht anders aufgeführt wurden Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt oder Roth, Karlsruhe und Enzyme von Boehringer, Mannheim oder Promega Biotec, Heidelberg bezogen.

Acetyl-Coenzym A, Li-Salz	Pharmacia LKB, Freiburg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar Agar	Seelze, Hannover
Agarose	Appligene, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
BCIP	Sigma, München
DEAE Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Dimethylsulfoxid(DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	BRL, Neu-Isenburg
DMEM	Gibco, Karlsruhe
<i>E. coli</i> tRNA	Boehringer, Mannheim
Emulsifier Safe	Packard Instrument Company, Groningen
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merk, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
G418	Gibco, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
H7	Seikagako Cogyo, Tokyo
H9	Seikagako Cogyo, Tokyo
HA1004	Seikagako Cogyo, Tokyo

Harnstoff	Bio-Rad, München
Hefeextrakt	Difco, Detroit
HEPES	Sigma, München
Immobilon P Transfermembran	Millipore, Bedford
IGFI	Bissendorf, Hannover
Insulin	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Macherey-Nagel, Düren
Lysozym	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Ninhydrin Sprühreagenz	Sigma, München
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio-Rad, München
Nonidet-P 40	Bio-Rad, München
NTB	Sigma, München
Oligo-dT-Cellulose Typ VII	New England Biolabs,
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Phosphoserin	Sigma, München
Phosphothreonin	Sigma, München
Phosphotyrosin	Sigma, München
PMSF	Sigma, München
poly(dI-dC)	Pharmacia LKB, Freiburg
Proteaseinhibitoren	Sigma, München
Proteinase K	Merk, Darmstadt
Protein-A-Sepharose	Pharmacia LKB, Freiburg
Proteinassay	Bio-Rad, München
Quiagen tip 500 Säulen	Diagen, Düsseldorf
Quickszint	Zinsser Analytik, Frankfurt
Röntgenfilme (HyperfilmMP)	Amersham, Braunschweig
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G50	Pharmacia LKB, Freiburg
Sphingosin	Sigma, München
TEMED	Bio-Rad, München
TGF α	Bissendorf, Hannover
TGF β_1	H. Biermann GmbH, Bad Nauheim
TPA	Sigma, München
transfer-RNA (aus Kalbsleber)	Boehringer, Mannheim
Tris	Sigma, München

TritonX100	Bio-Rad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Trypton	Difco, Detroit
Tyrphostin RG50864	Rorer Pharmaceutical Company, Pennsylvania
V8 Endoprotease Glu-C	Boehringer, Mannheim
Whatman 3MM Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturverbrauchsmaterial	Greiner, Nürtingen

Das Progestin R5020 wurde von Schering, Berlin und die Staurosporinderivate CGP41251 und CGP42700 von Ciba Geigy zur Verfügung gestellt.

Radiochemikalien:

γ - ³² P-dATP (370 MBq/ml)	Amersham, Braunschweig
³² P-Orthophosphat (92,5 MBq/ml)	Amersham, Braunschweig
D-threo-(dichloracetyl-1- ¹⁴ C)- Chloramphenicol (7,4 MBq/ml)	Amersham, Braunschweig
¹⁴ C-methylierte Proteine	Amersham, Braunschweig

2. Zellen und Bakterien

T47D	menschliche Mammaadenokarzinomzelllinie (<i>Horwitz et al. 1978</i>)
T47D-CAT7	Einzelklon aus einer stabilen Transfektion von T47D Zellen mit pMMTV-CAT und pSV ₂ neo (<i>Cato et al. 1987</i>)
<i>E. coli</i> DH5	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>

3. Antikörper

Let126	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen menschlichen Progesteronrezeptor (B-Form) (<i>Perrot-Appianat et al. 1987</i> , zur Verfügung gestellt von <i>E. Milgrom</i>)
AB52	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen menschlichen Progesteronrezeptor (B- und A-Form) (<i>Estes et al. 1987</i> , zur Verfügung gestellt von <i>D. P. Edwards</i>)

4. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

PRE	5' AGCTTAGAACACAGTGTTCTCTAGAG 3' 3' ATCTTGTCACAAGAGATCTCCTAG 5'
F2 (MMTV-LTR, -909/-880)	5' GATCCTTCCTCTTGGGGCAAGGACCACAGCCAA 3' 3' GAAGGAGAACCCCGTTCCTGGTGTCCGTTTCGA 5'

5. Plasmidkonstrukte

- pMMTV-CAT enthält das *Hae*III Fragment des MMTV-LTR von -631 bis +125 fusioniert an das bakterielle CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) Gen (*Cato et al. 1986*).
- pHC8 enthält die Sequenzen von -237 bis +110 des MMTV-LTR mit einer Mutation in der Bindungsstelle des Proteins NFI (Nuclear Factor I) fusioniert an das bakterielle CAT Gen (*Cato et al. 1988*).
- PREtkCAT enthält das vollständige Palindrom 5' AGAACACAGTGTTCT 3' fusioniert an den Promotor des Thymidinkinasegens (tk) und das CAT Gen (*Krusekopf et al. 1991*).
- PRE₁TATA-CAT enthält die PRE Sequenz 5' TGTACAGGATGTTCT 3' des TAT (Tyrosin-Amino-Transferase) Gens fusioniert an eine TATA Sequenz und das CAT Gen (*zur Verfügung gestellt von L. Klein-Hitpaß*).
- PRE₂TATA-CAT enthält die PRE Sequenz des TAT Gens als Dimer fusioniert an TATA-CAT (*zur Verfügung gestellt von L. Klein-Hitpaß*).
- pSV₂neo enthält das bakterielle Neomycin-Resistenzgen unter SV40 Kontrolle (*Southern und Berg 1982*)
- pBR322 Verwendung als Molekulargewichtsstandard nach *Hae*III Verdau (*Bolivar et al. 1977, Sutcliffe 1979*).

Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, sind die Arbeitsprotokolle den Methodensammlungen von Maniatis et al. (1982) und Ausubel et al. (1989) entnommen.

1. Zellkultur

1.1. Kultivieren von Zellen

T47D Zellen wurden in RPMI1640 Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C, 6% CO₂ und 95% relativer Feuchte kultiviert.

1.2. Trypsinieren von Zellen

Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt. Die Kulturschalen wurden mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und mit 0,25%igem Trypsin im Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen sich abzulösen begannen, wurden sie mit Medium von der Petrischale abgespült und in einem Falconröhrchen 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl in geeigneter Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt.

1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert, in Medium mit 10% DMSO resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Einfrierröhrchen in einer Styroporbox über Nacht bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

1.4. Stabile Transfektion von T47D Zellen

(nach Chen und Okayama 1987)

Für jeden Transfektionsansatz wurden 2×10^6 Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale eingesät und über Nacht in 10 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin inkubiert (RPMI 1640 Medium ist für $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektionen nicht geeignet, da es 10x mehr Phosphationen als DMEM enthält, was zum Verklumpen des DNA-Präzipitats führt). 10 µg des CAT-Konstrukts und 1 µg pSV₂neo DNA wurden mit 0,5 ml 2,5 M CaCl_2 vermischt und unter leichtem Schütteln tropfenweise zu 0,5 ml 2x BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 6,95) gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Nach Mediumwechsel wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese 16 h bei 35°C und 3% CO_2 inkubiert. Das Medium wurde erneut gewechselt und die Zellen 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und 14 Tage mit 800 µg/ml G418 selektioniert. Nachdem die resistenten Zellen zu Kolonien hochgewachsen waren, wurden entweder Einzel- oder Massenkclone weitergezogen und auf Induzierbarkeit durch R5020 getestet.

1.5. Behandlung von Zellen mit Induktoren

Induktoren wurden nach Ersatz des Kulturmediums durch Medium ohne FCS in der im Text angegebenen Konzentration zu den Zellen gegeben. Bei den in EtOH gelösten Steroidhormonen wurden die Kontrollen mit entsprechenden Mengen an EtOH behandelt. Der Phorbolster TPA wurde in DMSO gelöst und die Kontrollen ebenfalls mit DMSO inkubiert. Die Staurosporine CGP41251 und CGP42700 und die entsprechenden Kontrollen wurden in DMSO/H₂O im Verhältnis 1:1 verwendet.

2. Behandlung von Nucleinsäuren

2.1. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäuren in wässriger Lösung wurde photospektrometrisch durch Messen der optischen Dichte (oD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine oD_{260} von 1 entspricht 50 ng/ μ l doppelsträngiger DNA bzw. 40 ng/ μ l RNA.

2.2. Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nucleinsäurelösungen wurden diese Lösungen mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, gesättigt mit 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gemischt und die Phasen durch 5 min Zentrifugation getrennt. Um Phenolreste zu entfernen, wurde die obere, die Nucleinsäuren enthaltende Phase entweder erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert oder mit Ethanol gefällt.

2.3. Ethanolfällung

Wässrige Nucleinsäurelösungen können durch Fällung mit Ethanol von Phenol- und Chloroformresten gereinigt und konzentriert werden.

Die DNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat, pH 4,8 und 2 Vol. EtOH (bei RNA 2,5 Vol. EtOH) gemischt, 10 min bei -80°C oder mindestens 1 h bei -20°C gefällt und 10 bis 30 min bei 12000 g zentrifugiert. Zum Entfernen von Salz wurde das Pellet 1 - 2 mal mit 80% EtOH gewaschen. Nach Trocknen unter Vakuum wurden die Nucleinsäuren in einem geeigneten Volumen destillierten Wassers oder des gewünschten Puffers aufgenommen. Bei geringen Nucleinsäuremengen wurden 1 - 10 μ g E.coli tRNA als Fällungshilfe zugegeben.

Anstelle von Ethanol kann zur Fällung von Nucleinsäuren auch 0,7 Vol. Isopropanol verwendet werden.

2.4. Gelfiltration mit Sephadex G50 Säulen

Mit Sephadex G50 Säulen können im Anschluß an radioaktive Markierungsreaktionen nicht eingebaute Nukleotide von DNA Restriktionsfragmenten bzw. Oligonukleotiden abgetrennt werden.

Eine 1 ml Gilsonspitze wurde mit Glaswolle abgedichtet und mit in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gequollenem Sephadex G50 gefüllt. Die so erhaltene Säule wurde mit Hilfe eines Eppendorfreaktionsgefäßes, dessen Boden abgeschnitten wurde, in einem 15 ml Greiner Röhrchen befestigt und 1 min bei 2000 rpm in einer Digifuge zentrifugiert. Die Säule wurde mit 1 ml TE gewaschen und 4 min zentrifugiert. Nach Auftragen der Probe (ca. 0,1 ml) wurde erneut 5 min zentrifugiert und die markierte DNA in einem Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen, während die nicht eingebauten Nukleotide im Säulenmaterial verblieben.

2.5. Restriktionsverdau von DNA

Plasmid DNA wurde in 20 - 50 µl Ansätzen mit Restriktionsenzym unter den für das jeweilige Enzym von der Bezugsfirma angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 - 4 h inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde auf einem Agarosegel getestet.

2.6. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Plasmide wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und je nach Größe der zu isolierenden Fragmente auf 0,8 - 1,5% Agarosegelen aufgetrennt, bis das gewünschte Fragment deutlich von anderen DNA Stücken getrennt war. Das Gel wurde auf einen Transilluminator gelegt und unter UV Licht in Laufrichtung des Gels direkt vor dem zu isolierenden Fragment mit einem Skalpell ein Schlitz von der Breite des Fragments in das Gel geschnitten. In den Schlitz wurde ein Stück DEAE Membran gesteckt und die Elektrophorese fortgeführt, bis das Fragment auf die Membran aufgelaufen war. Die Membran wurde aus dem Gel entfernt und die DNA durch 30 min Inkubation in Elutionspuffer (1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei 65°C von der Membran gelöst. Die DNA wurde phenolisiert und EtOH gefällt.

2.7. Dephosphorylierung von DNA Restriktionsfragmenten und Oligonukleotiden

Restriktionsverdaute DNA wurde in 1x CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin) mit 1 U Alkalischer Phosphatase 30 min bei 37°C und 10 min bei 70°C inkubiert, phenolisiert und EtOH gefällt.

2.8. Kinasierung von DNA Restriktionsfragmenten und Oligonukleotiden

20 ng Oligonukleotid oder DNA Fragment wurden mit 3 µl 10x Kinasepuffer (500 mM Tris-base pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 5 µl γ-³²P-ATP (1,85 MBq) und 2 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) in einem 30 µl Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und Auffüllen auf 100 µl mit TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit Hilfe einer Sephadex G50 Säule abgetrennt. Die kinasierte DNA wurde mit EtOH gefällt, mit 80% EtOH gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Der Einbau wurde durch Messen von 2 µl des Ansatzes in einem Szintillationszähler ermittelt.

3. DNA Präparation

3.1. Herstellung kompetenter Bakterien

2 ml einer stationären über Nacht Kultur von *E.coli*/DH5 wurden zu 50 ml LB (10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) gegeben und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD_{550} von 0,3 erreicht war. Nach 10 min Inkubation in Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (5 min bei 3000xg, 2°C), in 10 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und nach 15 min Inkubation in Eis erneut 5 min bei 3000xg und 2°C zentrifugiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 2 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer

resuspendiert und sofort transformiert oder in CaCl_2 -Puffer mit 15% Glycerin aliquotiert und in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren.

3.2. Transformation von Bakterien

Ca. 10 ng DNA wurde mit 50 μl kompetenten Zellen auf Eis vermischt und 30 min in Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen 2 minütigen Hitzeschock bei 42°C gestoppt und die Bakterien nach Zugabe von 0,2 ml LB Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Je 0,1 ml des Transformationsansatzes wurden auf eine Platte mit Selektionsmedium (LB + 15 g/l Agar Agar + 0,1 mg/ml Ampicillin) ausplattiert und die Platten über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

3.3. Präparation von Plasmid-DNA

DNA wurde mit Quiagen-Maxisäulen nach der von Diagen beschriebenen Methode präpariert.

250 ml einer mit der zu präparierenden DNA transformierten *E.coli* Kultur wurde über Nacht in LB Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bei 37°C geschüttelt. Die stationären Bakterien wurden 5 min bei 3000 g zentrifugiert und das Pellet in 10 ml P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 + 0,1 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), 5 min Inkubation bei RT und Zugabe von 10 ml P3 (2,55 M KAc, pH 4,8) wurden die Ansätze 30 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml QBT (50 mM MOPS, 750 mM NaCl, 15% EtOH, 0,15% TritonX-100, pH 7,0) equilibrierte Quiagensäule gegeben und die Säule nach Durchlauf des Überstandes mit 30 ml QC (50 ml MOPS, 1 M NaCl, 15% EtOH, pH 7,0) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 15 ml QF (50 mM MOPS, 1,25 mM NaCl, 15% EtOH, pH 8,2). Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt, 30 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert, mit 80%igem EtOH gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in destilliertem Wasser aufgenommen.

4. DNA Gelelektrophorese

4.1. Agarosegele

0,8 - 1,5% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8) wurde durch Aufkochen verflüssigt und nach Zugabe von 1 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Agaroselösung in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen, in die ein Gelkamm eingesetzt wurde. Nach Erstarren des Gels wurde es mit TAE-Puffer (40 mM Tris, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8) überschichtet und der Gelkamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0, 10% Glycerol, 0,1% SDS, 0,02% Bromphenolblau) gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 1 - 2 h bei 100 mA. Die DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator durch UV Licht sichtbar gemacht und bei Bedarf fotografiert.

4.2. Polyacrylamidgele

Nicht denaturierende Acrylamidgele wurden zur Auftrennung von DNA-Protein Komplexen verwendet. Eine 4% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (30:0,8) mit 0,5x TBE (45 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA, pH 8,3) wurde in einer Saugflasche entgast und nach Zugabe von 0,025% APS und 0,25% TEMED zwischen zwei 14 x 15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen, die mit Agarose abgedichtet waren. Ein Gelkamm wurde eingesetzt und das Gel nach Beendigung der Polymerisation vertikal in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt. Die Gelkammer wurde mit 0,5x TBE gefüllt, der Gelkamm entfernt und die Geltaschen mit 0,5x TBE ausgespült. Nach einem Vorlauf von 30 min bei 100 V (RT oder 4°C) wurden die Proben aufgetragen und 90 min bei 100 V und RT oder 180 min bei 120 V und 4°C aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min in 10% Essigsäure fixiert, auf Whatman 3MM Papier übertragen, mit Frischhaltefolie abgedeckt, auf einem Vakuumtrockner bei 80°C getrocknet und mit Verstärkerfolie in einer Expositionskassette bei -80°C autoradiographiert.

4.3. Polyacrylamid-Harnstoffgele

Für eine 6%ige Acrylamid-Harnstofflösung wurden 252 g Harnstoff, 46,4 g Acrylamid und 1,6 g Bisacrylamid in 450 ml H₂O bidest gelöst, mit 20 g Amberlite 30 min gerührt, sterilfiltriert, mit 60 ml 10x TBE (1,35 M Tris, 75 mM Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,9 (mit Essigsäure)) versetzt und mit H₂O bidest. auf 600 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. 30 ml dieser Lösung wurden in einer Saugflasche entgast und nach Zugabe von 300 µl 10% APS und 30 µl TEMED luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten der Größe 19,5 x 38,5 cm mit 0,1 mm dicken Abstandhaltern gegossen. Ein Gelkamm wurde eingesetzt. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und zur gleichmäßigeren Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE in die Kammer gefüllt. Der Gelkamm wurde entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer ausgespült. Das Gel wurde durch 30 min Vorlauf bei 1200 V erwärmt. Die Proben wurden in 4 µl Sanger-Puffer (99% mit Amberlite deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,03% Xyalencyanol, 0,03% Bromphenolblau) 3 min gekocht und auf Eis abgekühlt. Nach erneutem Ausspülen der Geltaschen wurden die Proben aufgetragen und 3 h bei 1200 V aufgetrennt. Nach Abheben einer Glasplatte mit einem dünnen Spatel wurde das Gel mehrfach vorsichtig mit 10% Essigsäure übergossen, bis sich die Farbmarker gelb färbten. Das Gel wurde auf Whatman 3MM Papier übertragen, mit Frischhaltefolie abgedeckt, auf einem Vakuumtrockner bei 80°C getrocknet und mit Verstärkerfolie in einer Expositionskassette bei -80°C autoradiographiert.

5. DNA-Protein Bindungsanalysen

5.1. Herstellung von Zellextrakten für Gelretardationsanalysen

(verändert nach Eul et al. 1989)

Je zwei 15 cm Petrischalen wurden dicht mit T47D-CAT7 Zellen eingesät und am nächsten Tag nach Wechsel zu Medium ohne FCS 30 min bis 2 h mit EGF und/oder R5020 induziert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und in 0,5 ml Extraktionspuffer (10 mM Na-phosphat pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 15% Glycerol, 400 mM bzw. 60 mM KCl) in einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Das Zellysate wurde 40 min bei 100000xg und 2°C zentrifugiert und der Überstand nach Bestimmung der Proteinkonzentration in Aliquots in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2. Gelretardationsanalysen (Bandshift)

(verändert nach Eul et al. 1989)

10 - 20 µg Zellextrakt wurde in einem 20 µl Ansatz mit 4 µl 5x Bandshiftpuffer (30 mM Hepes pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% Ficoll), 2 µg poly(dI-dC), 10000 cpm kinasiertem PRE Oligonukleotid und in einigen Ansätzen einem Überschuß an nicht markiertem Oligonukleotid bei einer Endkonzentration von 60 mM KCl 30 min bei RT oder 4°C inkubiert. Die Oligonukleotid-Proteinkomplexe wurden auf 4% Polyacrylamidgelen mit 0,5x TBE (45 mM Tris-Base, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) als Laufpuffer 90 min bei 120 V und RT oder 3 h bei 4°C aufgetrennt. Die Gele wurden 10 min in 10% Essigsäure fixiert, auf 3MM Papier getrocknet und autoradiographiert.

6. Poly A⁺ RNA Präparation

(nach Aviv und Leder 1972)

Die Zellen wurden trypsiniert und in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 9 cm Platte ausgesät. Für jeden Ansatz wurden mindestens 3 Zellkulturschalen verwendet. Nach 16 h wurde das Kulturmedium durch Medium ohne FCS ersetzt und Induktoren zugegeben. Zur Ernte wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und in 10 ml kaltem STE (20 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA), 300 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 250 µl 20% SDS abgeschabt und in ein 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden 30 Sekunden mit einem Ultraturrax bei 50% Leistung homogenisiert und anschließend 45 min bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 1,1 ml 5 M NaCl (Endkonzentration 0,5 M) versetzt und nach Zugabe von ca. 100 mg in HSB (10 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% SDS) resuspendierter Oligo-dT-VII-Cellulose über Nacht bei RT auf einer Rotationsapparatur (Roto-Torque) gemischt. Die Oligo-dT-Cellulose wurde zusammen mit der adsorbierten poly A⁺ RNA 4 min bei 330xg abzentrifugiert und dreimal mit je 10 ml HSB gewaschen. Die E₂₆₀ des 3. Waschpuffers wurde gemessen, um sicherzustellen, daß die nicht an die Oligo-dT-Cellulose adsorbierte rRNA entfernt worden war (E₂₆₀ < 0,05). Mit 3x 1 ml H₂O bidest wurde die poly A⁺ RNA aus dem Adsorptionsmaterial eluiert. Nach Abzentrifugieren von Oligo-dT Resten wurden 250 µl der RNA-Lösung zur Konzentrationsbestimmung abgenommen und die restlichen 2,7 ml nach Zugabe von 10 µg tRNA und 200 µl 3 M NaAC in einem 15 ml Greinerröhrchen mit 7,5 ml EtOH gefällt. Die Oligo-dT-Cellulose wurde durch Waschen mit 2x 10 ml 0,1 M NaOH, 5 mM EDTA, 5x H₂O bidest und 2x HSB regeneriert.

7. S1 Nukleasekartierung

(nach Weaver und Weissmann 1979)

Aus T47D-CAT7 Zellen isolierte poly A⁺ RNA wurde mit einem 2,1 kb *Clal/HpaII* Fragment aus dem Plasmid p2.6 hybridisiert (Hynes et al. 1983), das 106 bp vom Transkriptionsstart des MMTV-LTR enthält. Das Plasmid wurde mit *HpaII* verdaut und dephosphoryliert. Nach Verdau mit *Clal* wurde das 2,1 kb Insert isoliert und für die S1-Reaktion am dephosphorylierten *HpaII* Ende kinasiert. Als interne Kontrolle zur Überprüfung der eingesetzten RNA Mengen wurde ein 3,0 kb *EcoRI/BglII* Fragment des in den CAT7 Zellen enthaltenen Plasmids pSV₂neo verwendet (Southern und Berg 1982), das an der *BglII* Stelle markiert war.

10 - 20 µg poly A⁺ RNA wurden zusammen mit 20000 cpm p2.6-Fragment und 5000 cpm pSV₂neo Fragment EtOH gefällt, mit 80% EtOH gewaschen, getrocknet und in 10 µl 80% Hybridisierungspuffer (40 mM Pipes pH 6,4, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 80% (v/v) Formamid) aufgenommen. Die Proben wurden gut gemischt, 10 min bei 70°C denaturiert und über Nacht bei 45°C hybridisiert. Zum Verdau mit S1 Nuklease wurden 100 µl S1-mix (60 U S1 Nuklease, 4 ng Träger DNA, 20 µl 5x S1 Puffer (1,25 M NaCl, 150 mM NaAc, 5 mM ZnSO₄)) zu den Ansätzen gegeben und 40 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol (50:48:2) gestoppt. Nach dem Phenolisieren und Zugabe von 2 µg Hefe RNA wurden die Proben EtOH gefällt, mit 80% EtOH gewaschen, getrocknet, in 4 µl Sangerpuffer (10 ml deionisiertes Formamid, 75 mg EDTA, 3 mg Xylencyanol, 3 mg Bromphenolblau) aufgenommen, 3 min bei 100°C gekocht, auf Eis abgekühlt und auf einem 6% Harnstoff-Polyacrylamidgel mit 1x TBE (1,35 M Tris, 75 mM Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,9) 3 h bei 1200 V aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min in 10% Essigsäure fixiert, getrocknet und mit Verstärkerfolie in einer Expositionskassette bei - 80°C autoradiographiert.

8. Analyse von Proteinen

8.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

In einer 96er Mikrotiterplatte wurden 97 μl 1:5 verdünnter Bio-Rad Proteinassay-Lösung mit 3 μl Protein gemischt und spektrometrisch bei 600 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve bestimmt, die aus verschiedenen konzentrierten BSA-Lösungen erstellt wurde.

