



KfK 4766
August 1990

Transkriptionsfaktoren, die sich an Regulationselemente von leberspezifisch exprimierten Genen binden

W. Kugler
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4766

**Transkriptionsfaktoren, die sich an Regulationselemente
von leberspezifisch exprimierten Genen binden**

Wilfried Kugler

Dissertation
genehmigt von der
Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der
Universität Karlsruhe (TH)

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

Die Vitellogenin- und Albumingene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden leberspezifisch exprimiert. In vivo und in vitro Experimente führten zur Identifikation dreier cis-wirkender Regulationselemente: AABS (A-Aktivator-Bindungsstelle), BABS (B-Aktivator-Bindungsstelle) und HP1 (hepatozytenspezifisches Promotorelement 1)

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Transkriptionsfaktoren, die diese DNA-Elemente erkennen, zu identifizieren.

"Bandshift"-Analysen mit Rattenleberkernproteinen haben bewiesen, daß die AABS von mehreren DNA-bindenden Proteinen, den AAP (A-Aktivator-Proteinen), erkannt wird. Dazu gehören die beiden Transkriptionsfaktoren C/EBP (Enhancer-bindendes Protein) und HPF1 (hepatozytenspezifischer-Promotorfaktor 1). Vier der AAP haben ein Molekulargewicht von 63 kDa, 51 kDa, 33 kDa und 29 kDa, bestimmt durch Protein-DNA-Vernetzung mit UV-Licht ("UV cross-link").

An die BABS binden sich in "Bandshift"-Analysen zwei Transkriptionsfaktoren: Komplex 1 kann durch die Bindungsstelle des Proteins USF/MLTF des "adeno major late promoter" kompetiert werden, während Komplex 2 ein anderes Protein enthält, das als BAP (B-Aktivator-Protein) bezeichnet wird. Man findet die BABS-Sequenz ebenfalls im Enhancer des Hepatitis-B-Virus. BAP-Bindungsaktivität läßt sich in allen bisher getesteten Kernextrakten nachweisen; es scheint also ubiquitär zu sein. Das Molekulargewicht von BAP beträgt, basierend auf "UV cross-link"-Experimenten, 58 kDa. Phosphatasebehandlung beweist, daß Phosphorylierung von BAP für seine DNA-Bindung absolut erforderlich ist.

Die HP1-Sequenz interagiert mit dem leberspezifischen Protein HPF1. Man findet HP1 in mehreren leberspezifisch exprimierten Genen. Die Durchführung von "Bandshift"-Kompetitionsexperimenten hat gezeigt, daß die zu HP1 homologen Promotorelemente aus dem alpha-1-Antitrypsin-, dem beta-Fibrinogen- und dem alpha-Fötoprotein-Gen vom gleichen Transkriptionsfaktor erkannt werden, während die ebenfalls homologe Sequenz aus dem Transferrin-Gen unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweist. HPF1 ist ein glykosyliertes, DNA-bindendes Protein, dessen Molekulargewicht, bestimmt durch "UV cross-link"-Analyse, 87 kDa beträgt.

"Bandshift"-Kompetitionsexperimente sowie verschiedene Charakteristika wie Zelltypspezifität, posttranslationale Modifikation, Molekulargewicht und chromatographisches Trennverhalten zeigen, daß es sich bei den AAP, BAP und HPF1 um verschiedene Transkriptionsfaktoren handelt.

Transcription factors that recognize regulatory elements of genes specifically expressed in the liver

Summary

The vitellogenin and albumin genes of the clawed frog *Xenopus* are expressed specifically in the liver. By in vivo and in vitro experiments three regulatory elements could be identified: AABS (A-activator binding site), BABS (B-activator binding site) and HP1 (hepatocyte-specific promoter element 1).

In this thesis I was able to identify the transcription factors recognizing these DNA elements.

Bandshift analysis with proteins from rat liver nuclei demonstrated that the AABS is recognized by several DNA binding proteins, the AAP (A-activator proteins), including the well known transcription factors C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) and HPF1 (hepatocyte-specific promoter factor 1), also known as HNF1/LFB1. The molecular weights of four of the AAP determined by UV cross-linking experiments were 63 kDa, 51 kDa, 33 kDa and 29 kDa, respectively.

Two transcription factors are bound to the BABS in bandshift experiments as complexes 1 and 2: complex 1 can be competed by adding an oligonucleotide containing the binding site for the protein USF/MLTF on the adeno major late promoter, indicating that this protein or a related protein is in this complex. Complex 2 is generated by another protein, termed BAP (B-activator protein). BAP binding activity can be detected in all nuclear extracts tested so far. It therefore seems to be a ubiquitous factor. The molecular weight of BAP, based on UV cross-linking experiments, is 58 kDa. Phosphatase treatment reveals that phosphorylation is absolutely required for its DNA binding activity.

HP1 interacts with the liver-specific protein HPF1. HP1 is present in a variety of genes specifically expressed in the liver. Bandshift competition experiments established that the HP1 homologues from the alpha-1-antitrypsin, the β -fibrinogen and the alpha-fetoprotein genes are recognized by the same transcription factor, i.e. HPF1. In contrast, the HP1 homologue from the transferrin gene has distinctive features. HPF1 is a glycosylated DNA binding protein, whose molecular weight was determined by UV cross-linking experiments as 87 kDa.