8.2. CAT Assay

(Nach Gorman et al. 1982)

4 Stunden nach Induktion mit Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren wurden die stabil mit einem CAT-Konstrukt transfizierten Zellen mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 2,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) gewaschen, trypsinisiert und in PBS von der Kulturschale abgespült. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, erneut abzentrifugiert und in 200 μl 0,25 M Tris pH 7,8 resuspendiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch dreimaliges Schockfrieren (5 min im Trockeneis/EtOH Bad) und Auftauen (5 min 37°C Wasserbad). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min 13000xg), der Proteinextrakt in ein anderes Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

Der CAT Assay wurde in 200 μl Ansätzen durchgeführt, die jeweils 1,25 μl ^{14}C -Chloramphenicol (250 nCi), 20 μl 4 mM Acetyl-Coenzym A und gleiche Proteinmengen in 0,25 M Tris pH 7,8 enthalten. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat gestoppt und das Chloramphenicol durch Mischen aus der wässrigen Phase extrahiert. Durch 5 min Zentrifugieren wurden die Phasen getrennt. Die Ethylacetat-Oberphase wurde in ein anderes Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Ethylacetat in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Chloramphenicol wurde in 20 μl Ethylacetat gelöst und punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Nach 70 min Chromatographie in einer Glaskammer mit 100 ml Chloroform/Methanol (95:5) wurde die Dünnschichtplatte an der Luft getrocknet und in

einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie auf einem Röntgenfilm über Nacht bei -80°C exponiert.

8.3. Auswertung von CAT Assays

Durch die Chromatographie wurden die 1'- und 3'-acetylierten Chloramphenicolformen vom nicht acetylierten Chloramphenicol getrennt. Anhand des entwickelten Röntgenfilms konnten die Positionen der verschiedenen Chloramphenicolformen auf der Dünnschichtplatte markiert und anschließend ausgeschnitten werden. Für jeden Ansatz wurden die acetylierten und die nicht acetylierten Chloramphenicol-DC-Stücke in einem Szintillationszähler mit 6 ml Emulsifier Safe Lösung gemessen. Die prozentuale CAT-Aktivität wurde als Verhältnis der Aktivität des acetylierten Chloramphenicols zur Aktivität des insgesamt eingesetzten Chloramphenicols berechnet.

8.4. Immunpräzipitation des Progesteronrezeptors

Für jeden Ansatz wurden 2×10^6 Zellen auf 4,5 cm Petrischalen in RPMI1640 + 10% FCS ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in DMEM ohne Phosphat gewaschen und 1 h inkubiert. Anschließend wurden 250 μCi ^{32}P -Orthophosphat zugegeben und die Zellen nach 3 oder 16 h für 30 min mit Progesteron und/oder EGF induziert.

Zur Ernte wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 2,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) gewaschen, in 0,5 ml kaltem RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 7,8, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX100, 0,5% Na-deoxycholat, 0,1% SDS, 1 mM PMSF, 20 mM NaF, 100 μM Na-orthovanadat, 50 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin) abgeschabt und in ein 1,5 ml UZ-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Vortexen und 10 min Inkubation in Eis wurde das Lysat in einer Ultrazentrifuge 40 min bei 100000xg und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein anderes Eppendorfgefäß überführt. Zur Kontrolle des Phosphateinbaus wurden jeweils 2,5 μl des Überstandes in einem Szintillationszähler gemessen. Das übrige Zelllysate wurde mit 3 μl des Maus-Anti-Progesteronrezeptor-Antikörpers Let126 (2

mg/ml) versetzt und 4 h bei 4°C auf einem Rotatorque gemischt. Nach Zugabe von 20 µl in RIPA-Puffer suspendierter Protein-A-Sepharose und 2 µg Anti-Maus-Antikörper wurden die Ansätze weitere 4 h (oder über Nacht) auf dem Rotatorque inkubiert. Die Proben wurden 4x mit jeweils 1 ml kaltem RIPA-Puffer (ohne Proteaseinhibitoren) gewaschen, in 20 µl Laemmliprobenpuffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau) aufgenommen, 10 min gekocht, auf Eis abgekühlt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

8.5. Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen

(Laemmli 1970)

Proteingele wurden zwischen Glasplatten mit Abstandhaltern von 0,7 mm Dicke gegossen. Zur Auftrennung des Progesteronrezeptors wurden 7,5% Gele verwendet. Proteaseverdaute Rezeptorfragmente wurden auf höherprozentigen Gelen aufgetrennt. Für das Trenngel wurde die entsprechende Menge einer 30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30:0,8) mit 125 mM Tris pH 8,8 und H₂O in einer Saugflasche entgast. Nach Zugabe von jeweils 0,1% SDS und APS sowie 0,01% TEMED wurde die Lösung zwischen die mit Agarose abgedichteten Gelplatten gegossen und mit destilliertem H₂O überschichtet. Nach Abschluß der Polymerisation, sichtbar am Wiedererscheinen der Phasengrenze zwischen Gel und Überschichtung, wurde das Wasser abgegossen, eine 6% Sammelgellösung (375 mM Tris pH 6,8, 6% Acrylamidlösung, H₂O, nach Entgasen je 0,1% SDS, APS, TEMED) auf das Trenngel gefüllt und ein Gelkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in einer Elektrophoresekammer befestigt, die Kammer mit 1x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) aufgefüllt, der Gelkamm entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Die in Laemmliprobenpuffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau) gelösten Proteine wurden 3 min gekocht, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 70 V; im Trenngel wurde bei konstantem Strom 100 - 130 V angelegt. Sobald die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte, wurde

der Lauf gestoppt und das Gel entweder für den Western Blot verwendet oder 10 min in 10% Essigsäure fixiert, auf einem Vakuumtrockner bei 80°C getrocknet und in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie bei -80°C autoradiographiert.

8.6. Partielle Proteolyse des präzipitierten Progesteronrezeptors

Der Progesteronrezeptor wurde immunpräzipitiert und in Laemmlipobenpuffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β -Mercaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau) 5 min gekocht, um den Rezeptor von der Protein-A-Sepharose zu lösen. Der Überstand wurde in ein anderes Eppendorfgefäß übertragen und auf Eis abgekühlt.

2 μ g V8 Protease wurden in einem 20 μ l Ansatz 10 min bei 37°C mit dem Progesteronrezeptor inkubiert. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 1 μ l 500 mM EDTA gestoppt und die Proben bei -20°C eingefroren.

8.7. Western Blot

Der Progesteronrezeptor wurde immunpräzipitiert und auf einem SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine in Methanol und H₂O aktivierte Immobilon P Transfermembran (Polyvinylidendifluorid) gelegt und zwischen zwei mit Westernblotpuffer (5 l: 29 g Tris, 145 g Glycin, 0,01% SDS, 1 l Methanol) getränkte Whatman 3MM Papiere luftblasenfrei in eine Elektroblotapparatur eingespannt. Die Elektroblotkammer wurde mit Westernblotpuffer gefüllt und die Proteine 16 h bei 50 mA (350 V) transferiert.

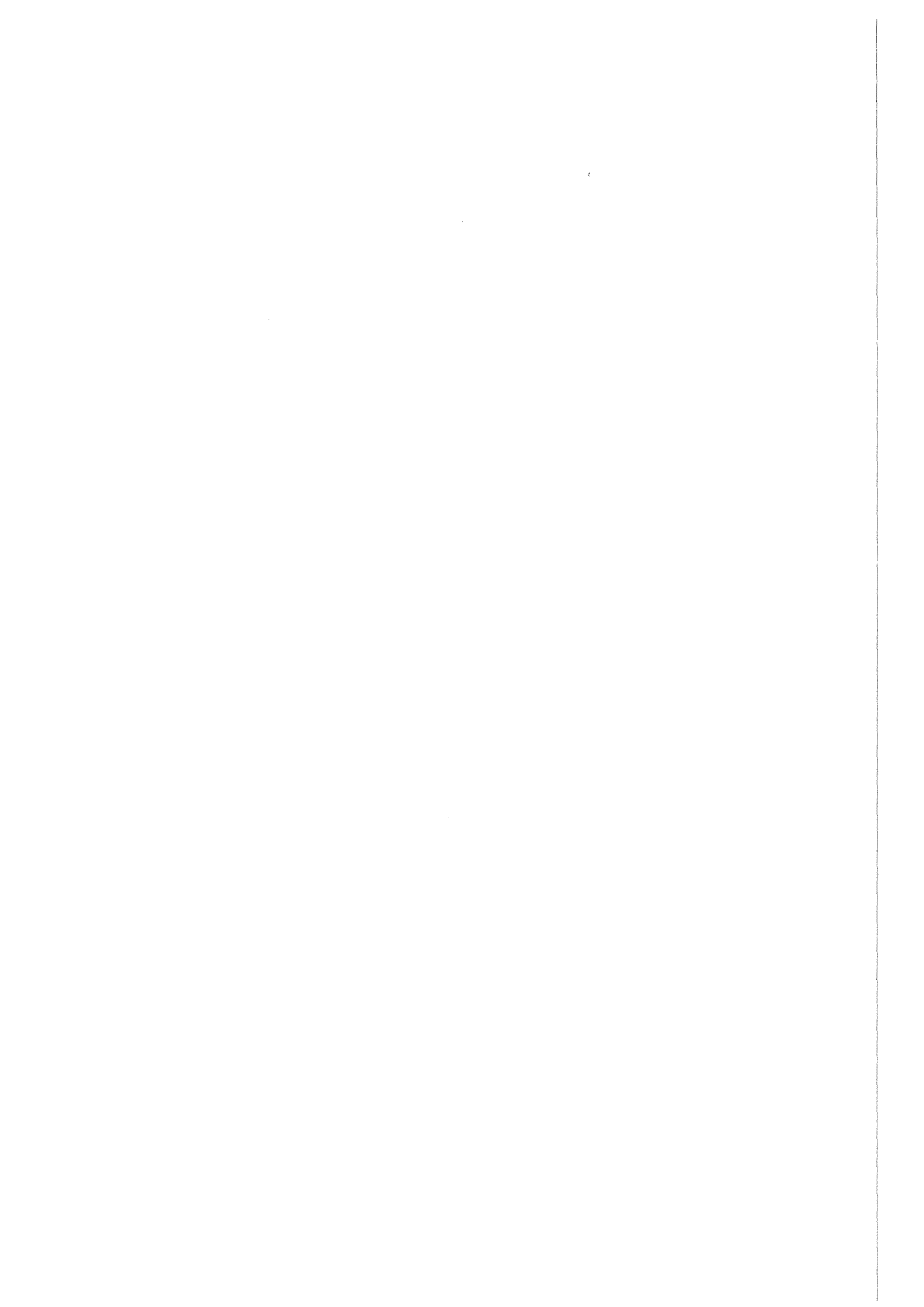
Zum Nachweis des Progesteronrezeptors wurde der Filter zunächst 1 h bei RT in 10% Magermilchpulver in PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) geschüttelt. Der Filter wurde mit 3 ml Inkubationspuffer (10% Milchpulver, 0,3% Tween20 in PBS) und 2 μ l des Anti-Progesteronrezeptor-Antikörpers Let126 (2 mg/ml) in einen Plastikbeutel eingeschweißt und 1 h bei RT auf einem Rotatorque gedreht. Anschließend wurde der Filter 3x mit 0,3% Tween20 in PBS gewaschen und mit 3 ml Inkubationspuffer und 3 μ l an Alkalische Phosphatase gekoppeltem Anti-Maus

Antikörper (1 mg/ml) erneut in einen Beutel eingeschweißt. Nach 1 h Rotation auf einem Rotatorque bei RT wurde der Filter 3x mit 0,3% Tween20 in PBS und 1x mit AP-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) gewaschen. Zur Anfärbung des an Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörpers wurde der Filter 1 bis 5 min in einer Lösung aus 2,5 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) in 50 µl Dimethylformamid und 5 mg Nitro Blue Tetracolum (NTB) in 15 ml AP-Puffer geschwenkt, bis deutliche Banden erkennbar waren. Der Filter wurde im Dunkeln aufbewahrt.

8.8. Analyse der phosphorylierten Aminosäuren

(nach Hunter und Sefton 1980)

Der *in vivo* radioaktiv markierte Progesteronrezeptor wurde mit dem Antikörper Let126 präzipitiert und 2 h bei 110°C in 100 µl 6 M HCl hydrolysiert. Zur Entfernung der Salzsäure und Konzentrierung der Proben wurden die Reaktionsgefäße nacheinander mit 1 ml, 600 µl, 300 µl, 100 µl, 40 µl und 10 µl destilliertem Wasser aufgefüllt und lyophilisiert. Das getrocknete Pellet wurde in 2 µl einer Mischung aus je 10 µg nicht markiertem Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin aufgenommen, auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen und mit Hilfe zweidimensionaler Elektrophorese (1. Dimension: 2 h bei 600 V in Essigsäure/Ameisensäure/H₂O im Verhältnis 78:25:897(Vol./Vol.), pH 1,9; 2. Dimension: 2 h bei 400 V in Essigsäure/Pyridin/H₂O im Verhältnis 50:5:945 (Vol./Vol.)) aufgetrennt. Die Phosphoaminosäurestandards wurden mit einer 0,2%igen Ninhydrinlösung angefärbt. Die Celluloseplatten wurden autoradiographiert und die radioaktiv markierten Phosphoaminosäuren durch Vergleich mit den gefärbten Markern identifiziert.



Ergebnisse

1. EGF verstärkt die progesteroninduzierte Transkription des MMTV Promotors

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, Epidermal Growth Factor) fördert Entstehung und Wachstum von Mammatumoren in mit MMTV (Maus Mamma Tumor Virus) infizierten Mäusen (*Kurachi et al. 1985*). Da die Tumorentstehung in diesen Mäusen von der Expression des MMTV abhängt, ist wahrscheinlich, daß EGF die durch Steroidhormone induzierte Transkription dieses Virus verstärkt. In der vorliegenden Arbeit wurde der synergistische Effekt von Progesteron und EGF auf die Genaktivierung untersucht. Die Experimente wurden in der menschlichen Mammaadenokarzinomzelllinie T47D durchgeführt, weil diese Zellen sowohl EGF Rezeptor als auch große Mengen an Progesteronrezeptor exprimieren (*Zajchowski et al. 1988, Horwitz et al. 1978*). Da T47D Zellen kein MMTV enthalten, wurden sie mit einem MMTV Konstrukt transfiziert.

Die Promotorsequenzen des MMTV sind im LTR (Long Terminal Repeat) des Virus lokalisiert (*Übersichtsartikel: Hynes et al. 1984*). Das Plasmid pMMTV-CAT enthält 5' von der MMTV-LTR-TATA Sequenz Promotorbereiche, die für Induktion durch Progesteron und andere Steroidhormone, für zelltypspezifische Expression und für die Basalaktivität dieses Vektors verantwortlich sind (*Übersichtsartikel: Beato 1989; Mink et al. 1990*). Die Hormonregulation des MMTV wird durch das HRE (Hormone Response Element) vermittelt, das im MMTV Promotor von -202 bis -59 bezogen auf den Transkriptionsstart lokalisiert ist (*Ponta et al. 1985, Cato et al. 1986*).

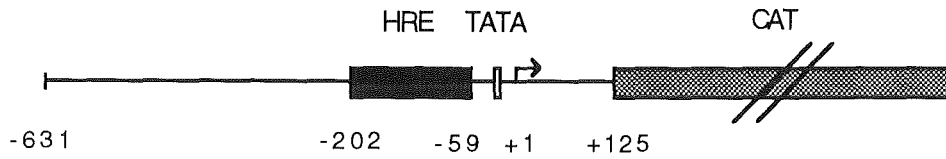


Abb.1 pMMTV-CAT enthält die Sequenzen von -631 bis +125 des MMTV-LTR fusioniert an das bakterielle CAT Gen.

Das Plasmid pMMTV-CAT enthält ein *HaeIII* Restriktionsfragment, das die Sequenzen 631 Basenpaare (bp) 5' vom Transkriptionsstart einschließlich des HREs und 125 bp des nicht translatierten MMTV Transkripts umfaßt und hormonabhängige Transkription vermittelt. Zur quantitativen Auswertung dieser Transkription wurde das *HaeIII* Fragment mit dem Gen für das bakterielle Enzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) fusioniert (*Cato et al. 1986*). Die Bildung dieses Enzyms ist ein Maß für die Transkriptionsstärke des MMTV-CAT Fusionsgens.

Die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase katalysiert die Inaktivierung des Antibiotikums Chloramphenicol durch Übertragung einer Acetylgruppe vom Acetyl-Coenzym A auf dieses Molekül. Mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie können zwei acetylierte Chloramphenicolformen, das 1'- und 3'-Acetyl-Chloramphenicol, vom nicht acetylierten Chloramphenicol getrennt werden. Bei Verwendung von radioaktiv markiertem Chloramphenicol im CAT Assay können die auf der Dünnschichtplatte aufgetrennten Chloramphenicolformen auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Durch stabile Transfektion von T47D Zellen mit den Plasmiden pMMTV-CAT und pSV₂neo zur Selektion auf Neomycinresistenz wurde der Zellklon T47D-CAT7 hergestellt (*Cato et al. 1987*). Behandlung dieser Zellen mit dem synthetischen Progesteron (Progestin) R5020, das im Gegensatz zu natürlichem Progesteron von den Zellen nicht metabolisiert wird, führt zur Aktivierung des MMTV Promotors und zur Synthese des CAT Enzyms, dessen Aktivität im CAT Assay bestimmt werden kann (*Cato et al. 1987*).

Behandlung von T47D-CAT7 Zellen mit dem Wachstumsfaktor EGF (Epidermal Growth Factor) führt nicht zu einer Änderung der Basalexpression des MMTV-CAT Konstrukts (Cato et al. 1989, Abb. 2). Bei gemeinsamer Induktion der Zellen mit R5020 und EGF wirken Steroidhormon und Wachstumsfaktor synergistisch auf die Aktivierung des MMTV Promotors. Die CAT Synthese bei Behandlung der Zellen mit einer Kombination beider Induktoren übersteigt die durch R5020 allein bewirkte CAT Expression um das 3- bis 5-Fache (Cato et al. 1989, Abb. 2).

Dieser EGF Effekt tritt nur in stabil transfizierten Zellklonen auf. Transient mit pMMTV-CAT transfizierte Zellen zeigen keinen Unterschied in der CAT Expression nach Induktion mit R5020 bzw. R5020 + EGF (nicht gezeigt).

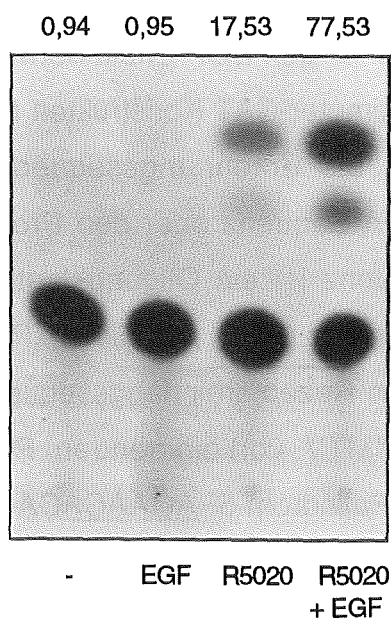


Abb.2 EGF erhöht die progesteroninduzierte Expression des MMTV Promotors in T47D Zellen. Stabil mit pMMTV-CAT transfizierte T47D Zellen wurden 6 h induziert wie in der Abb. angegeben (R5020 10^{-8} M, EGF 20 ng/ml). Die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase wurde im CAT Assay bei Einsatz von jeweils 10 μ g Protein pro Ansatz bestimmt. Die CAT Aktivität ist in nmol pro h und mg eingesetztem Protein angegeben.

2. Die cis-regulatorische Sequenz für den EGF Effekt ist identisch mit der Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor

Die HRE-Sequenz im MMTV-LTR, die die Progesteroninduktion dieses Promotors vermittelt, enthält vier Bindungsstellen für den Progesteronrezeptor und eine Bindungsstelle für das Protein NFI (*von der Ahe et al. 1985, Nowock et al. 1985, Miksicek et al. 1987*). Mutation der NFI Bindungsstelle beeinflusst die Progesteroninduktion nicht (*Cato et al. 1988*).

Auch für den EGF Effekt ist die NFI Bindungsstelle nicht erforderlich, da dieser Effekt in T47D Zellen auch durch das Plasmid pHC8 vermittelt wird (Abb. 3), das das HRE des MMTV mit einer Mutation in der Bindungssequenz für NFI fusioniert mit dem CAT-Gen enthält (*Cato et al. 1988*).

Um auszuschließen, daß andere Sequenzen des MMTV außer der Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor für den EGF Effekt notwendig sind, wurden T47D Zellen mit verschiedenen Promotor-CAT Konstrukten transfiziert. Die verwendeten Promotoren enthalten als Erkennungssequenz für den Transkriptionsinitiationskomplex eine TATA-Sequenz oder den Promotor des Thymidinkinasegens (tk). Vor diese Sequenz ist ein Oligonukleotid kloniert, das eine Progesteronrezeptorbindungssequenz (PRE) als Dimer (PRE2) oder Monomer (PRE1) enthält. Die verwendeten Rezeptorbindungssequenzen sind nicht identisch mit den im HRE des MMTV vorkommenden PREs. Das Konstrukt PREtkCAT enthält das perfekte Palindrom 5´ AGAACACAGTGTCT 3´ als synthetische Rezeptorbindungsstelle (*Krusekopf et al. 1991*). In den TATA-CAT Konstrukten wurde das PRE: 5´ TGTACAGGATGTCT 3´ aus dem Tyrosin-Amino-Transferase (TAT) Gen verwendet (*Jantzen et al. 1987, Klein-Hitpaß unveröffentlicht*).

Wie in Abb. 3 gezeigt, wird die R5020 Induktion aller getesteter Plasmide durch EGF verstärkt. Eine PRE-Konsensussequenz in Verbindung mit einer Erkennungssequenz für den Transkriptionsinitiationskomplex ist hinreichend für die Vermittlung des EGF Effekts. Die NFI Bindungsstelle oder andere Bereiche des HRE oder des übrigen MMTV Promotors sind nicht notwendig.

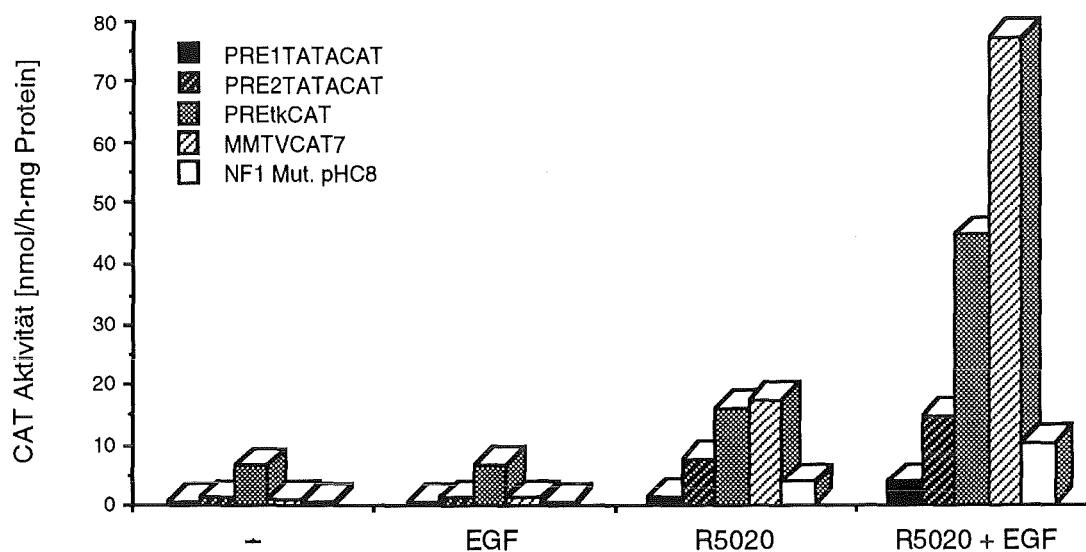


Abb.3 Das PRE des MMTV ist der den EGF Effekt vermittelnde Promotorbereich.

T47D Zellen wurden stabil mit PRE-CAT Vektoren bzw. der NF1 Mutante pHc8 transfiziert. Die erhaltenen Transfektanden wurden als Massenkclone kultiviert und ebenso wie der Klon MMTV-CAT7 5 h induziert wie in der Abb. angegeben (R5020 10^{-8} M, EGF 20 ng/ml). Die Abb. zeigt die CAT Aktivität der getesteten Klone in nmol pro h und mg eingesetztem Protein.

3. Hormonspezifität des EGF Effekts

3.1. Der EGF Effekt ist abhängig von der eingesetzten Progestinkonzentration

Der Wachstumsfaktor EGF beeinflusst die MMTV Transkription nur im Zusammenwirken mit dem Steroidhormon Progesteron. Die halbmaximale R5020 Konzentration für die MMTV Induktion durch dieses Progestin beträgt ca. 5×10^{-11} M (Cato et al. 1986, Abb. 4). Durch Verwendung unterschiedlicher Progestinkonzentrationen wurde getestet, ob der EGF Effekt bei denselben R5020 Konzentrationen auftritt wie die Genaktivierung durch R5020 und ob auch bei maximaler R5020 Induktion noch eine Steigerung der Genexpression

durch EGF erfolgt.

Bei einer Konzentration von 10^{-10} M R5020 ist sowohl eine Hormoninduktion als auch die synergistische Steigerung der Genaktivierung durch EGF sichtbar (Abb. 4). Steigende R5020 Konzentrationen führen zu einer Erhöhung der Wirkung von EGF auf die Aktivierung des MMTV Promotors. Der EGF Effekt kann nicht durch Einsatz hoher Progesteronkonzentrationen kompetiert werden.

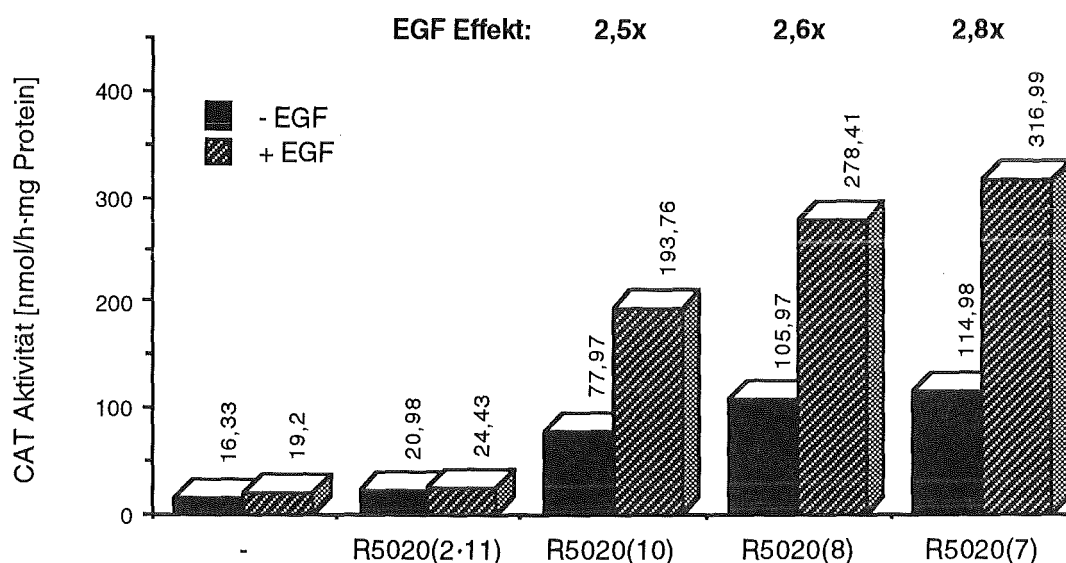


Abb.4 Erhöhung der Progesteronkonzentration führt zu einer Steigerung des EGF Effekts.

T47D-CAT7 Zellen wurden 4 h ohne bzw. mit 20 ng/ml EGF und steigenden Konzentrationen R5020 (2×10^{-11} bis 10^{-7} M) inkubiert. Nach Ernte der Zellen wurden die Proteine isoliert und die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase von 2 μ g Protein bestimmt und in nmol/h-mg Protein angegeben.

3.2. Wirkung von EGF auf die MMTV Induktion durch andere Steroidhormone

Außer dem Progesteronrezeptor können auch Glukokortikoid- und Androgenrezeptor an das HRE binden und die Transkription des MMTV induzieren (*Hynes et al. 1983, Cato et al. 1987*). Es wurde untersucht, ob EGF die MMTV Induktion dieser Steroidhormone verstärkt oder ob der EGF Effekt für den Progesteron-Progesteronrezeptorkomplex spezifisch ist.

T47D-CAT7 Zellen wurden mit den Glukokortikoiden RU28362 und Dexamethason, dem Androgen Dihydrotestosteron (DHT) und als Kontrolle mit dem Progesteron R5020 in Parallelansätzen jeweils ohne und mit EGF induziert. Die relative Stärke der vom MMTV Promotor gestarteten Transkription wurde als Aktivität der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase bestimmt. Die Abb. 5a zeigt für RU28362 und DHT einen 3- bis 4-fachen Anstieg der MMTV Transkription bei Induktion mit EGF und Hormon. Dieses Ergebnis stimmt mit dem EGF Effekt bei Induktion der Zellen mit R5020 überein. Dexamethasonkonzentrationen bis 10^{-6} M aktivieren den MMTV Promotor in T47D Zellen nicht (nicht gezeigt, *Cato et al. 1986*).

T47D Zellen enthalten große Mengen an Progesteronrezeptor, jedoch nur wenig Glukokortikoid- und Androgenrezeptor. Das Verhältnis von Progesteronrezeptor zu Glukokortikoidrezeptor beträgt 64 : 1, das von Progesteronrezeptor zu Androgenrezeptor 39 : 1 (*Horwitz et al. 1978*). Für RU28362 und DHT sind außerdem Bindungsaffinitäten an den Progesteronrezeptor beschrieben, die 0,4 bzw. 0,2% der Bindung von R5020 an seinen Rezeptor betragen (*Raynaud und Ojasoo 1983*). Die Bindungsaffinität von Dexamethason an den Progesteronrezeptor beträgt weniger als 0,02% der von R5020 (*Raynaud und Ojasoo 1983*). Da die durch R5020 induzierte MMTV Aktivierung bereits bei einer Hormonkonzentration von 10^{-10} M nahezu maximal ist (*Cato et al. 1987*, vgl. Abb. 4), könnte die in Abb. 5a beobachtete Aktivierung durch 100- bis 1000-fache Konzentrationen an RU28362 bzw. DHT auf Bindung dieser Hormone an den Progesteronrezeptor anstelle des Glukokortikoid- bzw. Androgenrezeptors beruhen.

Um zu testen, ob Glukokortikoid und Androgen in T47D Zellen die Bindung des Progesteronrezeptors an das PRE induzieren, wurden DNA-Bindungsexperimente durchgeführt. Hierbei werden in einem *in vitro* Ansatz radioaktiv markierte DNA Fragmente mit Zellextrakten inkubiert und unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bindung von Proteinen an die markierte DNA vermindert deren Mobilität im Gel. Auf dem Autoradiogramm des Gels sind solche Protein-DNA Komplexe als sogenannter "Bandshift" sichtbar (Garner und Revzin 1981).

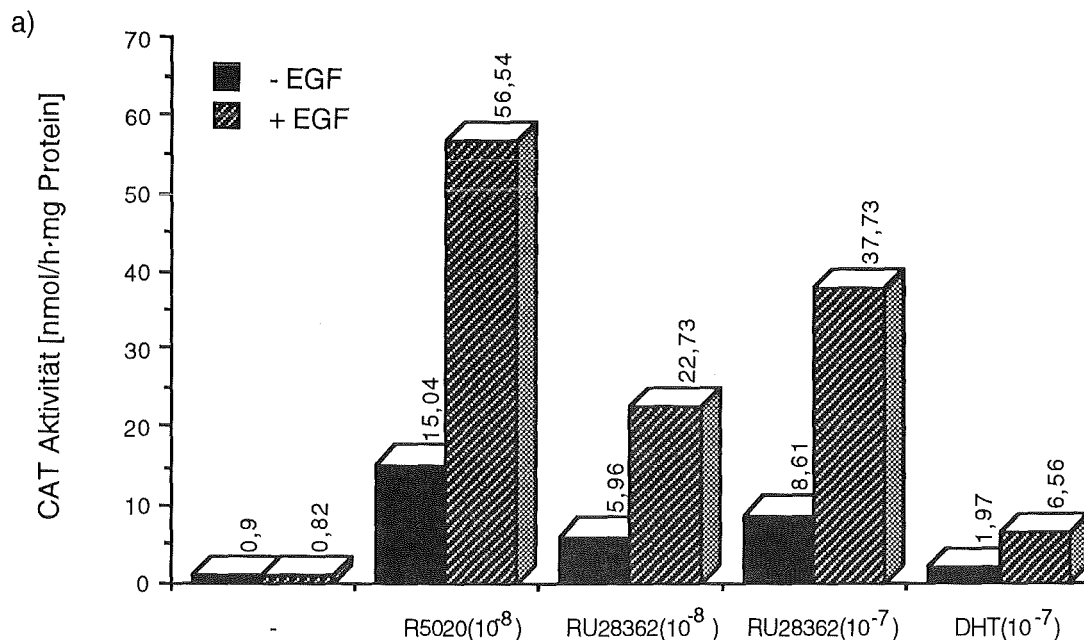
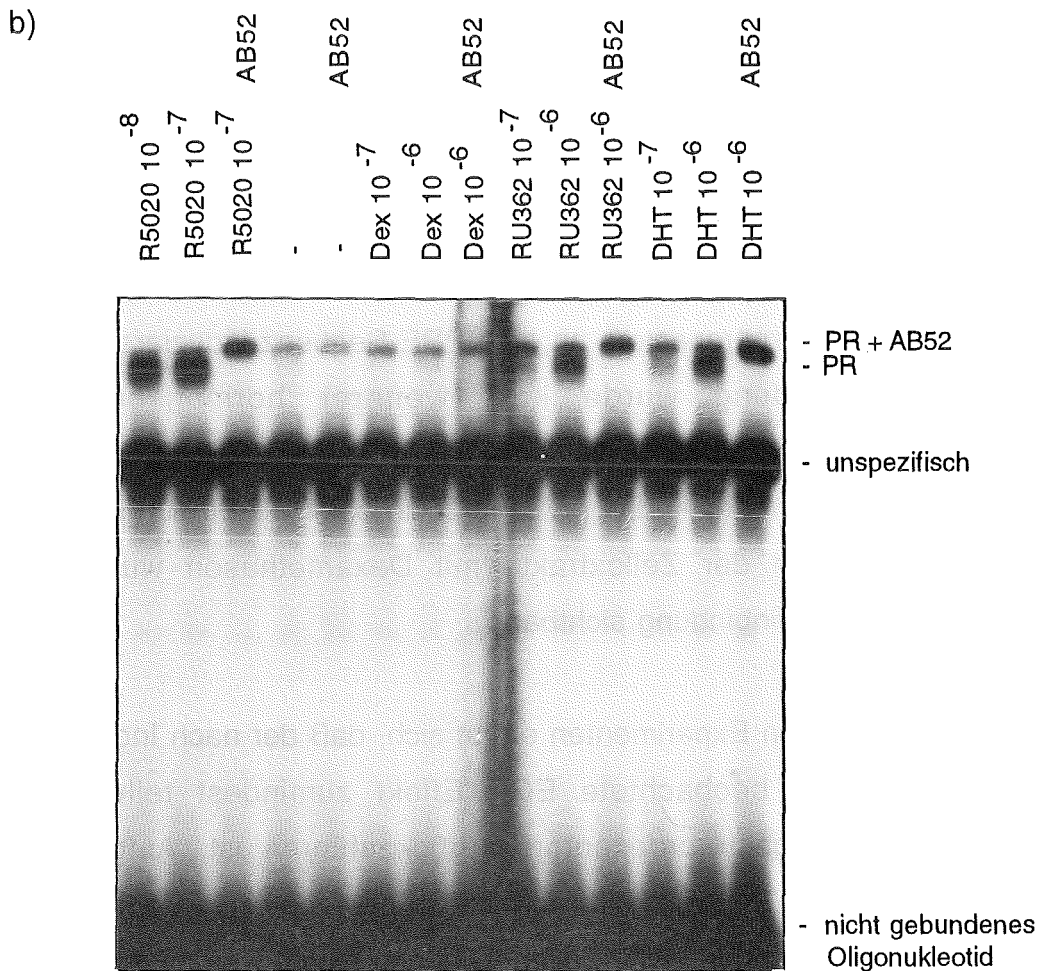


Abb. 5 Die Aktivierung des MMTV Promotors durch Glukokortikoid und Androgen erfolgt in T47D Zellen durch Bindung des Progesteronrezeptors an die PRE-Sequenz.

- a) Das Glukokortikoid RU28362 und das Androgen Dihydrotestosteron (DHT) zeigen im CAT Assay einen mit Progesteron vergleichbaren EGF Effekt. T47D-CAT7 Zellen wurden 6 h mit R5020 (10^{-8} M), RU28362 (10^{-8} und 10^{-7} M) und DHT (10^{-7} M) ohne bzw. mit EGF (20 ng/ml) induziert. Die Zellen wurden geerntet, die Proteine isoliert und die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase im CAT Assay bei Einsatz von $10 \mu\text{g}$ Protein bestimmt.



- b) Behandlung von Extrakten aus T47D-CAT7 Zellen mit RU28362 bzw. DHT induziert DNA-Bindung des Progesteronrezeptors. Extrakte wurden präpariert wie in Materialien und Methoden beschrieben. Jeweils 20 μ g Extrakt wurden 30 min auf Eis mit Hormon in den angegebenen Konzentrationen (von 10^{-8} bis 10^{-6} M) sowie ohne/mit 1 μ l Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper AB52 (2 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden Bandshiftpuffer, poly (dl-dC) und markiertes PRE Oligo zugegeben, die Bandshiftansätze 30 min bei RT inkubiert und auf einem 4% Polyacrylamidgel bei RT aufgetrennt. Dex: Dexamethason, PR: Progesteronrezeptor

Extrakte aus T47D-CAT7 Zellen wurden mit R5020, Dexamethason, RU28362, DHT und radioaktiv markiertem PRE-Oligonukleotid inkubiert und auf einem Gel aufgetrennt (Abb. 5b). In mit RU28362 und DHT behandelten Extrakten ist ein Protein-DNA Komplex erkennbar, der im Laufverhalten mit dem nach R5020 Behandlung gebildeten Komplex übereinstimmt. Die Mobilität der nach Behandlung mit RU28362, DHT und R5020 gebildeten Protein-DNA Komplexe wird durch Zugabe des Anti-Progesteronrezeptor-Antikörpers AB52 in gleicher Weise verringert. Dieses Experiment zeigt, daß RU28362 und DHT die Bindung des Progesteronrezeptors an eine PRE-Sequenz induzieren können. Außer dieser Bindung wurde kein weiterer hormonspezifischer PRE-Proteinkomplex gefunden, der auf eine Beteiligung von Glukokortikoidrezeptor oder Androgenrezeptor an der PRE-Bindung schließen ließe. Bei Inkubation der Zellextrakte mit Dexamethason wurde keine spezifische DNA-Proteinbindung sichtbar.

Aus den beschriebenen Experimenten ergibt sich, daß der nach Induktion mit RU28362 und DHT beobachtete EGF Effekt zumindest teilweise auf Aktivierung des Progesteronrezeptors zurückzuführen ist. Aufgrund der geringen Mengen an Glukokortikoid- und Androgenrezeptor im Verhältnis zum Progesteronrezeptor kann in T47D Zellen nicht untersucht werden, ob der EGF Effekt für den Progesteronrezeptor spezifisch ist. In anderen mit pMMTV-CAT stabil transfizierten Mammazellen (NMuMG, GR), die Glukokortikoidrezeptor, aber keinen Progesteronrezeptor exprimieren, konnte kein Einfluß von EGF auf die durch Dexamethason induzierte MMTV-CAT Transkription gefunden werden (nicht gezeigt).

4. Der EGF Effekt erfolgt durch Aktivierung des EGF Rezeptors

4.1. Der Wachstumsfaktor TGF α stimuliert die progesteronregulierte MMTV Transkription vergleichbar mit EGF

EGF bindet an den EGF Rezeptor und aktiviert ihn. Wenn diese Aktivierung des EGF Rezeptors für den EGF Effekt notwendig ist, sollte auch der Wachstumsfaktor TGF α (Transforming Growth Factor α), ein natürlicher Ligand für die Aktivierung des EGF Rezeptors, die Progestininduktion des MMTV Promotors verstärken.

Abb. 6 zeigt die MMTV-CAT Aktivierung nach Behandlung der Zellen mit den Wachstumsfaktoren EGF und TGF α in Kombination mit R5020. TGF α zeigt den gleichen synergistischen Effekt auf die R5020 induzierte MMTV Transkription wie EGF. Bei Induktion der Zellen mit R5020 und anderen Wachstumsfaktoren, deren Wirkung keine Aktivierung des EGF Rezeptors beinhaltet (IGFI, Insulin und TGF β_1), konnte keine Änderung in der CAT Synthese im Vergleich zur Induktion mit R5020 alleine festgestellt werden (nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß die Aktivierung des EGF Rezeptors für den EGF Effekt notwendig ist.

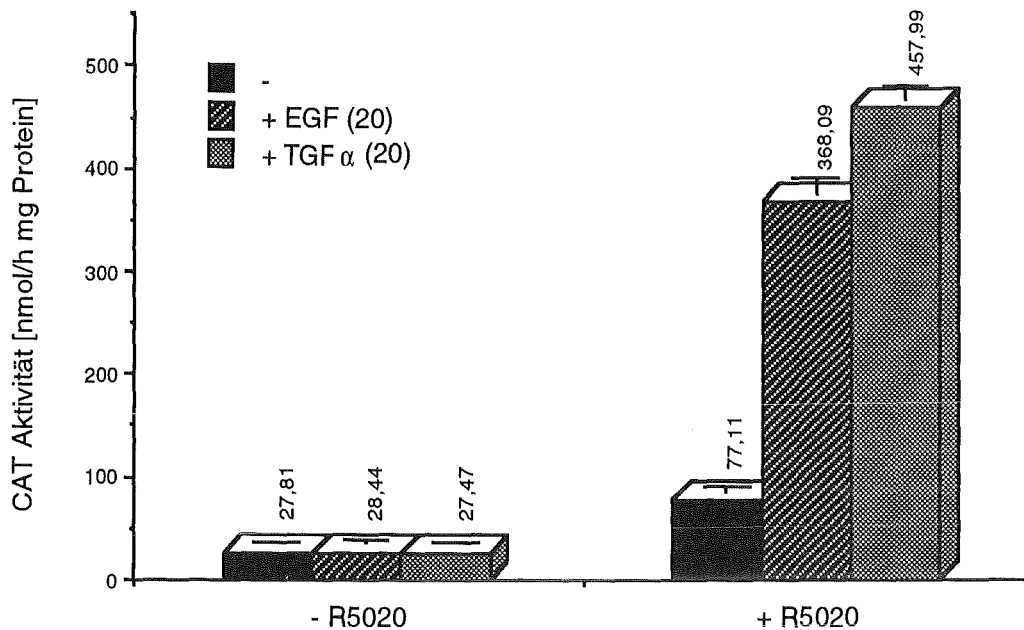


Abb. 6 TGF α zeigt eine EGF vergleichbare Steigerung der progesteroninduzierten MMTV Expression.

T47D-CAT7 Zellen wurden 4 h mit EGF (20 ng/ml), TGF α (20 ng/ml) und/oder R5020 (10^{-8} M) induziert. Für den CAT Assay wurden 2 μ g Protein eingesetzt. Für zwei Parallelansätze wurde die CAT Aktivität in nmol/h·mg Protein sowie die Abweichung vom Mittelwert σ_{n-1} bestimmt.

Anmerkung: σ_{n-1} wurde als Quadratwurzel aus $(\sum x^2 - n \cdot \text{MWx}) / (n - 1)$ berechnet. x: Meßwert, MWx: Mittelwert der Meßwerte, n: Anzahl der Messungen

In mehreren Abbildungen in dieser Arbeit sind Abweichungen von zwei Meßwerten aus Parallelansätzen angegeben. Bei dieser kleinen Anzahl von Werten gibt σ_{n-1} die Abweichung vom Mittelwert an. Eine statistische Signifikanz kann jedoch nicht berechnet werden. Alle Experimente wurden mehrfach durchgeführt. Die Ergebnisse verschiedener Versuche konnten jedoch nicht in einer Abbildung ausgewertet werden, da die R5020 Induktion in den verwendeten Zellen starken Schwankungen unterliegt. Die untersuchten Effekte sind in unabhängigen Experimenten reproduzierbar.

4.2. Bestimmung der halbmaximalen Konzentrationen von EGF und $TGF\alpha$ für die Steigerung der R5020 induzierten MMTV Expression

Für durch EGF vermittelte Wirkungen in Mammaepithelzellen sind halbmaximale Konzentrationen von 0,08 nM, 0,1 nM und 0,2 nM beschrieben worden (Koga et al. 1989, Sarup et al. 1988, Rao et al. 1987b). Um die Annahme, daß der EGF Effekt eine Aktivierung des EGF Rezeptors erfordert, weiter zu erhärten, wurden die halbmaximalen Konzentrationen von EGF und $TGF\alpha$ für die Verstärkung der Progestininduktion des MMTV Promotors ermittelt und mit den Literaturdaten verglichen.

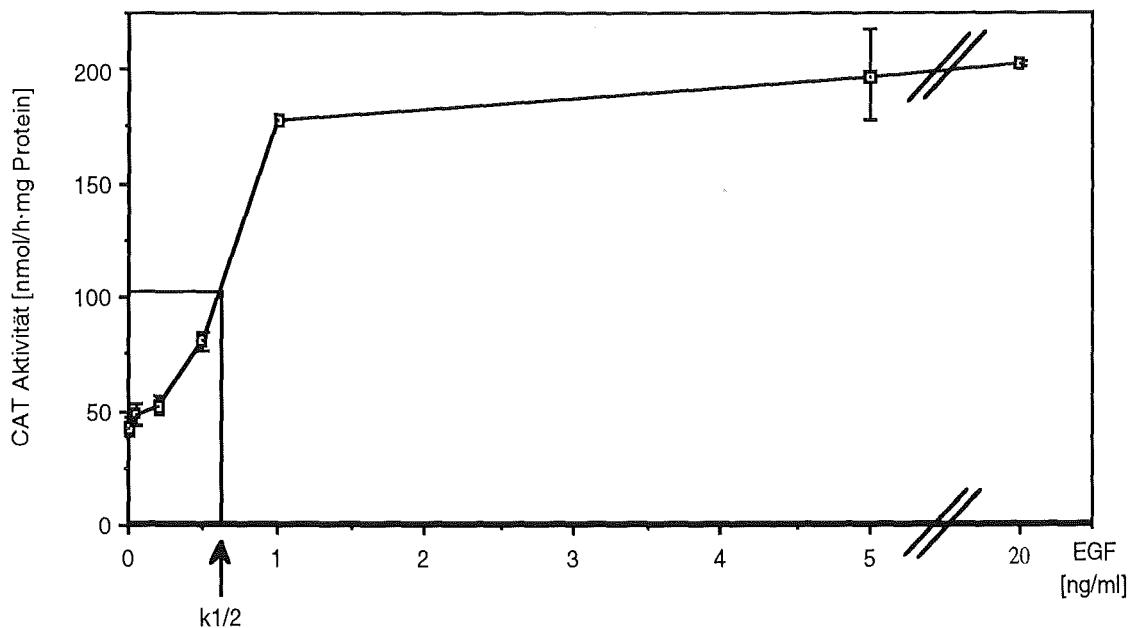


Abb. 7 Die halbmaximale EGF Konzentration für den EGF Effekt ($k_{1/2}$) in T47D-CAT7 Zellen beträgt 0,65 ng/ml (0.11×10^{-9} M). T47D-CAT7 Zellen wurden 4 h mit R5020 (10^{-8} M) und EGF in den in der Abb. angegebenen Konzentrationen induziert. Zur Bestimmung der CAT Aktivität wurden 5 μ g Protein eingesetzt. Für jede EGF Konzentration wurde der Mittelwert von 2 Ansätzen gebildet. Die Abweichung σ_{n-1} ist als Balken eingetragen.

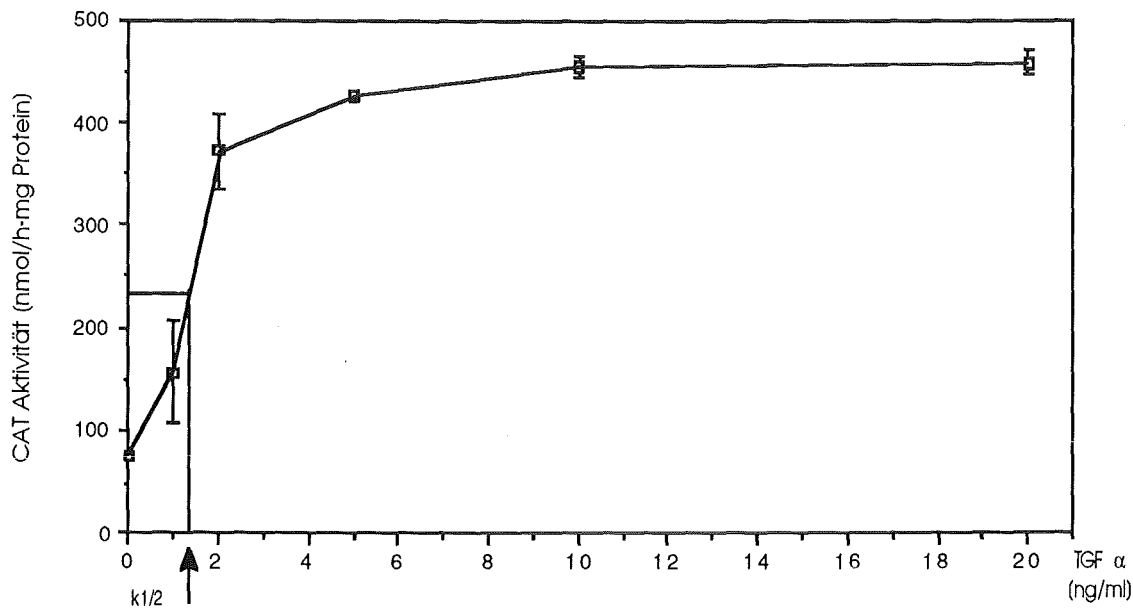


Abb.8 Die halbmaximale TGF α Konzentration für die Steigerung der R5020 Induktion des MMTV Promotors in T47D Zellen beträgt 1,3 ng/ml ($0,23 \times 10^{-9}$ M).

T47D-CAT7 Zellen wurden 4 h mit R5020 (10^{-8} M) und TGF α in den in der Abb. angegebenen Konzentrationen induziert. Die CAT Aktivität von jeweils 2 μ g Protein wurde bestimmt und in nmol/h·mg Protein aufgetragen. Für jeden in der Abb. eingetragenen Punkt wurden zwei Versuchsansätze ausgewertet. Die Abweichung vom Mittelwert σ_{n-1} ist eingetragen.

Zur Bestimmung der benötigten Konzentrationen an EGF und TGF α für ihren Effekt auf die R5020 induzierte Genexpression wurden T47D-CAT7 Zellen mit R5020 und steigenden Konzentrationen der Wachstumsfaktoren behandelt und die MMTV Aktivierung im CAT Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 für EGF und in Abb. 8 für TGF α ausgewertet.

Als halbmaximale Konzentration für die Steigerung der R5020 induzierten MMTV Expression wurde 0,65 ng/ml EGF bestimmt, was 0,11 nM entspricht (Das Molekulargewicht von EGF beträgt 6045 D, *Stoscheck und King 1986*). Dieses Ergebnis stimmt mit den oben genannten Literaturdaten für EGF Wirkungen in Mammazellen überein und unterstützt die Annahme, daß die Aktivierung des EGF Rezeptors für den EGF Effekt erforderlich ist.

Die halbmaximale Steigerung der R5020 induzierten MMTV Expression durch TGF α erfolgt bei einer TGF α Konzentration von 1,3 ng/ml bzw. 0,23 nM

(Molekulargewicht TGF α : 5547 D). Auch dieses Ergebnis deutet auf eine Aktivierung des EGF Rezeptors hin, da die Bindungsaffinität von TGF α an den EGF Rezeptor 55% der Bindungsaffinität von EGF entspricht (*Winkler et al. 1986*).

4.3. Hemmung des EGF Effekts durch Tyrphostin, einen spezifischen Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors

Bindung von EGF an den EGF Rezeptor führt zur Aktivierung einer Tyrosinkinase, die Bestandteil des Rezeptors ist (*Ushiro und Cohen 1980*). Diese Tyrosinkinaseaktivität ist Voraussetzung für die durch EGF bewirkten Veränderungen in der Zelle wie Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, EGF spezifische Genaktivierung und Stimulierung des Zellwachstums; Inaktivierung der Tyrosinkinase durch einen Aminosäureaustausch verhindert diese Reaktionen der Zelle auf die Ligandbindung des EGF Rezeptors (*Chen et al. 1987, Honegger et al. 1987*).

Die Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors kann durch Tyrphostine spezifisch gehemmt werden (*Yaish et al. 1988, Lyall et al. 1989, Posner et al. 1989*). Behandlung von T47D-CAT7 Zellen mit dem Tyrphostin RG50864 wurde neben den beschriebenen Hinweisen auf Aktivierung des EGF Rezeptors als weiterer Test für die Beteiligung der Tyrosinkinase des EGF Rezeptors am EGF Effekt durchgeführt.

In Abb. 9 ist die CAT Aktivität von mit R5020 bzw. R5020 + EGF induzierten Zellen in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen des Tyrphostins RG50864 dargestellt. Die R5020 Induktion des MMTV Promotors wird durch Inhibitorkonzentrationen bis 100 μ M nur geringfügig beeinflusst, während die durch R5020 + EGF bewirkte MMTV-CAT Transkription bereits bei 50 μ M Tyrphostin nahezu halbiert ist.

Der Versuch zeigt eine deutliche Hemmung des EGF Effekts durch RG50864. Die Aktivierung der Tyrosinkinase des EGF Rezeptors ist folglich notwendig für die EGF Wirkung auf die HRE regulierte Transkription.

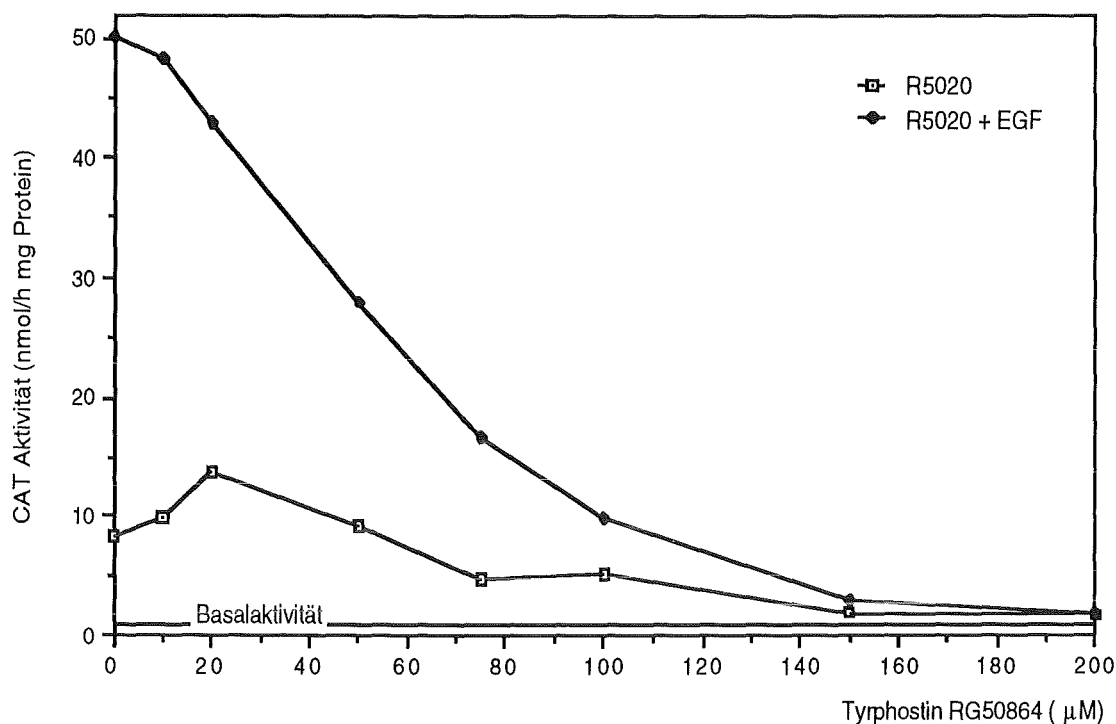


Abb. 9 Tyrphostin, ein spezifischer Inhibitor der Tyrosinkinase des EGF Rezeptors, hemmt den EGF Effekt. T47D-CAT7 Zellen wurden mit den in der Abb. aufgeführten Konzentrationen des Tyrphostins RG50864 behandelt. Nach 30 min wurden R5020 (10^{-8} M) und EGF (20 ng/ml) zugegeben und die Zellen 5 h später geerntet. In der Graphik ist die CAT Aktivität von jeweils 15 µg Protein in nmol/h·mg Protein aufgetragen.

In Kapitel 4 wurde gezeigt, daß der EGF Effekt eine Aktivierung der Tyrosinkinase des EGF Rezeptors erfordert: Die beiden Liganden des EGF Rezeptors stimulieren die R5020 regulierte Transkription in gleicher Weise. Die halbmaximalen Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren für die Auslösung dieses Effekts entsprechen den Literaturdaten für zelluläre Wirkungen von EGF und TGF α . Der EGF Effekt wird durch einen spezifischen Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors gehemmt. Im folgenden Kapitel wird untersucht, welche molekularen Mechanismen im Anschluß an die Aktivierung der EGF Rezeptor-Tyrosinkinase den EGF Effekt bewirken.

5. Mechanismus des EGF Effekts nach Aktivierung des EGF Rezeptors

5.1. Kinetik des EGF Effekts

Als Folge einer Behandlung von Zellen mit EGF sind zahlreiche Veränderungen in den Zellen beschrieben worden, die nach unterschiedlichen Zeiten auftreten. EGF induzierte Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen ist bereits nach 0,5 - 1 min meßbar (*Hunter und Cooper 1981, Margolis et al. 1989*). EGF verringert innerhalb von 2 min die Bindung von Progesteron an seinen Rezeptor (*Sarup et al. 1988*). Nach 15 min sind durch EGF induzierte Transkripte der Onkogene *c-fos* und *c-jun* nachweisbar, während die EGF induzierte und proteinsyntheseabhängige Expression des Gens für die Metalloproteinase Stromelysin erst nach 4 - 8 h auftritt (*McDonnell et al. 1990*). Eine Stimulierung des Zellwachstums durch EGF kann erst nach mehreren Tagen beobachtet werden (*Sarup et al. 1988*). Um einen Hinweis auf den molekularen Mechanismus zu erhalten, der dem EGF Effekt zugrunde liegt, wurde die Kinetik des EGF Effekts bestimmt und mit den Zeiten für EGF induzierte proteinsyntheseunabhängige und -abhängige Genexpression verglichen.

Der EGF Effekt auf die Expression progesteronregulierter Gene erfolgt auf der Ebene der Transkription (*Krusekopf et al. 1991*). Als direktes Maß für die Transkriptionsrate wurde die Menge der vom MMTV Promotor initiierten RNA zu verschiedenen Zeiten bestimmt.

Um festzustellen, innerhalb welchen Zeitraums nach Induktion der Zellen der EGF Effekt auftritt und wie lange er anhält, wurden Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Induktion geerntet und die poly A⁺ RNA isoliert. Zur Identifizierung der vom HRE kontrollierten MMTV-CAT RNA wurde die isolierte RNA mit einem radioaktiv markierten DNA Fragment hybridisiert, das aus Sequenzen des MMTV-LTR einschließlich des Transkriptionsstarts und 106 bp der transkribierten Region besteht (siehe Abb. 10). Nach Hybridisierung der homologen Bereiche der MMTV DNA und des MMTV Transkripts wurden einzelsträngige DNAs und RNAs mit der einzelstrangspezifischen S1 Nuklease

verdaut. Das durch Hybridisierung an die RNA vor Abbau geschützte 106 Nukleotide umfassende radioaktiv markierte DNA Fragment wurde elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Intensität der Schwärzung des Röntgenfilms ist ein Maß für die Menge der aus den Zellen isolierten Transkripte des MMTV Promotors. Die Methode der S1 Analyse ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

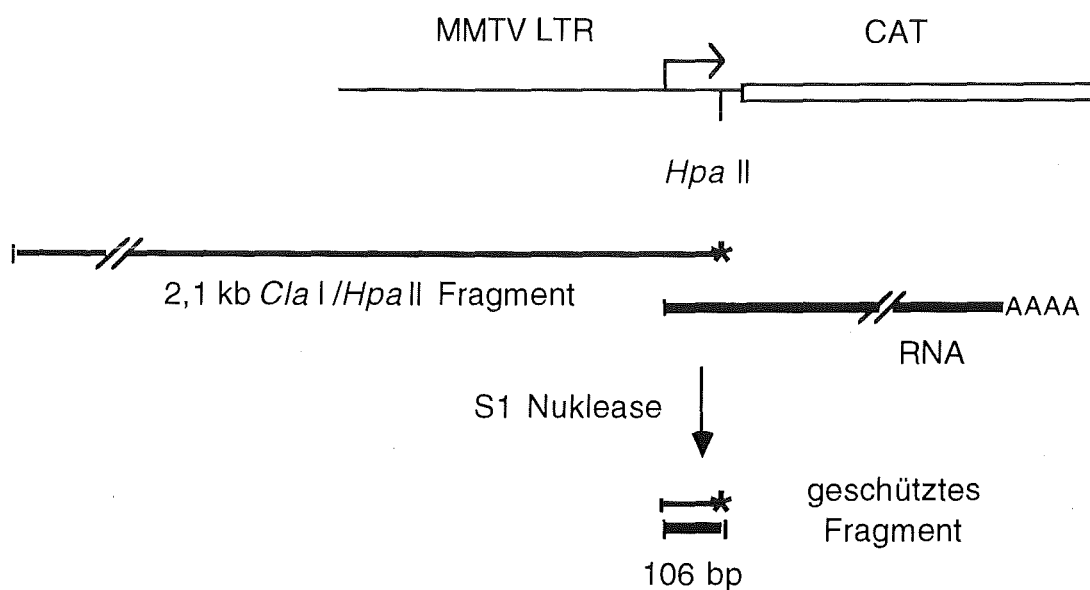


Abb. 10 Die Bestimmung der Menge von MMTV Transkripten durch S1 Analyse ist schematisch dargestellt (Abb. in Anlehnung an S. Mink 1988).

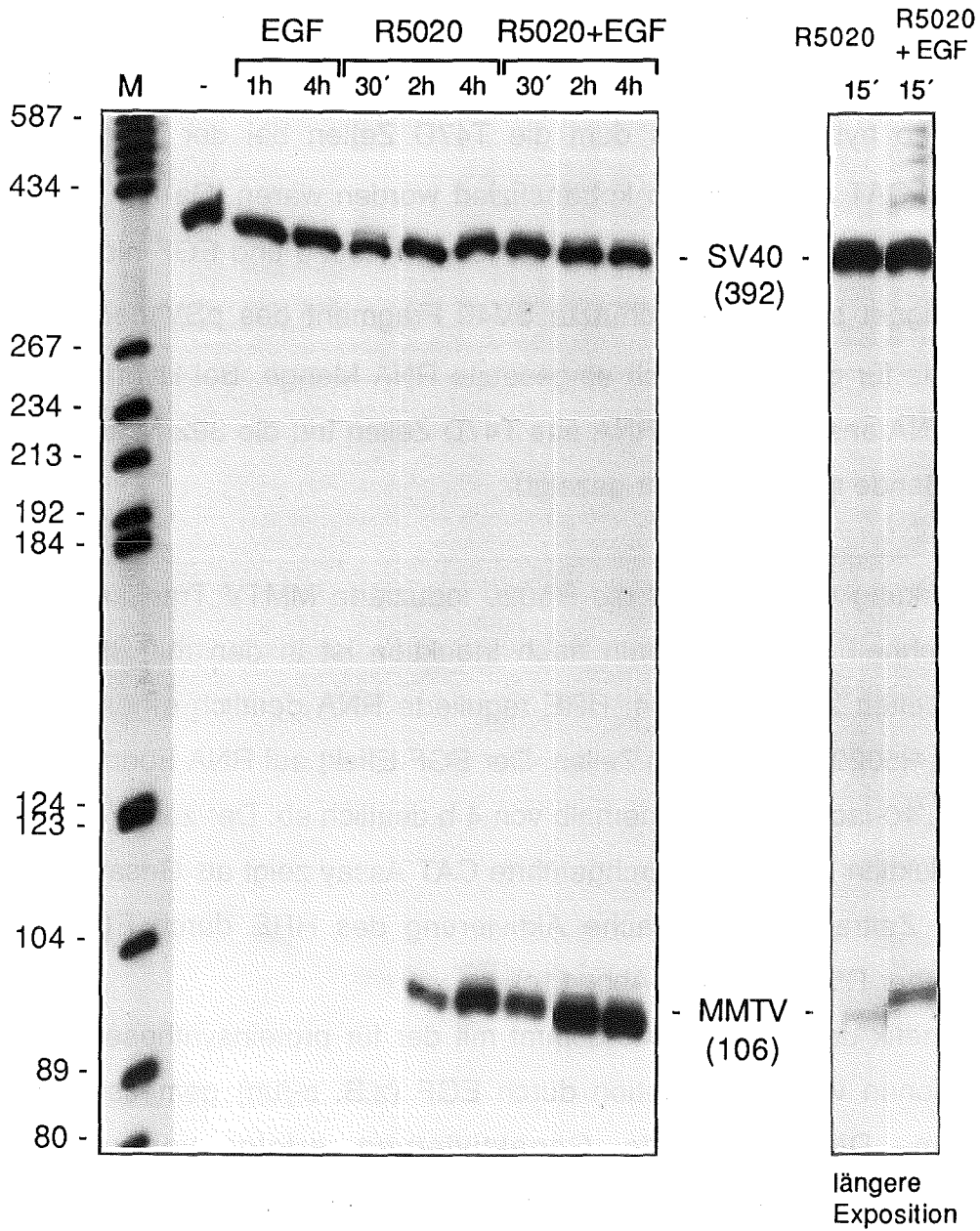
Das *Cla*I/*Hpa*II Fragment wurde aus dem Plasmid pL 2.6 isoliert und an der *Hpa*II Schnittstelle endmarkiert. Dieses Fragment kann in einem Bereich von 106 bp mit dem im MMTV-LTR startenden MMTV-CAT Transkript hybridisieren. Die nicht hybridisierenden Einzelstrangbereiche wurden mit S1 Nuklease verdaut. Die durch die homologe RNA geschützten 106 Nukleotide des markierten Fragments wurde auf einem Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 11a).

Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an poly A⁺ RNA wurde die RNA neben dem MMTV Fragment mit einem 3,0 kb *EcoRI/BglII* Fragment aus dem Plasmid pSV₂neo hybridisiert, mit dem die T47D Zellen bei der Transfektion mit pMMTV-CAT zur Selektion kotransfiziert worden waren. Da die Transkription des pSV₂neo durch Induktion der Zellen mit R5020 und EGF nicht beeinflusst wird, eignet sich das geschützte SV40 Fragment des pSV₂neo als interne Kontrolle für die im Versuch eingesetzte RNA Menge. Bei Hybridisierung mit Hefe RNA anstelle von A⁺RNA aus T47D Zellen tritt die 392 Nukleotide große SV40 Bande nicht auf (nicht gezeigt).

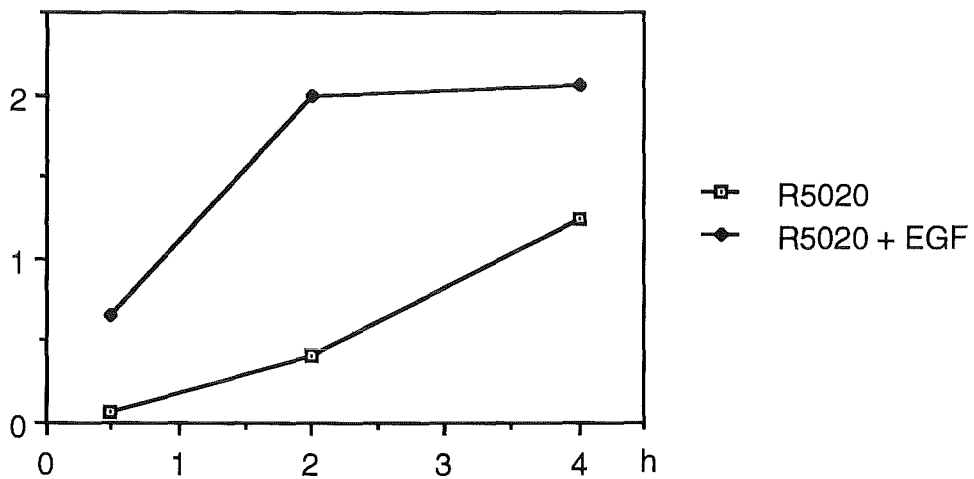
Die Wirkung von EGF auf die R5020 induzierte MMTV Transkription erfolgt sehr schnell. Bereits 15 min nach Induktion ist in den mit R5020 + EGF behandelten Zellen die vom HRE regulierte RNA deutlich erhöht gegenüber nur mit R5020 behandelten Zellen. Der EGF Effekt auf RNA Ebene ist nach 30 min ca. 10-fach und fällt innerhalb von 4 h deutlich ab. Der zum Vergleich nach 4 h Induktion der Zellen durchgeführte CAT Assay zeigt als Gesamteffekt über diesen Zeitraum eine 3-fache Aktivierung des HRE durch EGF + R5020 gegenüber R5020 alleine (Abb. 11c).

Die Kinetik des EGF Effekts stimmt mit der für proteinsyntheseunabhängige Induktionen von Transkription durch EGF (z.B. *c-jun*) gemessenen Kinetik überein. Diese schnelle Genaktivierung erfolgt vermutlich durch Phosphorylierung von Proteinen durch die Tyrosinkinase des EGF Rezeptors, die zur Aktivierung weiterer Kinasen führen kann.

a)



b)



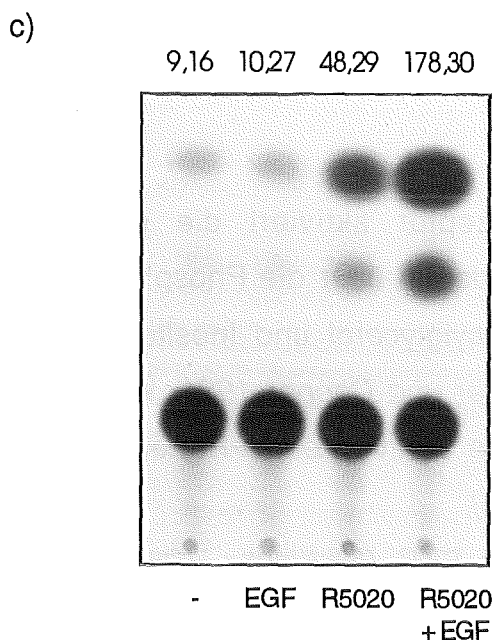


Abb. 11 Der EGF Effekt ist bereits nach 15 min auf RNA Ebene sichtbar und fällt innerhalb von 4 h deutlich ab.

- a) T47D-CAT7 Zellen wurden mit EGF (20 ng/ml) und/oder R5020 (10^{-8} M) induziert. Nach den in der Abb. angegebenen Zeiten wurde poly A⁺ RNA isoliert und jeweils 15 µg dieser RNA in einer S1 Nuklease-Kartierungsanalyse mit einseitig radioaktiv markierten SV40- und MMTV-Sequenzen hybridisiert. Die durch Hybridisierung vor Abbau durch Nuklease S1 geschützten SV40 (392 Nukleotide) und MMTV (106 Nukleotide) Sequenzen wurden auf 6% Polyacrylamid-Harnstoffgelen aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde mit dem Restriktionsenzym *Hae*III verdauter und endmarkierter pBR322 aufgetragen (M). Die Fragmentgrößen sind in Nukleotiden angegeben.

ˆ: Minuten, h: Stunde(n)

Die Unterschiede im Laufverhalten der 106 Nukleotide großen MMTV Bande sind eine Folge der Elektrophorese. Bei diesem Gel ist die Mobilität der aufgetragenen Proben in der Gelmitte höher als an den Rändern.

- b) Die Spuren der in a) gezeigten S1 Nukleasekartierung mit Behandlung der Zellen mit R5020 und R5020 + EGF von 30 min bis 4 h wurden densitometrisch ausgewertet. Die Intensität der Schwärzung der Banden des MMTV Transkripts wurde auf die der zugehörigen SV40 Banden normiert. Aufgetragen ist die relative Dichte der Banden zu den untersuchten Zeiten.
- c) Parallel zur poly A⁺ RNA Isolierung wurden nach 4 h Induktion der Zellen (EGF 20 ng/ml, R5020 10^{-8} M) CAT Assays mit 5 µg Protein durchgeführt. Die CAT Aktivität ist in nmol/h·mg Protein angegeben.

5.2. Synergistischer Effekt von TPA und R5020 auf die Aktivierung des HRE

Die Bindung von EGF an seinen Rezeptor aktiviert die endogene Tyrosinkinase des EGF Rezeptors, die wiederum über die Phospholipase C Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Diacylglycerol und Inositolphosphat hydrolysiert (Ushiro und Cohen 1980, Hunter und Cooper 1981, Wahl et al. 1988). Diacylglycerol ist ein Aktivator für die Serin/Threonin-Proteinkinase C (PKC) (Castagna et al. 1982, Nishizuka 1984).

Der Tumorpromotor TPA aktiviert ebenfalls PKC (Nishizuka 1984). Um zu testen, ob der EGF Effekt auf die R5020 abhängige Stimulierung der Transkription HRE regulierter Gene durch Aktivierung von PKC erfolgt, wurde der Effekt von TPA auf die Hormoninduktion des HRE im CAT Assay bestimmt. TPA verstärkt die R5020 induzierte Transkription des MMTV-CAT Konstrukts vergleichbar mit EGF (Abb. 12). Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung von PKC am EGF Effekt hin.

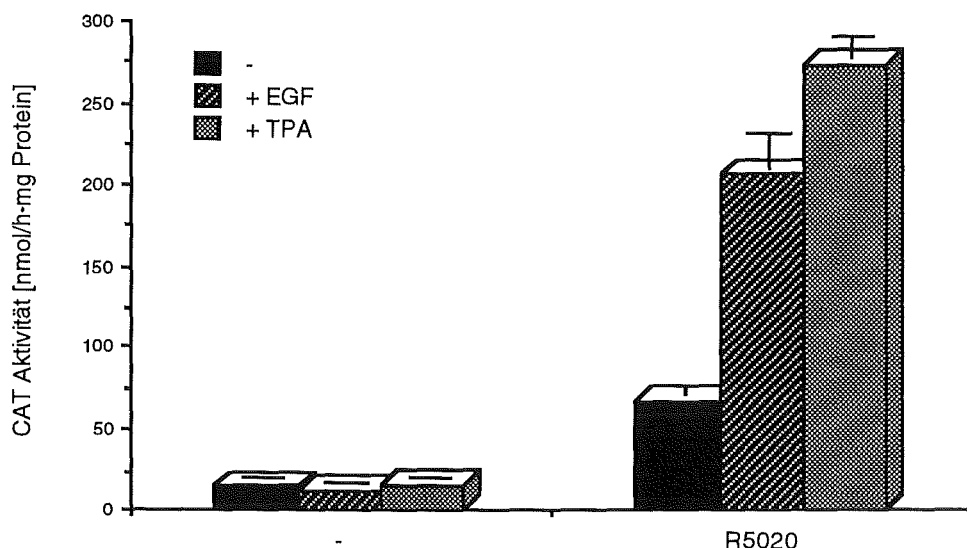


Abb. 12 Der Phorbol ester TPA verstärkt die R5020 Induktion des HRE vergleichbar mit EGF.

T47D-CAT7 Zellen wurden 4 h induziert wie in der Abb. angegeben (R5020 10^{-8} M, EGF 20 ng/ml, TPA 80 μ g/ml). Die CAT Aktivität von 2 μ g Protein wurde bestimmt und der Mittelwert von jeweils zwei Ansätzen mit Abweichung σ_{n-1} in nmol/h-mg Protein aufgetragen.

5.3. Einfluß von Serin/Threonin-Proteinkinaseinhibitoren auf den EGF Effekt

Der in Abb. 12 gezeigte TPA Effekt auf die R5020 induzierte Transkription eines HRE regulierten Gens gibt einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C am EGF Effekt. Es ist jedoch nicht gezeigt, ob der TPA Effekt auf den gleichen molekularen Grundlagen beruht wie der EGF Effekt.

Um die Hypothese einer Beteiligung von PKC am EGF Effekt weiter zu untersuchen, wurden Versuche mit Proteinkinaseinhibitoren durchgeführt.

Das Staurosporinderivat CGP41251 hemmt die Aktivität von PKC *in vitro*; nicht jedoch cAMP-abhängige Proteinkinase, S6 Kinase und die Tyrosinkinase des EGF Rezeptors (Meyer *et al.* 1989). Die eingesetzte CGP41251 Konzentration von 200 nM hemmt das Wachstum verschiedener Zelllinien, während die Kontrollsubstanz CGP42700 in dieser Konzentration keinen Effekt zeigt (Meyer *et al.* 1989). In dem in Abb. 13a ausgewerteten Experiment hemmt CGP41251 den EGF Effekt nicht.

Der PKC Inhibitor Sphingosin wurde in der in der Literatur angegebenen Konzentration von 50 μ M eingesetzt (Hannun *et al.* 1986, Bazzi und Nelsestuen 1987, Hannun und Bell 1987, Rahmsdorf und Herrlich 1990). Die in Abb. 13a sichtbare Hemmung der CAT Aktivität sowohl in mit R5020 als auch in mit R5020 + EGF behandelten Zellen ist wahrscheinlich auf die Toxizität des Inhibitors zurückzuführen. Nach dem Versuchszeitraum von 4^{1/2} h waren die Zellen abgerundet und teilweise von der Kulturschale abgelöst. Der EGF Effekt wurde durch Behandlung der Zellen mit Sphingosin nicht beeinflusst.

Die Proteinkinaseinhibitoren H7 und H9 hemmen in den eingesetzten Konzentrationen sowohl die Aktivität von PKC als auch von cGMP und cAMP abhängigen Kinasen (Hidaka *et al.* 1984). Zur Hemmung von PKC ist eine 3-fach höhere Konzentration an H9 erforderlich als bei H7. HA1004 hemmt PKC in diesen Konzentrationen nicht (Hidaka *et al.* 1984). Keine dieser drei Substanzen hemmt den EGF Effekt. 20 μ M H7 hemmen die CAT Synthese sowohl in mit R5020 als auch in mit R5020 + EGF behandelten Zellen. Der 3-fache EGF Effekt bleibt jedoch erhalten (Abb. 13b). Bei 35 μ M H7 wird die

CAT Aktivität auf den Basalwert nicht induzierter Zellen verringert. H9 hemmt bei einer Konzentration von 35 μM ebenfalls die CAT Synthese sowohl in mit R5020 als auch in mit R5020 + EGF behandelten Zellen, ohne den 3-fachen EGF Effekt zu beeinflussen (Abb. 13c). Die Kontrollsubstanz HA1004 hemmt die CAT Synthese nicht.

Die Hypothese einer Beteiligung von PKC am EGF Effekt wird durch die beschriebenen Experimente mit Proteinkinaseinhibitoren nicht unterstützt.

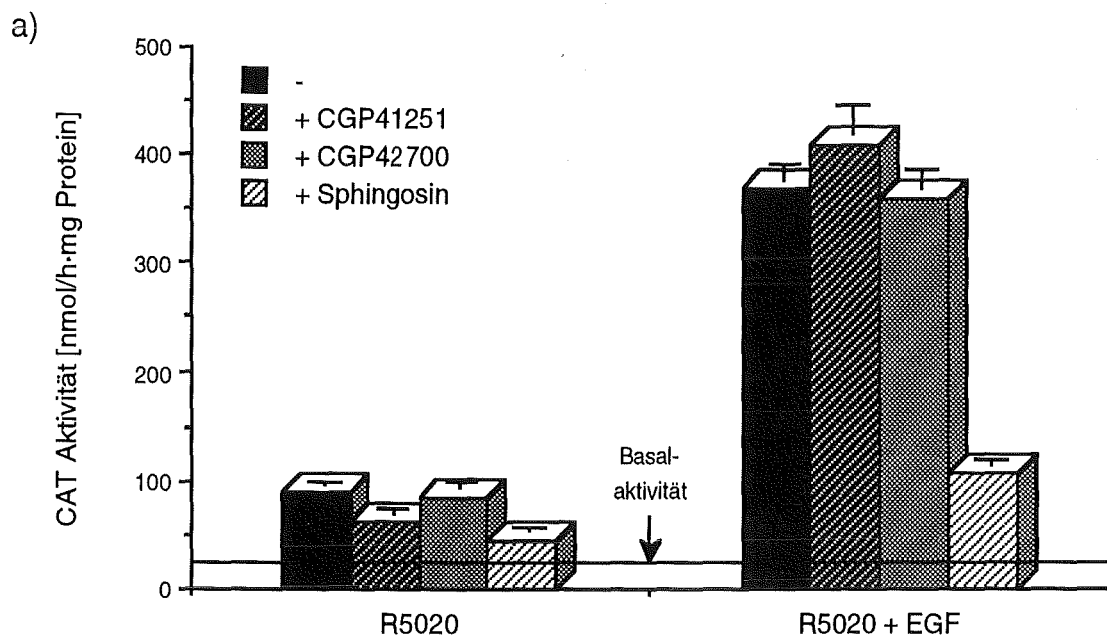
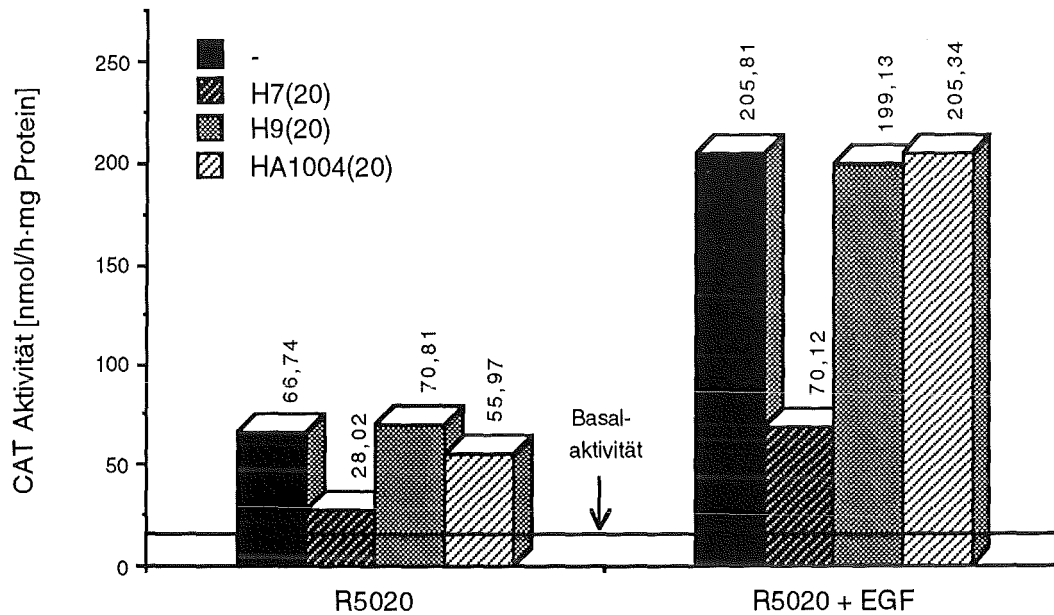


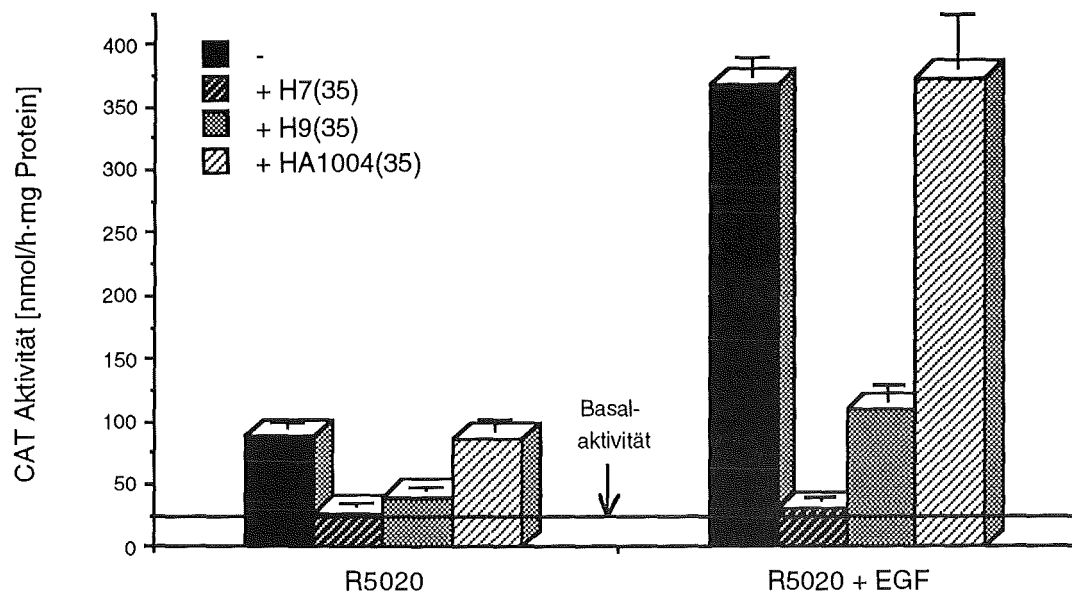
Abb. 13 Behandlung der Zellen mit Proteinkinaseinhibitoren gibt keinen Aufschluß über eine Beteiligung von PKC (Proteinkinase C) am EGF Effekt.

- a) T47D-CAT7 Zellen wurden 30 min mit den Proteinkinaseinhibitoren CGP41251 (200 nM), CGP42700 (200 nM) und Sphingosin (50 μM) inkubiert. Anschließend wurden R5020 bzw. R5020 + EGF (20 ng/ml) zugegeben. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet und die CAT Aktivität von 2 μg Protein bestimmt. In der Abb. sind die Mittelwerte der CAT Aktivitäten von jeweils zwei Ansätzen sowie die Abweichung σ_{n-1} in nmol/h·mg Protein aufgetragen.

b)



c)



- b) T47D-CAT7 Zellen wurden 10 min mit den Proteinkinaseinhibitoren H7, H9 oder HA1004 (jeweils 20 μM) inkubiert und anschließend 4 h wie in der Abb. angegeben mit R5020 (10^{-8} M) bzw. R5020 + EGF (20 ng/ml) induziert. Aufgetragen ist die CAT Aktivität von 5 μg Protein in nmol/h·mg Protein.
- c) T47D-CAT7 Zellen wurden 10 min mit H7, H9 oder HA1004 (jeweils 35 μM) inkubiert und 4 h mit R5020 (10^{-8} M) bzw. R5020 + EGF (20 ng/ml) induziert. Die CAT Aktivität von 2 μg Protein wurde bestimmt. In der Abb. ist der Mittelwert von jeweils zwei Ansätzen und die Abweichung σ_{n-1} in nmol/h·mg Protein angegeben.

6. Einfluß von EGF auf die R5020 induzierte Phosphorylierung des Progesteronrezeptors

Der Progesteronrezeptor ist ein Phosphoprotein, das im Kern lokalisiert ist und in Abwesenheit von Hormon als Komplex mit den Hitzeschockproteinen hsp90, hsp70, hsp56 und anderen bisher nicht näher charakterisierten Proteinen vorliegt (*Perrot-Appianat et al. 1985, Guiochon-Mantel et al. 1989 und 1991, Smith et al. 1990, Sanches 1990, Bagchi et al. 1991*).

Die Aktivierung des Rezeptors durch Progesteron erfolgt in mehreren Schritten. Bindung des Hormons an den Rezeptor führt zur Dissoziation des Rezeptor-hsp Komplexes sowie zu einer Dimerisierung und zusätzlichen Phosphorylierung des Rezeptormoleküls (*DeMarzo et al. 1991, Logeat et al. 1985, Rao et al. 1987a, Sheridan et al. 1989, Chauchereau et al. 1991*). Der dimerisierte Progesteronrezeptor bindet an das HRE und bewirkt die Transkription des HRE-regulierten Gens.

Die Aktivierung des Progesteronrezeptors durch Hormon geht einher mit einer Verstärkung der Phosphorylierung des Rezeptors. Eine hormonabhängige Phosphorylierung wurde auch bei anderen Steroidhormonrezeptoren beobachtet und wird als wesentliche Voraussetzung für die Transaktivierung der Genexpression durch Steroidhormone angesehen (*Pike und Sleator 1985, Hoeck et al. 1989, Hoeck und Groner 1990*). Da die Aktivierung des EGF Rezeptors durch EGF eine Kaskade von Reaktionen in der Zelle auslöst, in deren Verlauf zahlreiche zelluläre Proteine phosphoryliert werden, wurde untersucht, ob der Progesteronrezeptor in den untersuchten Zellen ein Substrat für eine durch EGF direkt oder indirekt aktivierte Kinase oder eventuell Phosphatase ist.

6.1. EGF Effekt auf die Gesamtphosphorylierung des Progesteronrezeptors

Durch *in vivo* Markierung von T47D-CAT7 Zellen mit radioaktivem Phosphat und anschließender Immunpräzipitation des Progesteronrezeptors aus nicht induzierten und aus mit EGF und/oder R5020 induzierten Zellen wurde untersucht, ob Behandlung mit EGF + R5020 die Gesamtphosphorylierung des Progesteronrezeptors gegenüber nur mit R5020 behandelten Zellen verändert. Abb. 14 zeigt das Ergebnis eines typischen Experiments. In Abb. 14a wurde der immunpräzipitierte Progesteronrezeptor auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Der Rezeptor aus mit R5020 und R5020 + EGF behandelten Zellen zeigt eine durch die zusätzliche Phosphorylierung bedingte verringerte elektrophoretische Mobilität sowie eine dreifach erhöhte Gesamtphosphorylierung gegenüber dem Rezeptor aus unbehandelten oder mit EGF behandelten Zellen. Unterschiede in der Rezeptorphosphorylierung zwischen mit R5020 + EGF und nur mit R5020 behandelten Zellen sind nicht erkennbar.

In Abb. 14b wurde mittels Western Blot und anschließender Antikörpermarkierung die Menge des immunpräzipitierten Progesteronrezeptors bestimmt. Wie die densitometrische Auswertung zeigt, unterscheiden sich die eingesetzten Rezeptormengen nicht.

In einem Parallelexperiment zur Phosphorylierung wurde die Aktivierung des HRE nach Induktion der Zellen im CAT Assay gemessen. Abb. 14c zeigt eine dreifache synergistische Genaktivierung durch EGF + R5020 gegenüber R5020 allein in diesem Experiment.

behandelt, um die Menge des präzipitierten Progesteronrezeptors zu bestimmen. Die densitometrisch ermittelten Bandenstärken sind angegeben.

PR: Progesteronrezeptor, AK: Maus-Anti-PR-Antikörper

- c) Von parallel zur Immunpräzipitation mit den in a) angegebenen Induktorkonzentrationen 4 h induzierten Zellen wurden CAT Assays durchgeführt. Es wurden 35 µg Protein eingesetzt. Die CAT Aktivität ist in nmol/h·mg Protein angegeben.

EGF / -	R5020 / -	R5020 + EGF / -	R5020 + EGF / R5020
1,10 ± 0,25	3,03 ± 1,26	3,07 ± 1,29	1,00 ± 0,21

Tab.1 Die Tabelle zeigt die densitometrische Auswertung von 10 unabhängigen Immunpräzipitationen des Progesteronrezeptors mit dem Antikörper Let 126 .

Für jedes Experiment wurden die in der Tabelle angegebenen Verhältnisse der Phosphorylierung des Rezeptors aus unbehandelten (-) sowie mit EGF und/oder R5020 behandelten Zellen errechnet und die Mittelwerte aller Experimente mit Standardabweichung σ_{n-1} bestimmt. Die Dauer der radioaktiven Markierung des Progesteronrezeptors betrug 3 h. Parallel zu den Immunpräzipitationen durchgeführte CAT Assays zeigten für jedes Experiment eine mindestens zweifache Aktivierung R5020+EGF / R5020.

Zur statistischen Absicherung der in Abb. 14 gezeigten Ergebnisse wurde das Experiment mehrfach wiederholt. In Tabelle 1 ist die Auswertung von 10 unabhängigen Versuchen zusammengefaßt.

Auch in der statistischen Auswertung der Experimente ergibt sich wie im in Abb. 14 gezeigten Einzelexperiment kein Unterschied in der Gesamtphosphorylierung des Progesteronrezeptors nach Behandlung der Zellen mit EGF bzw. mit R5020 + EGF im Vergleich zu unbehandelten bzw. nur mit R5020 behandelten Zellen.

Um auch eventuelle Dephosphorylierungen an denjenigen Aminosäuren nachweisen zu können, die bereits in nicht induzierten Zellen phosphoryliert sind, wurden die Zellen 16 h anstatt 3h mit radioaktivem Phosphat inkubiert, um alle bereits bestehenden Phosphorylierungen gegen radioaktive Phosphate auszutauschen (Abb. 15). Durch diesen Versuchsaufbau wird die

Differenz in der Phosphorylierung des Rezeptors zwischen mit R5020 induzierten und nicht induzierten Zellen verringert, da der Einbau radioaktiver Phosphatreste in die Rezeptormoleküle unabhängig von der Induktion der Zellen verstärkt wird. Der Effekt von EGF auf die Phosphorylierung des Progesteronrezeptors wird durch die Dauer der radioaktiven Markierung nicht beeinflusst.

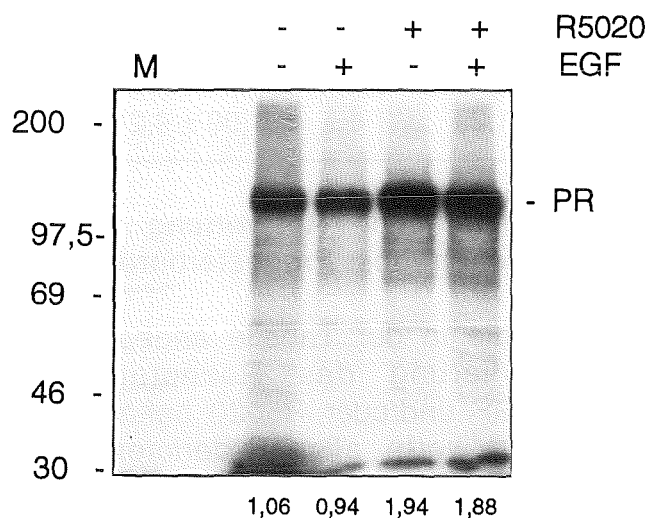


Abb. 15 T47D-CAT7 Zellen wurden 16 h mit ^{32}P -Orthophosphat markiert und 30 min mit EGF (20 ng/ml) und/oder R5020 (10^{-8} M) induziert. Der radioaktiv markierte Progesteronrezeptor wurde mit dem Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper Let126 immunpräzipitiert und auf einem 7,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die densitometrisch ermittelten Bandenstärken sind angegeben. PR: Progesteronrezeptor, M: Molekulargewichtsstandard

6.2. Analyse der phosphorylierten Aminosäuren

Die Gesamtphosphorylierung des Progesteronrezeptors wird durch Behandlung der Zellen mit EGF weder erhöht noch verringert (Abb. 14 und 15, Tab. 1). Außer der Möglichkeit der Änderung der Gesamtphosphorylierung durch EGF könnte die Stimulierung der MMTV Transkription durch das Wachstumshormon auch auf eine Verschiebung der Phosphorylierungsstellen innerhalb des Rezeptormoleküls zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu testen, wurde untersucht, welche Aminosäuren

in Abhängigkeit von Induktion mit R5020 + EGF phosphoryliert werden.

Sowohl die basale als auch die hormoninduzierte Phosphorylierung des Progesteronrezeptors erfolgt an Serinresten (*Rao et al. 1987a, Sheridan et al. 1989*). *In vitro* konnte jedoch eine Phosphorylierung des Progesteronrezeptors an Tyrosinresten durch die Tyrosinkinase des EGF Rezeptors beobachtet werden (*Ghosh-Dastidar et al. 1984, Woo et al. 1986*).

Durch Analyse der phosphorylierten Aminosäuren wurde untersucht, ob Behandlung von Zellen mit R5020 + EGF auch *in vivo* zusätzlich zur R5020 induzierten Serinphosphorylierung zu einer Phosphorylierung an Tyrosin- oder Threoninresten führt.

Abb. 16 zeigt die zweidimensionale Auftrennung der phosphorylierten Aminosäuren des immunpräzipitierten Progesteronrezeptors nach dessen vollständiger Hydrolyse. Sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach Induktion mit R5020 + EGF erfolgt der überwiegende Teil der Phosphorylierungen an Serinresten. Es ist keine Tyrosinphosphorylierung nachweisbar. Nach längerer Exposition wird sowohl in unbehandelten als auch in mit R5020 + EGF behandelten Zellen eine sehr geringe Threoninphosphorylierung sichtbar. Diese Phosphorylierung ist jedoch im Verhältnis zur Serinphosphorylierung so schwach, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß sie auf Verunreinigungen des Immunpräzipitats mit anderen Phosphoproteinen zurückzuführen ist.

Es besteht kein Unterschied in der Zusammensetzung der phosphorylierten Aminosäuren des Progesteronrezeptors aus unbehandelten und mit R5020 + EGF behandelten Zellen.

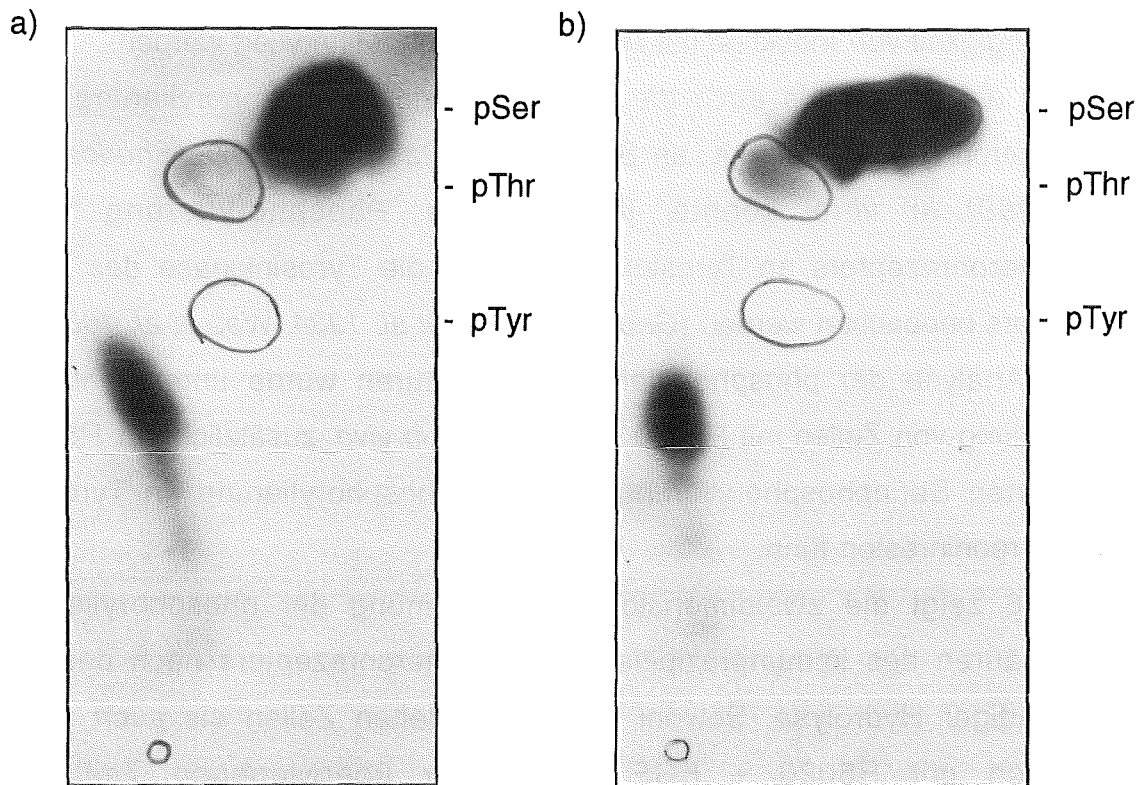


Abb. 16 Der Progesteronrezeptor ist an Serinresten phosphoryliert. Eine geringe Phosphorylierung an Threoninresten ist nachweisbar. Progesteronrezeptor aus *in vivo* radioaktiv markierten T47D-CAT7 Zellen wurde mit dem Antikörper Let126 präzipitiert und mit 6 M HCl vollständig hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden zweidimensional aufgetrennt und durch Vergleich mit unmarkierten Referenzen identifiziert. pSer: Phosphoserin, pThr: Phosphothreonin, pTyr: Phosphotyrosin

- a) unbehandelte Zellen
- b) mit R5020 (10^{-8} M) und EGF (20 ng/ml) induzierte Zellen

6.3. Partielle Proteolyse des radioaktiv phosphorylierten Progesteronrezeptors

Als weiterer Ansatz zur Untersuchung einer möglichen EGF-induzierten Verschiebung von Phosphorylierungsstellen innerhalb des Progesteronrezeptormoleküls wurde der Progesteronrezeptor partiell mit der Endoprotease V8 verdaut. Die entstehenden Peptide wurden elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Gesamtphosphorylierung des in Abb. 17 dargestellten Experiments unterscheidet sich nicht von den in Abb. 14 und 15 gezeigten Ergebnissen.

Für den menschlichen Progesteronrezeptor sind im nicht induzierten Zustand sechs und im hormoninduzierten Zustand sieben bis acht Phosphorylierungen beschrieben worden (*Sheridan et al. 1989*). Der V8 Verdau sowohl des nicht induzierten als auch des hormoninduzierten Rezeptors führt zu einer großen Anzahl phosphorylierter Peptide unterschiedlicher Größe. Bedingt durch die partielle Proteolyse kann jede der phosphorylierten Aminosäuren in mehreren Peptiden unterschiedlicher Größe im Gel vorliegen. So ergeben sich trotz nur ein bis zwei zusätzlicher Phosphorylierungen zahlreiche Unterschiede im Peptidmuster zwischen den Rezeptorfragmenten aus nicht induzierten und mit Hormon behandelten Zellen (Spur 6 und 8 in Abb. 17).

Im Gegensatz zu diesen deutlichen Unterschieden kann keine Veränderung des Bandenmusters durch Behandlung der Zellen mit EGF festgestellt werden. Zwischen unbehandelten und mit EGF behandelten Zellen sowie zwischen mit R5020 und mit R5020 + EGF behandelten Zellen stimmen die Peptidmuster überein.

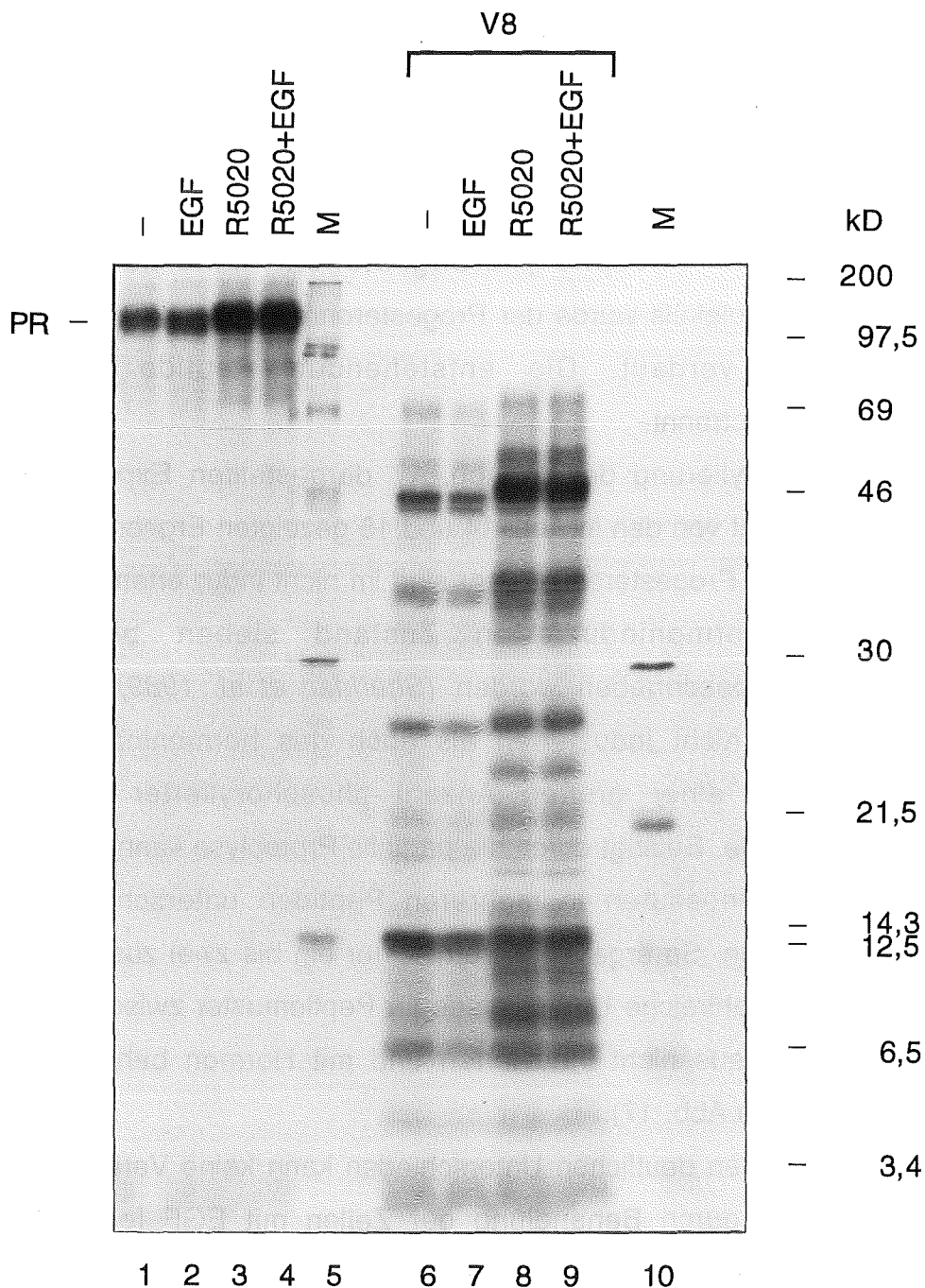


Abb. 17 Eine Analyse der phosphorylierten Peptide nach partiellem Verdau des Progesteronrezeptors mit der Endoprotease V8 zeigt keinen Unterschied in der Rezeptorphosphorylierung bei Vergleich der Verdauemuster von Extrakten aus mit R5020 bzw. mit R5020 + EGF behandelten Zellen, während mit R5020 behandelte Zellen sich in zahlreichen Peptidbanden von unbehandelten Zellen unterscheiden.
 Progesteronrezeptor aus mit EGF (20 ng/ml) und/oder R5020 (10^{-8} M) induzierten T47D-CAT7 Zellen wurde mit dem Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper Let126 immunpräzipitiert, 10 min mit 2 mg V8 Protease bei 37°C inkubiert und auf einem 7,5 -

20% Gradientengel aufgetrennt (Spuren 6 - 9). In den Spuren 1 - 4 wurde unverdauter Progesteronrezeptor aufgetragen.
M: Molekulargewichtsstandard, PR: Progesteronrezeptor

Die in Kapitel 6 beschriebenen Experimente geben keinen Hinweis auf eine Änderung der Phosphorylierung des Progesteronrezeptors durch Behandlung von Zellen mit R5020 + EGF gegenüber nur mit R5020 induzierten Zellen.

7. Einfluß von EGF auf die DNA Bindung des Progesteronrezeptors

Bindung des Progesteronrezeptors an das PRE ist eine Voraussetzung für die Genaktivierung durch den Progesteronrezeptor. Die Bildung solcher Protein-DNA Komplexe kann mit der Methode des "Bandshifts" überprüft werden (*Garner und Revzin 1981*).

Die Mobilität des Protein-DNA Komplexes im Gel ist neben der Größe des DNA Fragments abhängig von Größe und Konformation des Proteins. Schon geringfügige Änderungen im an die DNA gebundenen Rezeptor-Hormon Komplex beeinflussen die Mobilität des Gesamtkomplexes. So unterscheidet sich der Bandshift eines PRE Oligonukleotids mit einem Progesteronrezeptor, der durch das Antiprogesteron RU486 aktiviert wurde, deutlich vom Bandshift mit durch R5020 aktiviertem Rezeptor (*Klein-Hitpass et al. 1991, Abb. 18*).

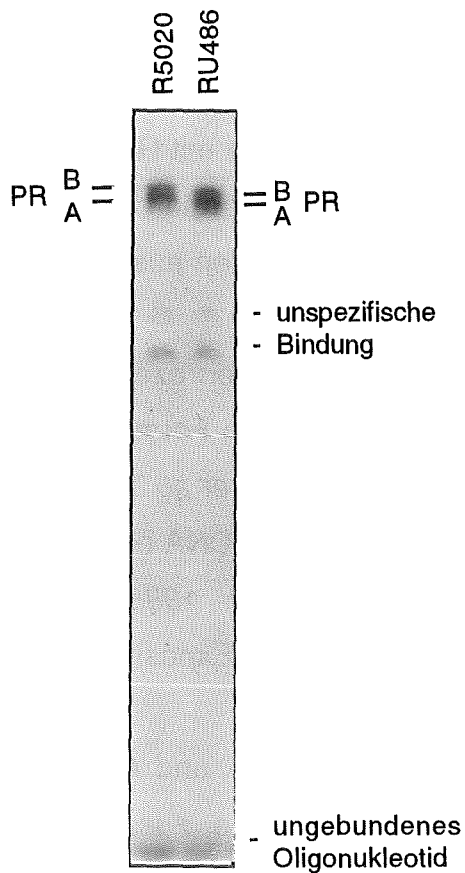


Abb. 18 Der mit dem Antiprogestin RU486 gebildete DNA-Rezeptorkomplex weist im Gel eine deutlich höhere Mobilität auf als der mit R5020 gebildete Komplex.
 T47D-CAT7 Zellen wurden in Extraktionspuffer mit 400 mM KCl geerntet. 20 µg Zellextrakt wurden 30 min mit 10^{-7} M R5020 bzw. RU486 bei 0°C und nach Zugabe von Bandshiftpuffer, 1 µg poly(dI-dC) und markiertem Oligonucleotid weitere 30 min bei RT inkubiert. Der Gellauf erfolgte bei RT.
 PR: Progesteronrezeptor, B: B-Form des PR, A: A-Form des PR

Anhand von Bandshiftexperimenten wurde untersucht, ob Behandlung von Zellen mit EGF die Bindung des durch R5020 aktivierten Progesteronrezeptors an die PRE DNA verändert.

Neben unspezifischen Bindungen zeigt Abb. 19a im oberen Bereich des Gels einen Protein-PRE Komplex, der nur nach Behandlung der Zellen mit R5020 auftritt (Spuren 7 bis 10). Dieser Komplex ist spezifisch für die PRE Sequenz, da er bei Inkubation der Extrakte mit einem 50-fachen Überschuß an nicht markiertem PRE Oligonucleotid stark abgeschwächt wird (Spuren 11 bis 14), während ein 50-facher Überschuß eines heterologen Oligonucleotids keinen

Einfluß auf die Bindung an das radioaktive PRE Oligonukleotid hat (Spuren 15 bis 18, vgl. 9, 10 mit 17, 18). Der Komplex in den Spuren 9 und 10 wird von einem Protein gebildet, das nach Induktion der Zellen mit R5020 spezifisch an die PRE Sequenz bindet. Es besteht kein Unterschied in der Mobilität dieses Protein-DNA Komplexes bei Verwendung von Extrakten aus mit R5020 + EGF gegenüber nur mit R5020 induzierten Zellen.

T47D Zellen enthalten zwei Formen des Progesteronrezeptors, den B- und den A-Rezeptor (*Krett et al. 1988*). Bei diesen beiden Formen handelt es sich um zwei Translationsprodukte eines Gens (*Kastner et al. 1990a und 1990b*). Sowohl B- als auch A-Rezeptor können Hormon und DNA binden und die HRE regulierte Transkription stimulieren (*Krett et al. 1988*). Die B- und A-Rezeptor-DNA Komplexe sind im Gel bei kurzer Exposition als getrennte Banden erkennbar (Abb. 18).

Um zu untersuchen, ob EGF das Verhältnis von B- und A-Rezeptor an der DNA-Bindung verändert, wurden die Zellextrakte zusätzlich zum PRE Oligonukleotid mit Antikörpern gegen den Progesteronrezeptor inkubiert. Die Antikörper binden an den Rezeptor-DNA Komplex und verringern die Mobilität dieses Komplexes. Es wurden zwei verschiedene Antikörper gegen menschlichen Progesteronrezeptor eingesetzt. Der Antikörper AB52 bindet sowohl an den B- als auch an den A-Rezeptor, während der Antikörper Let126 nur den B-Rezeptor erkennt.

Die Spuren 1 und 2 in Abb. 19a zeigen den R5020 abhängigen Komplex nach Inkubation der Zellextrakte mit AB52. Die Mobilität des gesamten Rezeptorkomplexes ist gegenüber Extrakten ohne Antikörper (Spuren 9 und 10) deutlich verringert. EGF hat keinen Einfluß auf diese Mobilitätsänderung.

Bei Inkubation der Extrakte mit Let126 ändert sich die Mobilität nur bei einem Teil des Rezeptorkomplexes. Der Bereich des Komplexes mit der höchsten Laufgeschwindigkeit im Gel (Spuren 9 und 10) bleibt unverändert, da der Antikörper Let 126 nicht an den A-Rezeptor bindet (vgl. die Spuren 5, 6 mit 9, 10). Nur die Mobilität des B-Rezeptors wird durch Let126 verringert. Das Verhältnis von am DNA-bindenden Komplex beteiligten B- und A-Formen des Progesteronrezeptors wird durch Induktion der Zellen mit EGF zusätzlich zur Inkubation mit R5020 nicht verändert.

Mit dem in Abb. 19b gezeigten Bandshiftexperiment wurde untersucht, ob die Spezifität der DNA Bindung des Progesteronrezeptors durch Behandlung der Zellen mit EGF beeinflusst wird. Zellextrakte wurden mit radioaktiv markiertem PRE-Oligonukleotid ohne bzw. mit steigenden Mengen nicht markierter, unspezifischer DNA zur Kompetition nicht spezifischer Proteinbindungen an das PRE-Oligonukleotid inkubiert. In Abwesenheit von unspezifischem Kompetitor bildet sich ein PRE-Protein Komplex, der von der Induktion der Zellen mit R5020 unabhängig ist und eine geringere Mobilität aufweist als der vom Progesteronrezeptor gebildete Komplex (Spuren 1 bis 4, vgl. mit 7 und 8). Schon bei Zugabe geringer Mengen an unspezifischer DNA ist im Gel der R5020 spezifische Progesteronrezeptorkomplex sichtbar. Höhere Mengen unspezifischer DNA führen zu einer Schwächung der unspezifischen Bande unterhalb des Progesteronrezeptorkomplexes, während der Rezeptorkomplex selber unverändert bleibt. Ein Einfluß von EGF auf die Spezifität der DNA Bindung des Progesteronrezeptors ist nicht erkennbar.

Mit den gezeigten Protein-DNA Bindungsstudien sollte auch die Hypothese getestet werden, ob die Behandlung von Zellen mit R5020 + EGF die Bindung eines zusätzlichen Faktors an den Progesteronrezeptor induziert, der mit diesem zusammen an die DNA bindet und eine verstärkte Transkription bewirkt. Um einen solchen Komplex bei der Herstellung der Zellextrakte nicht zu zerstören, wurden in einigen Experimenten für die Extraktion 60 mM KCl statt 400 mM KCl eingesetzt und sowohl Bindungsreaktion als auch Gellauf bei 4°C durchgeführt. Diese Änderungen in den Versuchsbedingungen hatten jedoch keinen Einfluß auf die R5020 abhängigen Komplexe. Die Stärke der unspezifischen Bindungen mit höherer Mobilität als der Progesteronrezeptorkomplex unterschied sich auch bei verschiedenen Extraktpräparationen nach dem gleichen Protokoll und war außerdem abhängig von der Temperatur bei Inkubation und Gellauf.

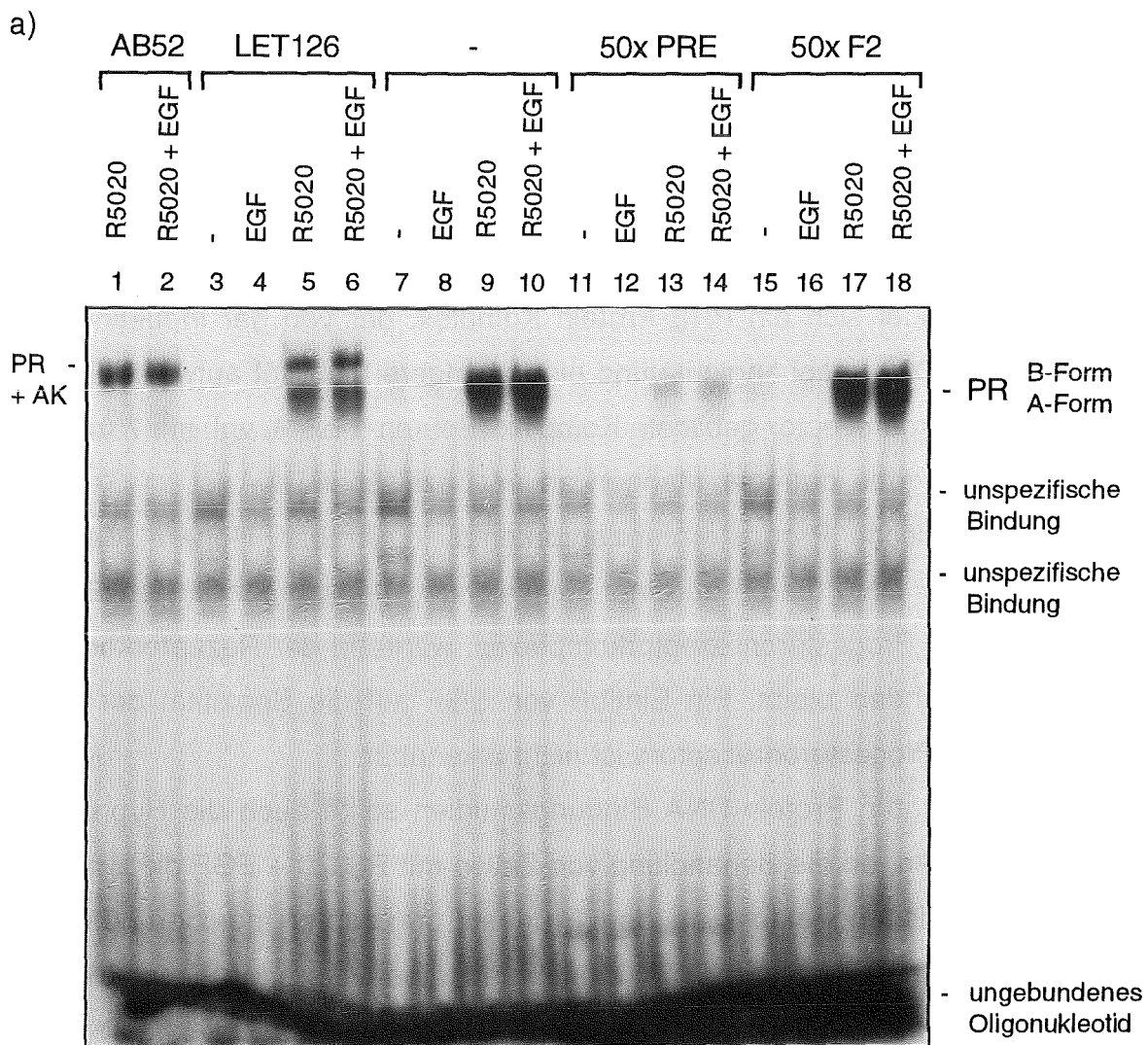
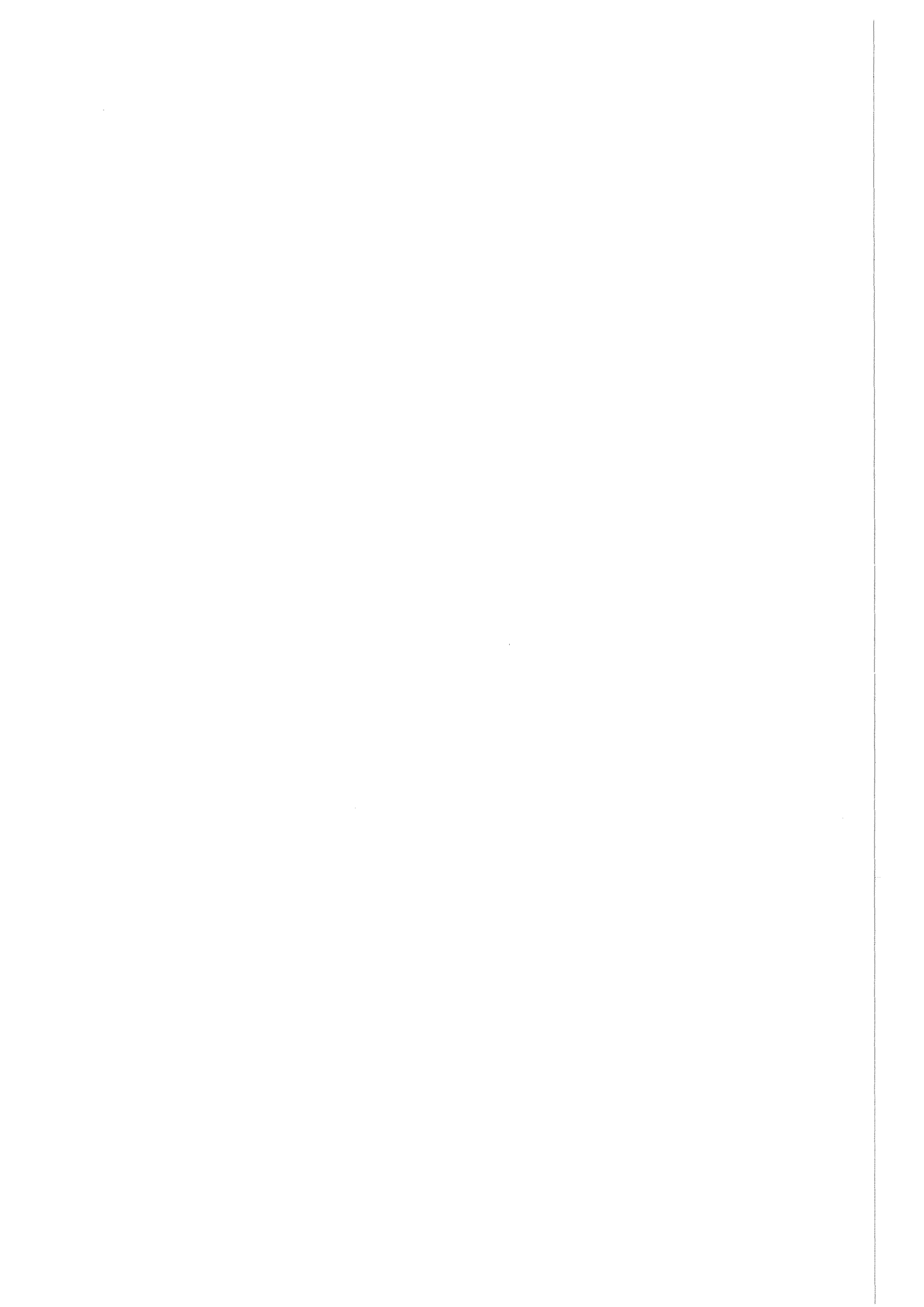


Abb. 19 Die Bindung des Progesteronrezeptors an DNA *in vitro* wird durch Behandlung der Zellen mit EGF nicht verändert.

- a) T47D-CAT7 Zellen wurden 30 min mit EGF (20 ng/ml) und/oder R5020 (10^{-8} M) induziert und in Extraktionspuffer mit 60 mM KCl gerntet. Für die Bindungsreaktion (30 min bei 4°C) wurden 20 µg Zellextrakt, 2 µg poly(dI-dC), 10000 cpm kinasiertes PRE Oligonukleotid und wie in der Abb. angegeben 0,5 µg Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper AB52 bzw. Let126 oder ein 50-facher Überschuß an nicht markiertem PRE- bzw. unspezifischem Oligonukleotid eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. PR: Progesteronrezeptor, AK: Antikörper, F2: unspezifisches Oligonukleotid



Diskussion

Wachstumsfaktoren und Hormone sind Botenstoffe, die die gewebe- und stadienspezifische Expression zahlreicher Gene regulieren. In dieser Arbeit wurde die synergistische Aktivierung von Promotoren, die eine Progesteronrezeptorbindungsstelle enthalten, durch das Steroidhormon Progesteron und den Wachstumsfaktor EGF untersucht.

Für den MMTV-LTR Promotor wurde eine synergistische Genaktivierung durch Progesteron und EGF beschrieben (*Cato et al. 1989*). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß dieser synergistische Effekt nicht spezifisch für MMTV ist, sondern auch durch Promotorsequenzen vermittelt werden kann, die ein synthetisches PRE-Palindrom bzw. das PRE des TAT Gens sowie eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsinitiationskomplex enthalten (Abb. 3, *Krusekopf et al. 1991*). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor in Kombination mit einer Erkennungssequenz für den Transkriptionsinitiationskomplex für die Verstärkung progesteroninduzierter Genexpression durch EGF ausreicht. Da für diesen EGF Effekt außer den für die Progesteroninduktion notwendigen Sequenzen keine weiteren DNA Elemente erforderlich sind und die getesteten Progesteronrezeptorbindungsstellen unterschiedliche Sequenzen aufweisen, ist nicht wahrscheinlich, daß der Synergismus auf der durch EGF vermittelten Bindung eines zusätzlichen Faktors neben dem Progesteronrezeptor an die DNA beruht. Die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse sind mit der Annahme vereinbar, daß der Synergismus auf einer Veränderung des Progesteronrezeptors durch EGF beruht, die zu einer Verstärkung der Transaktivierung durch den Rezeptor führt.

Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, daß EGF die in Abb. 3 untersuchten Promotoren nur zusammen mit Progesteron aktiviert. In Abwesenheit von Hormon induziert EGF die Transkription PRE regulierter Gene nicht. Bei einer Konzentration von 10^{-10} M R5020 ist sowohl eine Hormoninduktion als auch ein EGF Effekt sichtbar (Abb. 4).

Bei der Beurteilung der biologischen Relevanz dieser Konzentration muß berücksichtigt werden, daß das synthetische Progesteronanalogue R5020 das MMTV-LTR ca. 100-fach stärker aktiviert als das natürliche Steroidhormon Progesteron (*Cato et al. 1986*). 10^{-10} M R5020 entspricht also in der Wirksamkeit einer Konzentration von ca. 10^{-8} M Progesteron. Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Wert: Progesteronkonzentrationen in diesem Bereich liegen während der späten Phase des Menstruationszyklus und während der Schwangerschaft vor (*Baulieu 1989*).

Die Spezifität des EGF Effekts für die Genaktivierung durch Progesteron wurde durch Behandlung von T47D-CAT7 Zellen mit den Glukokortikoiden Dexamethason und RU28362 sowie mit dem Androgen Dihydrotestosteron (DHT) untersucht. Dexamethasonkonzentrationen $< 10^{-6}$, die in anderen Mammaepithelzellen (z.B. GR, NMuMG) Glukokortikoidwirkung zeigen, induzieren in T47D-CAT7 Zellen keine Transkription des MMTV-LTR Promotors (*Cato et al. 1986*). Behandlung von T47D-CAT7 Zellen mit RU28362 oder DHT führt zu einer Hormoninduktion, die durch EGF verstärkt wird (Abb. 5a). Da die Hormone RU28362 und DHT mit dem Progesteronrezeptor kreuzreagieren können, wurde untersucht, ob die Transkriptionsinduktion durch RU28362 und DHT und damit deren EGF Effekt auf einer Aktivierung des Progesteronrezeptors anstelle von Glukokortikoid- bzw. Androgenrezeptor beruhen könnte. Diese Vermutung wird durch die Bindung von RU28362 und DHT an den Progesteronrezeptor im "Bandshift Assay" bestätigt (Abb. 5b). Aufgrund der geringen Mengen an Glukokortikoid- und Androgenrezeptor kann in T47D-CAT7 Zellen keine Aussage über die Spezifität des EGF Effekts für das Steroidhormon Progesteron gemacht werden. Das Fehlen eines EGF Effekts auf die Dexamethasoninduktion von mit pMMTV-CAT transfizierten Mammaepithelzellen, die Glukokortikoidrezeptor enthalten (GR, NMuMG), spricht für eine Progesteronspezifität des EGF Effekts. Es kann sich jedoch auch um einen zelltypspezifischen Unterschied zwischen den getesteten Zelllinien handeln.

Die Bindung von EGF an den EGF Rezeptor löst eine Kaskade von Veränderungen in der Zelle aus, deren erster Schritt in einer Phosphorylierung der Tyrosinkinase des EGF Rezeptors besteht (*Ushiro und Cohen 1980, Hunter und Cooper 1981*). In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Experimente bestätigen die Annahme, daß der EGF Effekt über die für EGF bekannten Aktivierungsstufen wie spezifische Bindung und Aktivierung des EGF Rezeptors abläuft.

So kann ein anderer Ligand für den EGF Rezeptor, der Wachstumsfaktor $TGF\alpha$, EGF bei der synergistischen Genaktivierung mit Progesteron ersetzen (*Abb. 6, Krusekopf et al. 1990 und 1991*). Ferner stimmen die halbmaximalen Konzentrationen von EGF und $TGF\alpha$ für den Synergismus mit Progesteron bei der Genaktivierung überein mit den Literaturdaten für EGF Wirkungen wie Stimulierung des Zellwachstums und Hemmung der Rezeptorbindung von Steroidhormonen (*Abb. 7 und 8, Koga et al. 1989, Sarup et al. 1988, Rao et al. 1987b, Winkler et al. 1986*). Inaktivierung der Tyrosinkinase des EGF Rezeptors verringert den EGF Effekt (*Abb. 9*).

Die Verstärkung der Transkription progesteronregulierter Gene durch EGF ist transient. Sie ist bereits nach 15 min nachweisbar und nimmt innerhalb von 4 h deutlich ab. Diese Kinetik entspricht der der sogenannten "immediate-early response genes" (Gene, die sehr schnell nach Induktion exprimiert werden) wie der Proto-Onkogene *c-fos* und *c-jun*. Die Induktion dieser Gene durch EGF ist nicht abhängig von Proteinsynthese (*Lau und Nathans 1987, Quantin und Breathnach 1988*). Auch beim EGF Effekt sprechen die schnelle Transkriptionsinduktion und Experimente mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid gegen eine Beteiligung von Proteinsynthese (*Abb. 11a, Krusekopf et al. 1991*).

Die Aktivierung der EGF Rezeptortyrosinkinase führt über mehrere Schritte zur Aktivierung von PKC. Diese Proteinkinase kann auch durch den Phorbolester TPA aktiviert werden (*Castagna et al. 1982, Nishizuka 1984*). PKC ist wahrscheinlich auch an der Induktion der Expression von *c-fos* und anderen Proto-Onkogenen durch TPA beteiligt (*Büscher et al. 1988, Rahmsdorf und Herrlich 1990*). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß TPA EGF bei der Vermittlung des synergistischen Effekts auf die progesteroninduzierte Genexpression ersetzen kann. Dieser Befund deutet auf eine Beteiligung von PKC am EGF Effekt hin.

Eine Beteiligung von PKC am EGF Effekt konnte jedoch durch Experimente mit Proteinkinaseinhibitoren nicht bestätigt werden. Der EGF Effekt wurde durch keinen der verwendeten Proteinkinaseinhibitoren gehemmt. Das Ausbleiben einer Hemmung des EGF Effekts durch Staurosporin und Sphingosin (Abb. 13a) ist nicht so hoch zu bewerten, da bekannt ist, daß diese Inhibitoren PKC abhängige Reaktionen nicht in jedem Fall hemmen. So wird die TPA Induktion der Transkription von *c-fos*, bei der eine Beteiligung von PKC angenommen wird, durch Staurosporin und Sphingosin nicht gehemmt (*Krämer et al. 1990*). Dem Fehlen einer Hemmung der synergistischen Genaktivierung durch die Serin/Threonin-Proteinkinaseinhibitoren H7 und H9 (Abb. 13b und 13c) ist größeres Gewicht beizumessen, zumal die Aktivität dieser Inhibitoren durch Hemmung der R5020 induzierten Genexpression gezeigt werden konnte. Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf Interaktion der Inhibitoren mit der Proteinkinase, die den Progesteronrezeptor hormonabhängig phosphoryliert. Die aufgrund von Experimenten mit Inhibitoren möglichen Aussagen werden jedoch dadurch abgeschwächt, daß keiner der bekannten PKC Inhibitoren vollständig spezifisch ist für diese Proteinkinase. Möglicherweise werden nicht alle Mitglieder der PKC Familie durch H7 und H9 gehemmt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß PKC am EGF Effekt beteiligt ist.

Ziel der durch EGF ausgelösten Signalkette, die zur Steigerung der progesteroninduzierten Genaktivierung führt, ist wie bereits dargestellt wahrscheinlich der Progesteronrezeptor. Die Transaktivierung durch den Progesteronrezeptor könnte durch eine Modifikation dieses Moleküls oder durch Bindung eines Kofaktors verstärkt werden.

Die Aktivierung des Progesteronrezeptors durch Bindung seines Liganden korreliert mit einer Verstärkung der Phosphorylierung des Rezeptors (*Rao et al. 1987a, Sheridan et al. 1989, Chaucereau et al. 1991*). Hormonabhängige Phosphorylierung wurde nicht nur für den Progesteronrezeptor, sondern auch für den Glukokortikoidrezeptor und den Vitamin D₃ Rezeptor gezeigt (*Hoeck et al. 1989, Hoeck und Groner 1990, Pike und Sleator 1985*). Behandlung des Glukokortikoidrezeptors mit Phosphatasen führt zur Inaktivierung des Rezeptors (*Nielsen et al. 1977, Housley et al. 1982*). Die Phosphorylierung wird deshalb als notwendige Voraussetzung für die Aktivierbarkeit von Steroidhormonrezeptoren angesehen.

Da einerseits der Phosphorylierung des Progesteronrezeptors offensichtlich eine wichtige Funktion bei der Transaktivierung von Genen durch diesen Rezeptor zukommt und andererseits die durch EGF ausgelöste Signalkette die Phosphorylierung von Proteinen beinhaltet, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Behandlung von Zellen mit EGF zu einer Änderung der Phosphorylierung des Progesteronrezeptors führt, die sich von der progesteroninduzierten Rezeptorphosphorylierung unterscheidet. In einer anderen Mammaepithelzelle (HBL100) wurde für den Glukokortikoidrezeptor eine Verstärkung der Phosphorylierung durch EGF sowohl an Serin- als auch an Tyrosinresten beschrieben (*Rao und Fox 1987*). Ein biologischer Effekt dieser zusätzlichen Phosphorylierung wurde in diesem Experiment allerdings nicht untersucht.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen des mit radioaktivem Phosphat markierten Progesteronrezeptors konnte keine Veränderung in der Gesamtphosphorylierung des progesteroninduzierten Rezeptors durch Behandlung der Zellen mit EGF festgestellt werden (*Krusekopf et al. 1990 und 1991, Abb. 14 und 15*). Kein Einfluß von EGF auf

die hormoninduzierte Phosphorylierung des Progesteronrezeptors wurde auch von Rao et al. gefunden (Rao et al. 1987a). Die dort beschriebenen Versuchsbedingungen unterscheiden sich von den in Abb. 14 und Tab.1 gezeigten Experimenten in zwei Punkten. Zum einen wurden die T47D Zellen nicht gleichzeitig mit Hormon und Wachstumsfaktor induziert, sondern zuerst mit EGF und anschließend mit Progesteron behandelt. Zum anderen wurde für die beschriebenen Versuchsbedingungen keine biologische Wirkung von EGF auf die behandelten Zellen gezeigt.

Da durch Bestimmung der Gesamtphosphorylierung des immunpräzipitierten Progesteronrezeptors eventuell vorhandene sehr geringe Phosphorylierungsunterschiede (< 20%, siehe Spalte 4 in Tab. 1) sowie Verschiebungen von Phosphorylierungsstellen innerhalb des Rezeptormoleküls nicht erkannt werden können, wurden weitere Untersuchungen zur Beeinflussung der Rezeptorphosphorylierung durch EGF durchgeführt.

Die Tyrosinkinase des EGF Rezeptors phosphoryliert nach Aktivierung durch EGF sich selbst und zahlreiche andere Proteine, darunter auch die Serin/Threonin-Proteinkinase C und eventuell andere Kinasen (Ushiro und Cohen 1980, Hunter und Cooper 1981, Berridge 1987). Für den Progesteronrezeptor sind *in vivo* nur Serinphosphorylierungen beschrieben worden (Rao et al. 1987a, Sheridan et al. 1989). *In vitro* ist gereinigter Progesteronrezeptor jedoch ein Substrat für die Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase des EGF Rezeptors (Ghosh-Dastidar et al. 1984, Woo et al. 1986). Da die Analyse der phosphorylierten Aminosäuren nach Behandlung von T47D-CAT7 Zellen mit R5020 + EGF keinen Hinweis auf eine EGF-abhängige Tyrosinphosphorylierung erbracht hat (Abb.16), kann nicht davon ausgegangen werden, daß eine Phosphorylierung des Progesteronrezeptors durch die Tyrosinkinase des EGF Rezeptors oder eine andere im Verlauf der durch EGF ausgelösten Signalkette aktivierten Tyrosin- oder Threoninkinase erfolgt. Dieses Ergebnis stimmt mit Daten von Rao et al. überein, die in T47D Zellen nach Behandlung mit EGF in Abwesenheit von Hormon keine Tyrosinphosphorylierung gefunden haben (Rao et al. 1987a).

Ein Vergleich des Phosphorylierungsmusters von durch partiellen Proteaseverdau des Progesteronrezeptors nach Induktion der Zellen mit R5020 oder R5020 + EGF erhaltenen Peptiden zeigt keinen EGF abhängigen Unterschied zwischen den phosphorylierten Peptiden, während die zusätzliche Phosphorylierung des Rezeptors nach Behandlung mit R5020 im Vergleich zu nicht induzierten Zellen zu zahlreichen Unterschieden im Peptidmuster führt (Abb. 17). Dieses Ergebnis spricht gegen eine Änderung der Phosphorylierung des Progesteronrezeptors als Ursache für den EGF Effekt.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß nur ein geringer Teil des ligandgebundenen Progesteronrezeptors tatsächlich spezifisch an die PRE DNA binden kann, da die Anzahl der PRE Sequenzen in der Zelle gering ist gegenüber den vorhandenen Hormon- und Progesteronrezeptormolekülen. Sollte eine EGF abhängige Änderung der Phosphorylierung des Progesteronrezeptors nur bei PRE-gebundenen Rezeptormolekülen auftreten, so könnte diese mit Hilfe der durchgeführten Experimente wahrscheinlich nicht erkannt werden, da die Veränderung dieser Minderheit der Rezeptormoleküle von den unveränderten nicht PRE-gebundenen Progesteronrezeptoren überlagert würde.

Hinweise auf eine DNA-bindungsabhängige Phosphorylierungsänderung bei Steroidhormonrezeptoren geben Untersuchungen am Glukokortikoidrezeptor (Orti *et al.* 1989). Hierbei wurde die Phosphorylierung eines kleinen Teils der im Kern lokalisierten Rezeptorfraktion untersucht, der nach DNase Verdau nicht extrahiert werden konnte, sondern erst durch Kochen in 10% SDS und 20% TritonX100 von der Kernfraktion zu trennen war. Bei diesem mit DNase nicht extrahierbaren Rezeptor handelt es sich wahrscheinlich um die spezifisch DNA gebundene Fraktion. Die Experimente von Orti *et al.* ergaben, daß dieser mit DNase nicht extrahierbare Rezeptor die für den mit DNase extrahierbaren Rezeptor beobachtete ligandabhängige zusätzliche Phosphorylierung nicht aufweist und in seiner Gesamtposphorylierung dem nicht aktivierten Rezeptor entspricht. Da jedoch in dem beschriebenen Experiment die Menge des mit DNase nicht aus der Kernfraktion isolierbaren

Progesteronrezeptors sehr gering war und demzufolge der gemessene Einbau an radioaktivem Phosphat nur um den Faktor zwei über dem Hintergrund lag, ist nicht sicher zu entscheiden, ob die beobachtete um 40% geringere Phosphorylierung der nicht mit DNase extrahierbaren Rezeptoren tatsächlich die *in vivo* Verhältnisse widerspiegelt oder ob ein Meßfehler vorliegt. Für den Fall, daß kein Meßfehler vorliegt, folgt aus dem dargestellten Experiment, daß die bekannte hormoninduzierte Phosphorylierung des Rezeptors möglicherweise nicht die einzige für die Transaktivierung notwendige Modifikation des Glukokortikoidrezeptors ist. Eine DNA-bindungsabhängige Phosphorylierungsänderung könnte eventuell auch beim Progesteronrezeptor vorliegen und durch EGF modifiziert werden oder nur nach Behandlung der Zellen mit EGF auftreten. Weitere Untersuchungen sind notwendig zur Klärung des Vorliegens DNA-bindungsabhängiger Phosphorylierungsänderungen von Steroidhormonrezeptoren und ihrer biologischen Relevanz für die Transaktivierung von Genen.

Ein anderer Schritt in der Aktivierung des Progesteronrezeptors, der durch EGF beeinflusst werden könnte, ist die Dissoziation des Rezeptor-hsp Komplexes. Diese Dissoziation ist Voraussetzung für die Rezeptordimerisierung und Transaktivierung. Falls durch EGF aktivierte Faktoren die Dissoziation des Komplexes erleichtern würden, sollte der EGF Effekt bei geringen Hormonkonzentrationen stärker sein als bei maximaler Hormonkonzentration, da bei hoher Ligandkonzentration alle Rezeptormoleküle aktiviert sind. Tatsächlich steigt der EGF Effekt jedoch mit steigender Hormonkonzentration (Abb. 4). Der EGF Effekt beruht folglich nicht auf einer schnelleren Aktivierung des Progesteronrezeptors, sondern auf einer Steigerung der Transkriptionsrate des PRE-gebundenen Progesteronrezeptors.

EGF könnte die DNA Bindung des aktivierten Progesteronrezeptors verändern. Bindung des aktivierten Progesteronrezeptors an eine PRE Konsensussequenz ist Voraussetzung für die progesteroninduzierte

Genexpression. Sowohl Strukturveränderungen des Rezeptors durch Modifikationen wie Phosphorylierung oder Dephosphorylierung als auch eine durch EGF induzierte Bindung von weiteren Faktoren an den Progesteronrezeptor sollten die Mobilität des Ligand-Rezeptorkomplexes in einem nicht denaturierenden Gel verändern. EGF induzierte Änderungen in der Mobilität des Rezeptor-DNA Komplexes konnten jedoch in "Bandshift" Experimenten nicht gefunden werden (Abb. 19a, *Krusekopf et al. 1991*). Auch die Spezifität der Rezeptor-DNA Bindung wurde durch EGF nicht beeinflusst (Abb. 19b). Diese Ergebnisse zeigen, daß unter den verwendeten experimentellen Bedingungen bei Extraktpräparation und DNA Bindung wahrscheinlich keine durch EGF bewirkte Modifikation des Progesteronrezeptors und keine Bindung eines Kofaktors an den Rezeptor stattfindet.

Als weitere Möglichkeit könnte ein EGF induzierter Unterschied in der Beteiligung von A- und B-Rezeptor am DNA-Proteinkomplex für die Verstärkung der Genexpression durch EGF verantwortlich sein. Zwar induzieren sowohl A- als auch B-Rezeptor progesteronregulierte Genexpression (*Krett et al. 1988*); es gibt jedoch Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen der A- und der B-Form des Progesteronrezeptors. So aktiviert der B-Rezeptor im Gegensatz zum A-Rezeptor die Transkription eines PRE/GREtkCAT Konstrukts in Abhängigkeit von RU486 (*Meyer et al. 1990*). Die Vermutung einer EGF abhängigen Beteiligung von A- und B-Rezeptor am DNA-Proteinkomplex wird jedoch durch DNA-Protein Bindungsexperimente nicht bestätigt, da kein Unterschied im Verhältnis von A- und B-Rezeptor beim DNA-bindenden Komplex nach Behandlung von Zellen mit R5020 \pm EGF gefunden wurde (Abb. 19a).

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die DNA Bindung in den durchgeführten Experimenten mit Zellextrakten *in vitro* und nicht in der Zelle stattfand und daß die zugefügte DNA frei von Chromatin war. Möglicherweise spiegelt die unter diesen Bedingungen beobachtete Rezeptor-DNA Bindung nicht die *in vivo* vorliegenden Bedingungen wider.

So könnte ein eventuell EGF-abhängig am Rezeptor-DNA Komplex beteiligtes weiteres Protein während der Extraktpräparation von diesem Komplex

dissoziieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden Extraktpräparationen mit geringer Salzkonzentration durchgeführt. Die mit diesen Extrakten gebildeten Protein-DNA Komplexe unterscheiden sich jedoch nicht von den Komplexen mit Extrakten, für deren Präparation 400 mM KCl verwendet wurde. Ein Nachteil der schonenden Extraktpräparation bei geringer Salzkonzentration ist jedoch, daß die spezifisch an die DNA gebundenen Rezeptormoleküle wahrscheinlich nicht extrahiert und somit auch im "Bandshift" nicht untersucht werden können. Wie bei den Untersuchungen zur Phosphorylierung muß bei den DNA Bindungsstudien außerdem berücksichtigt werden, daß eine Veränderung des Rezeptor-DNA Komplexes, die nur bei den *in vivo* an DNA gebundenen Rezeptormolekülen auftritt, wahrscheinlich auch dann nicht erkannt werden könnte, wenn sie bei der Extraktpräparation nicht zerstört würde, da die spezifisch an DNA gebundene Rezeptorfraction nur einen kleinen Teil der durch Hormon aktivierten Rezeptormoleküle ausmacht. Diese Minderheit der veränderten Rezeptormoleküle würde von den *in vivo* nicht DNA gebundenen Rezeptoren überdeckt werden.

Möglicherweise beruht die synergistische Genaktivierung durch Progesteron und EGF auf der Bindung eines zusätzlichen Proteins an den Progesteronrezeptor-PRE Komplex, die *in vitro* nicht nachvollzogen werden kann. Einen Hinweis auf die mögliche EGF-abhängige Beteiligung eines Kofaktors an der DNA Bindung des Progesteronrezeptors gibt die Beobachtung, daß in transient mit pMMTV-CAT transfizierten Zellen im Gegensatz zu stabilen Transfektanden kein EGF Effekt auftritt. In transient transfizierten Zellen liegen die Plasmide in höherer Kopienzahl vor als in stabilen Transfektanden. Ein für den EGF Effekt notwendiger Faktor, der nur in geringer Konzentration in der Zelle vorliegt, könnte bei Vorliegen einer großen Anzahl von Rezeptorbindungsstellen nach transients Transfektion austitriert werden und nicht für alle DNA-gebundenen Rezeptormoleküle zur Verfügung stehen, so daß der EGF Effekt durch Transkriptionsinitiation ohne diesen Kofaktor überdeckt wird. Diese Überlegung bietet einen Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen zum Mechanismus des Synergismus von Progesteron und EGF bei der Genaktivierung.

Literaturverzeichnis

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1989)
Current protocols in molecular biology, **Vol. 1 and 2**, Greene Publishing Ass. and Wiley Interscience

Aviv, H. and Leder, P. (1972)
Purification of biological active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1409 - 1412

Bagchi, M. K., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J. and O'Malley, B. W. (1991)
Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70, *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4998 - 5004

Bates, S. E., Davidson, N. E., Valverius, E. M., Freter, C. E., Dickson, R. B., Tam, J. P., Kudlow, J. E., Lippman, M. E. and Salomon, D. S. (1988)
Expression of transforming growth factor α and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: Its regulation by estrogen and its possible functional significance, *Mol. Endo.* **2**, 543 - 555

Baulieu, E.-E. (1989)
Contraception and other clinical applications of RU486, an antiprogestosterone at the receptor, *Science* **245**, 1351 - 1357

Bazzi, M. D. and Nelsestuen, G. L. (1987)
Mechanism of protein kinase C inhibition by sphingosine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 203 - 207

Beato, M. (1989)
Gene regulation by steroid hormones, *Cell* **56**, 335 - 344

Berridge, M. J. (1987)
Inositol Triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers, *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 159 - 193

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. and Falkow, S. (1977)
Construction and Characterization of new cloning vehicles: II. a multipurpose cloning system, *Gene* **2**, 95 - 113

Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. and Herrlich, P. (1988)
Activation of the *c-fos* gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element, *Oncogene* **3**, 301 - 311

- Buetti, E. and Diggelmann H. (1981)
Cloned mouse mammary tumor virus DNA is biologically active in transfected mouse cells and its expression is stimulated by glucocorticoid hormones, *Cell* **23**, 335 - 345
- Cappelletti, V., Coradini, D. and Granata, G. (1990)
Hormone and growth factor receptors in breast cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **116**, 1171
- Carpenter, G., Stoscheck, C. M., Preston, Y. A. and DeLarco, J. E. (1983)
Antibodies to the epidermal growth factor receptor block the biological activities of sarcoma growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5627 - 5630
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982)
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters, *J. Biol. Chem.* **257**, 7847 - 7851
- Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R. and Welch, W. J. (1985)
The common 90-kd protein component of non-transformed "8S" steroid receptors is a heat-shock protein, *EMBO J.* **4**, 3131 - 3135
- Cato, A. C. B., Henderson, D. and Ponta, H. (1987)
The hormone response element of the mouse mammary tumor virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region, *EMBO J.* **6**, 363 - 368
- Cato, A. C. B., Miksicek, R., Schütz, G., Arnemann, J. and Beato, M. (1986)
The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction, *EMBO J.* **5**, 2237 - 2240
- Cato, A. C. B., Skroch, P., Weinmann, J., Butkeraitis P. and Ponta, H. (1988)
DNA sequences outside the receptor-binding sites differentially modulate the responsiveness of the mouse mammary tumor virus promoter to various steroid hormones, *EMBO J.* **7**, 1403 - 1410
- Cato, A. C. B. and Weinmann, J. (1988)
Mineralocorticoid regulation of transcription of transfected mouse mammary tumor virus DNA in cultured kidney cells, *J. Cell Biol.* **106**, 2119 - 2125
- Cato, A. C. B., Weinmann, J., Mink, S., Ponta, H., Henderson, D. and Sonnenberg, A. (1989)
The regulation of expression of mouse mammary tumor virus DNA by steroid hormones and growth factors, *J. Steroid Biochem.* **34**, 139 - 143

- Chauchereau, A., Loosfelt, H. and Milgrom, E. (1991)
Phosphorylation of transfected wild type and mutated progesterone receptors, *J. Biol. Chem.* **266**, 18280 - 18286
- Chen, C. and Okayama, H. (1987)
High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745 - 2752
- Chen, S. W., Lazar, C. S., Poenie, M., Tsien, R. Y., Gill, G. N. and Rosenfeld, M. G. (1987)
Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor, *Nature* **328**, 820 - 823
- Clark, G. M., McGuire, W. L., Hubay, C. A., Pearson, O. H. and Marshall, J. S. (1983)
Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer, *New Engl. J. Med.* **309**, 1343 - 1347
- Conteas, C. N., McMorrow, B. and Luk, G. D. (1989)
Modulation of epidermal growth factor-induced cell proliferation and receptor binding by insulin in intestinal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 414 - 419
- DeMarzo, A. M., Beck, C. A., Oñate, S. A. and Edwards, D. P. (1991)
Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein, *Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 72 - 76
- Derynck, R. (1988)
Transforming growth factor α , *Cell* **54**, 593 - 595
- Dickson, C., Smith, R., Brookes, S. and Peters, G. (1984)
Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the common integration region *int-2*, *Cell* **37**, 529 - 536
- Estes, P. A., Suba, E. J., Lawler-Heavner, J., Elashry-Stowers, D., Wei, L. L., Toft, D. O., Sullivan, W. P., Horwitz, K. B. and Edwards, D. P. (1987)
Immunologic analysis of human breast cancer progesterone receptors: 1. immunoaffinity purification of transformed receptors and production of monoclonal antibodies, *Biochemistry* **26**, 6250 - 6262
- Eul, J., Meyer, M. E., Tora, L., Bocquel, M. T., Quirin-Stricker, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1989)
Expression of active hormone and DNA-binding domains of the chicken progesterone receptor in *E. coli*, *EMBO J.* **8**, 83 - 90

- Evans, R. M. (1988)
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* **240**, 889 - 895
- Fasel, N., Pearson, K. Buetti, E. and Diggelmann, H. (1982)
The region of mouse mammary tumor virus DNA containing the long terminal repeat includes a long coding sequence and signals for hormonally regulated transcription, *EMBO J.* **1**, 3 - 7
- Foekens, J. A., Portengen, H., van Putten, W. L. J., Peters, H. A., Krijnen, H. L. J. M., Alexieva-Figusch, J. and Klijn, J. G. M. (1989)
Prognostic value of estrogen and progesterone receptors measured by enzyme immunoassays in human breast tumor cytosols, *Cancer Res.* **49**, 5823 - 5828
- Gallahan, D. and Callahan, R. (1987)
Mammary tumorigenesis in feral mice: identification of a new *int* locus in mouse mammary tumor virus (Czech-II)-induced mammary tumors, *J. Virol.* **61**, 66 - 74
- Garner, M. M. and Revzin, A. (1981)
A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system, *Nucl. Acids Res.* **9**, 3047 - 3060
- Ghosh-Dastidar, P., Coty, W. A., Griest, R. E., Woo, D. D. L. and Fox, C. F. (1984)
Progesterone receptor subunits are high-affinity substrates for phosphorylation by epidermal growth factor receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1654 - 1658
- Gorman, C. M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982)
Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044 - 1051
- Goustin, A. S., Leof, E. B., Shipley, G. D. and Moses, H. L. (1986)
Growth factors and cancer, *Cancer Res.* **46**, 1015 - 1029
- Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Lescop, P., Perrot-Appianat, M. and Milgrom, E. (1991)
Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor, *EMBO J.* **10**, 3851 - 3859
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Appianat, M. and Milgrom, E. (1989)
Mechanisms of nuclear localisation of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers, *Cell* **57**, 1147 - 1154

- Hagemann, Ph. C., Calafat, J. and Hilgers, J. (1981)
The biology of the mouse mammary tumor virus, *Mammary tumor in the mouse*, ed. Hilgers, J. and Sluyser, M., Elsevier, North-Holland, 392 - 463
- Ham, J., Thomson, A., Neddham, M., Webb, P. and Parker, M. (1988)
Charakterisation of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumor virus, *Nucl. Acids Res.* **16**, 5263 - 5277
- Hannun, Y. A. and Bell, R. M. (1987)
Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses, *Science* **235**, 670 - 674
- Hannun, Y. A., Loomis, C. R., Merrill, A. H. Jr. and Bell, R. M. (1986)
Sphingosin inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets, *J. Biol. Chem.* **261**, 12604 - 12609
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. (1984)
Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C, *Biochemistry* **23**, 5036
- Hoeck, W. and Groner, B. (1990)
Hormone-dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the amino-terminal transactivation domain, *J. Biol. Chem.* **265**, 5403 - 5408
- Hoeck, W., Rusconi, S. and Groner, B. (1989)
Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells, *J. Biol. Chem.* **264**, 14396 - 14402
- Honegger, A. M., Szapary, D., Schmidt, A., Lyall, R., van Obberghen, E., Dull, T. J., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1987)
A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis, *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4568 - 4571
- Horwitz K. B. and Freidenberg G. R. (1985)
Growth inhibition and increase of insulin receptors in antiestrogen-resistant T47D_{co} human breast cancer cells by progestins: implications for endocrine therapies, *Cancer Res.* **45**, 167 - 173
- Horwitz, K. B., Zava, D. T., Thilagar, A. K., Jensen, E. M. and McGuire, W. L. (1978)
Steroid receptor analysis of nine human breast cancer cell lines, *Cancer Res.* **38**, 2434 - 2437

- Housley, P. R., Dahmer, M. K. and Pratt, W. B. (1982)
Inactivation of glucocorticoid-binding capacity by protein phosphatases in the presence of molybdate and complete reactivation by dithiothreitol, *J. Biol. Chem.* **257**, 8615 - 8618
- Hunter, T. and Cooper, J. A. (1981)
Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells, *Cell* **24**, 741 - 752
- Hunter, T. and Sefton, B. M. (1980)
Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1311 - 1315
- Hynes, N. E., Groner, G. and Michalides, R. (1984)
Mouse Mammary Tumor Virus: transcriptional control and involvement in tumorigenesis, *Advan. Cancer Res.* **41**, 155 - 184
- Hynes, N. E., van Ooyen, A., Kennedy, N., Herrlich, P., Ponta, H. and Groner, B. (1983)
Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid-responsive expression of the mouse mammary tumor virus and of an adjacent gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3637 - 3641
- Jantzen, H.-M., Strähle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R. and Schütz, G. (1987)
Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene, *Cell* **49**, 29 - 38
- Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., Catelli, M.-G., Binart, N., Mester, J. and Baulieu, E.-E. (1984)
Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones, *Nature* **308**, 850 - 853
- Karey, K. P. and Sirbasku, D. A. (1988)
Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 β -estradiol, *Cancer Res.* **48**, 4083 - 4092
- Kastner, P., Bocquel, M.-T., Turcotte, B., Garnier, J.-M., Horwitz, K. B., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1990 a)
Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms, *J. Biol. Chem.* **265**, 12163 - 12167

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1990 b)

Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B, *EMBO J.* **9**, 1603 - 1614

Klein-Hitpass, L., Krusekopf, S., Cato, A. C. B., Henderson, D. and Ryffel, G. U. (1991)

Regulation of progesterone receptor activity by antiprogestins *in vitro*, *Cold Spring Harbor Meeting on Regulation of Eukaryotic mRNA Transcription*

Koga, M., Musgrove, E. A. and Sutherland, R. L. (1989)

Modulation of the growth-inhibitory effects of progestins and the antiestrogen hydroxycyclophene on human breast cancer cells by epidermal growth factor and insulin, *Cancer Res.* **49**, 112 - 116

Krämer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., König, H., Loferer, H., Grunicke, H. H., Ponta, H., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J. (1990)

Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells, *Radiat. Environ. Biophys.* **29**, 303 - 313

Krett, N.L., Wei, L. L., Francis, M. D., Nordeen, S. K., Gordon, D. F., Wood, W. M. and Horwitz, K. B. (1988)

Human progesterone A-receptors can be synthesised intracellularly and are biologically functional, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 278 - 285

Krusekopf, S., Chaucereau, A., Milgrom, E., Henderson, D. and Cato, A. C. B. (1991)

Co-operation of progestational steroids with epidermal growth factor in activation of gene expression in mammary tumor cells, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **40**, 239 - 245

Krusekopf, S., Henderson, D. and Cato, A. C. B. (1990)

Co-operation of growth factors and steroid hormones in activation of gene expression in mammary tumor cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **116**, 162

Kurachi, H., Okamoto, S. and Oka, T. (1985)

Evidence for the involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5940 - 5943

Laemmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680 - 685

- Lau, L. F. and Nathans, D. (1987)
Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with *c-fos* or *c-myc*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1182 - 1186
- Logeat, F., Le Cunff, M., Pamphile, R. and Milgrom, E. (1985)
The nuclear-bound form of the progesterone receptor is generated through a hormone-dependent phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 421 - 427
- Lyall, R. M., Zilberstein, A., Gazit, A., Gilon, C. Levitzki, A. and Schlessinger, J. (1989)
Tyrphostins inhibit epidermal growth factor (EGF)-receptor tyrosine kinase activity in living cells and EGF-stimulated cell proliferation, *J. Biol. Chem.* **264**, 14503 - 14509
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory*
- Margolis, B., Rhee, S. G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. and Schlessinger, J. (1989)
EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling, *Cell* **57**, 1101 - 1107
- Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. and Todaro, G. J. (1984)
Rat transforming growth factor type 1: Structure and relation to epidermal growth factor, *Science* **223**, 1079 - 1082
- Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Twardzik, D. R., De Larco, J. E., Stephenson, J. R. and Todaro, G. J. (1983)
Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: Amino acid sequence homology with epidermal growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4684 - 4688
- Massagué, J. (1983)
Epidermal growth factor-like transforming growth factor, *J. Biol. Chem.* **258**, 13614 - 13620
- McDonnell, S. E., Kerr, L. D. and Matrisian, L. M. (1990)
Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun* and activation of protein kinase C, *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4284 - 4293
- Meyer, M.-E., Pornon, A., Ji, J., Bocquel, M.-T., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1990)
Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor, *EMBO J.* **9**, 3923 - 3932

Meyer, T., Regenass, U., Fabbro, D., Alteri, E., Rösel, J., Müller, M., Caravatti, G. and Matter, A. (1989)

A derivative of staurosporine (CGP41251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and *in vitro* anti-proliferative as well as *in vivo* anti-tumor activity, *Int. J. Cancer* **43**, 851 - 856

Miksicek, R., Borgmeyer, U. and Nowock, J. (1987)

Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus, *EMBO J.* **6**, 1355 - 1360

Mink, S. (1988)

Cis-wirkende DNA Sequenzen, die an der zelltypspezifischen Expression des Maus Mamma Tumor Virus beteiligt sind, *Diplomarbeit*

Mink, S., Ponta, H. and Cato, A. C. B. (1990)

The long terminal repeat region of the mouse mammary tumor virus contains multiple regulatory elements, *Nucl. Acids Res.* **18**, 2017 - 2024

Moses, H. L., Yang, E. Y. and Pietenpol, J. A. (1990)

TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights, *Cell* **63**, 245 - 247

Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. and Curran, T. (1984)

Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*, *Nature* **312**, 716 - 720

Muñoz, B. and Bolander, F. F. Jr. (1989)

Prolactin regulation of mouse mammary tumor virus (MMTV) expression in normal mouse mammary epithelium, *Molec. Cell. Endocr.* **62**, 23 - 29

Murphy, L. C., Murphy, L. J., Dubik, D., Bell, G. I. and Shiu, R. P. C. (1988)

Epidermal growth factor gene expression in human breast cancer cells: regulation of expression by progestins, *Cancer Res.* **48**, 4555 - 4560

Murphy, L. J., Sutherland, R. L. and Lazarus, L. (1985)

Regulation of growth hormone and epidermal growth factor receptors by progestins in breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 767 - 773

Murphy, L. J., Sutherland, R. L., Stead, B., Murphy, L.C. and Lazarus, L. (1986)

Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells, *Cancer Res.* **46**, 728 - 734

Musgrove, E. A., Lee, C. S. L. and Sutherland, R. L. (1991)
Progesterins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor α , epidermal growth factor receptor, *c-fos*, and *c-myc* genes, *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5032 - 5043

Nielsen, C. J., Sando, J. J. and Pratt, W. B. (1977)
Evidence that dephosphorylation inactivates glucocorticoid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1398 - 1402

Nishizuka, Y. (1984)
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion, *Nature* **308**, 693 - 698

Nowock J., Borgmeyer, U., Püschel, A. W., and Sippel, A. E. (1985)
The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer, *Nucleic Acids Res.* **13**, 2045 - 2061

Nusse, R. (1988)
The *int* genes in mammary tumorigenesis and in normal development, *TIG* **4**, 291 - 295

Nusse, R., Rijsewijk, F., Wagenaar, E., Roelink, H. and van de Vijver, M. (1988)
Oncogenes in murine and human breast cancer, *Progr. Cancer Res. and Therapy* **35**, ed. Bresciani, F., King, R. J. B., Lippman, M. E. and Raynaud, J.-P., 97 - 101

Nusse, R. and Varmus, H. E. (1982)
Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell* **31**, 99 - 109

Orti, E., Mendel, D. B., Smith, L. I. and Munck, A. (1989)
Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells, *J. Biol. Chem.* **264**, 9728 - 9731

Parks, W. P., Scolnick, E. M. and Kozikowski, E. H. (1974)
Dexamethasone stimulation of murine mammary tumor virus expression: a tissue culture source of virus, *Science* **184**, 158 - 160

Payvar, F., DeFranco, D. Firestone, G. L., Edgar, B., Wrangle, Ö., Okret, S., Gustavsson, J.-Å. and Yamamoto, K. R. (1983)
Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region, *Cell* **35**, 381 - 392

Perrot-Appianat, M., Groyer-Picard, M.-T., Lorenzo, F. Jolivet, A., Hai, M. T. V., Pallud, C., Spyrtos, F. and Milgrom, E. (1987)
Immunocytochemical study with monoclonal antibodies to progesterone receptor in human breast tumors, *Cancer Res.* **47**, 2652 - 2661

- Perrot-Applanat, M., Logeat, F., Groyer-Picard, M.-T. and Milgrom, E. (1985)
Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies, *Endocrinology* **116**, 1473 - 1484
- Peters, G., Lee, A. E. and Dickson, C. (1986)
Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumor virus, *Nature* **320**, 623 - 631
- Pike, J. W. and Sleator, N. M. (1985)
Hormone-dependent phosphorylation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in mouse fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 378 - 385
- Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N. E. and Groner, B. (1985)
Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat can be dissociated from the proviral promoter and has enhancer properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1020 - 1024
- Posner, I., Gazit, A., Gilon, C. and Levitzki, A. (1989)
Tyrphostins inhibit the epidermal growth factor receptor-mediated breakdown of phosphoinositides, *FEBS Letters* **257**, 287 - 291
- Quantin, B. and Breathnach, R. (1988)
Epidermal growth factor stimulates transcription of the *c-jun* proto-oncogene in rat fibroblasts, *Nature* **334**, 538 - 539
- Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P. (1990)
Regulation of gene expression by tumor promoters, *Pharmac. Ther.* **48**, 157 - 188
- Rao, K. V. S. and Fox, C. F. (1987)
Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of human glucocorticoid receptor in cultured cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 512 - 519
- Rao, K. V. S., Peralta, W. D., Greene, G. L. and Fox, C. F. (1987a)
Cellular progesterone receptor phosphorylation in response to ligands activating protein kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 1357 - 1365
- Rao, K. V. S., Williams, R. E. and Fox, C. F. (1987b)
Altered glucocorticoid binding and action in response to epidermal growth factor in HBL100 cells, *Cancer Res.* **47**, 5888 - 5893
- Raynaud, J.-P. and Ojasoo, T. (1983)
The relevance of structure-affinity relationships in the study of steroid hormone action, *Steroid Hormone Receptors: Structure and Function*, ed. Eriksson, H. and Gustavsson, J.-A., 141 - 170

- Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C. and Baulieu, E.-E. (1987)
Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus, *J. Biol. Chem.* **262**, 6969 - 6975
- Salomon, D. S., Zwiebel, J. A., Bano, M., Losonczy, I., Fehnel, P. and Kidwell, W. R. (1984)
Presence of transforming growth factors in human breast cancer cells, *Cancer Res.* **44**, 4069 - 4077
- Sanches, E. R. (1990)
Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes, *J. Biol. Chem.* **265**, 22067 - 22070
- Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J. and Pratt, W. B. (1985)
Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein, *J. Biol. Chem.* **260**, 12398 - 12401
- Sarup, J. C., Rao, K. V. S. and Fox, C. F. (1988)
Decreased progesterone binding and attenuated progesterone action in cultured human breast carcinoma cells treated with epidermal growth factor, *Cancer Res.* **48**, 5071 - 5078
- Scheidereit, C., Geisse, S. Westphal H. M. and Beato, M. (1983)
The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus, *Nature* **304**, 749 - 752
- Schreiber, A. B., Winkler, M. E. and Derynck, R. (1986)
Transforming Growth Factor α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor, *Science* **232**, 1250 - 1253
- Sen, G. C., Smith, S. W., Marcus, S. L. and Sarkar, N. H. (1979)
Identification of the messenger RNAs coding for the gag and env gene products of the murine mammary tumor virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1736 - 1740
- Sheridan, P. L., Evans, R. M. and Horwitz, K. B. (1989)
Phosphotryptic peptide Analysis of human progesterone receptors, *J. Biol. Chem.* **264**, 6520 - 6528
- Singletary, S. E., Baker, F. L., Spitzer, G., Tucker, S. L., Tomasovic, B., Brock, W. A., Ajani, J. A. and Kelly, A. M. (1987)
Biological effect of epidermal growth factor on the *in vitro* growth of human tumors, *Cancer Res.* **47**, 403 - 406

- Smith, D. F., Faber, L. E. and Toft, D. O. (1990)
Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins, *J. Biol. Chem.* **265**, 3996 - 4003
- Snedeker, S. M., Brown, C. F. and DiAugustine, R. P. (1991)
Expression and functional properties of transforming growth factor α and epidermal growth factor during mouse mammary gland ductal morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 276 - 280
- Southern, P. J. and Berg, P. (1982)
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter, *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327 - 341
- Stoscheck, C. M. and King, L. E. Jr. (1986)
Role of epidermal growth factor in carcinogenesis, *Cancer Res.* **46**, 1030 - 1037
- Sutcliffe, J. G. (1979)
Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 77
- Taketani Y. and Oka, T. (1983)
Possible physiological role of epidermal growth factor in the development of the mouse mammary gland during pregnancy, *FEBS Letters* **152**, 256 - 260
- Tonelli, Q. J. and Sorof, S. (1980)
Epidermal growth factor requirement for development of cultured mammary gland, *Nature* **285**, 250 - 252
- Topper, Y. J. and Freeman, C. S. (1980)
Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland, *Physiological Reviews* **60**, 1049 - 1106
- Ushiro, H. and Cohen, S. (1980)
Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes, *J. Biol. Chem.* **255**, 8363 - 8365
- Valverius, E. M., Bates, S. E., Stampfer, M. R., Clark, R., McCormick, F., Salomon, D. S., Lippman, M. E. and Dickson, R. B. (1989)
Transforming growth factor α production and epidermal growth factor receptor expression in normal and oncogene transformed human mammary epithelial cells, *Mol. Endo.* **3**, 203 - 214

- Varmus, H. E. (1982)
Form and function of retroviral proviruses, *Science* **216**, 812 - 820
- von der Ahe, D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schütz, G. and Beato, M. (1985)
Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters, *Nature* **313**, 706 - 709
- Wahl, M. I., Daniel, T. O. and Carpenter, G. (1988)
Antiphosphotyrosine recovery of phospholipase C activity after EGF treatment of A-431 cells, *Science* **241**, 968 - 970
- Weaver, R. F. and Weissmann C. (1979)
Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15S β -globin mRNA precursor and mature 10S β -globin mRNA have identical map coordinates, *Nucl. Acids Res.* **7**, 1175 - 1193
- Winkler, M. E., Bringman, T. and Marks, B. J. (1986)
The purification of fully active recombinant transforming growth factor α produced in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **261**, 13838 - 13843
- Woo, D. D. L., Fay, S. P., Griest, R., Coty, W., Goldfine, I. and Fox, C. F. (1986)
Differential phosphorylation of the progesterone receptor by insulin, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor receptor tyrosine protein kinases, *J. Biol. Chem.* **261**, 460 - 467
- Yaish, P., Gazit A., Gilon, C. and Levitzki, A. (1988)
Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors, *Science* **242**, 933 - 935
- Zajchowski, D., Band, V., Puzie, N., Tager, A., Stampfer, M. and Sager, R. (1988)
Expression of growth factors and oncogenes in normal and tumor-derived human mammary epithelial cells, *Cancer Res.* **48**, 7041 - 7047