Bandshift competition experiments as well as different characteristics, e.g. posttranslational modification, molecular weight and chromatographic behaviour demonstrated that the AAP, BAP and HPF1 are distinct transcription factors.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	
Abkürzungen	
EINLEITUNG	1
MATERIALIEN UND METHODEN	10
Materialien.....	10
1. Chemikalien, Enzyme, Arbeitsmittel.....	10
2. Radiochemikalien.....	11
3. Kernextrakte.....	12
4. Oligonukleotide.....	12
Methoden.....	13
1. Analyse von Nucleinsäuren.....	13
1.1 Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren.....	13
1.2 Extraktion von Nucleinsäuren.....	13
1.3 Fällung von Nucleinsäuren.....	13
1.4 Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendo- nucleasen.....	14
1.5 Dephosphorylierung von DNA-Strangenden.....	14
2. DNA-Gelelektrophorese.....	14
2.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	14
2.2 Acrylamid-Gelelektrophorese.....	15
2.3 Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele.....	15
3. Markierung von DNA mit Radionukleotiden.....	17
3.1 Extraktion und Reinigung von Oligonukleotiden.....	17
3.2 Kinasierung von DNA.....	18
3.3 Auffüllen von 5'-Überhängen mit alpha- ³² P-dCTP.....	18
3.4 Gelfiltration über Sephadex G50.....	19
4. Analyse von Proteinen.....	19
4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	19
4.3 Silberfärbung von Proteingelen.....	21
5. Proteinbindung an DNA, in vitro.....	21
5.1 "Bandshift"-Analyse.....	21
5.2 Protein-DNA-Vernetzung mit UV-Licht ("UV cross-link").....	22

5.3	Behandlung mit saurer Phosphatase	23
5.4	"Methylation interference" Analyse	23
5.4.1	Präparation der markierten DNA-Fragmente.....	23
5.4.2	Methylierungsreaktion.....	24
5.4.3	"Bandshift"-Assay und Elution der DNA	24
5.4.4	Piperidinspaltung und Auftrennung der Spaltprodukte.....	25
6.	Proteinreinigung	26
6.1	Präparation von Rattenleberkernextrakt (nach Gorski)	26
6.2	Präparation von Rattenleberkernextrakt (nach Dignam)	27
6.3	Präparation einer DNA-Affinitätssäule	28
6.4	Reinigung des Transkriptionsfaktors BAP	29
6.5	Reinigung des Transkriptionsfaktors HPF1	30
ERGEBNISSE		32
1.	Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die an der Expression der Vitellogeningene beteiligt sind.....	32
1.1	Die Faktoren des Vitellogenin-A2-Gens.....	32
1.1.1	Die AABS wird von mehreren Transkriptionsfaktoren erkannt.....	32
1.1.2	Der Transkriptionsfaktor C/EBP erkennt die AABS.....	35
1.2	Die Faktoren des Vitellogenin-B1-Gens.....	38
1.2.1	BABS wird von zwei DNA-bindenden Proteinen erkannt	38
1.2.2	Je drei Guaninnukleotide interferieren auf dem oberen und unteren DNA-Strang der BABS mit der Proteinbindung.	39
1.2.3	Mehrere Gene enthalten ein DNA-Element mit Ähnlichkeit zur BABS	42
2.	Mehrere leberspezifisch exprimierte Gene enthalten das Promotorelement HP1, das vom gleichen Trans- kriptionsfaktor erkannt wird.....	44
3.	Vergleichende Analyse der Transkriptionsfaktoren, die die AABS, BABS und HP1 erkennen.....	48
3.1	Die Faktoren AAP, BAP und HPF1 sind nicht identisch	48
3.2	AAP, BAP und HPF1 existieren in verschiedenen Zelltypen..	50
3.3	Die Faktoren AAP, BAP und HPF1 sind unterschiedlich modifiziert	52
3.4	Molekulargewicht der Faktoren AAP, BAP und HPF1	55
4.	Reinigung der Faktoren AAP, BAP und HPF1	58
4.1	Reinigung des Transkriptionsfaktors BAP.....	59
4.2	BAP unterscheidet sich von dem Transkriptionsfaktor USF/MLTF.....	66
4.3	Reinigung des leberspezifischen Transkriptionsfaktors HPF1.....	67

DISKUSSION	69
1. AAP, BAP und HPF1 repräsentieren unterschiedliche Transkriptionsfaktoren.....	69
1.1 Mehrere Faktoren erkennen die AABS	71
1.2 BAP, der Faktor, der die BABS erkennt.....	73
1.3 HPF1, ein leberspezifischer Faktor, der das HP1 erkennt.....	76
2. Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der gewebe- spezifischen Genexpression.....	78
3. Regulationselemente und Transkriptionsfaktoren, die im Verlauf der Evolution erhalten geblieben sind.....	82
LITERATURVERZEICHNIS	86

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AgNO ₃	Silbernitrat
Ag ₂ O	Silber-(I)-oxid
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine (Rinder)-serumalbumin
CNBr	Cyanbromid
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CuSO ₄	Kupfer-(II)-sulfat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TBq, GBq, MBq	Tera-, Giga- bzw. Mega-Becquerel
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaN ₃	Natriumazid
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions (Umdrehungen) pro Minute
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolette Strahlung

EINLEITUNG

Eine zentrale molekularbiologische Fragestellung ist, wie die Information, die in der DNA enthalten ist, die Entwicklung eines befruchteten Eies zu einem bestimmten Organismus steuern kann.

Jedes Organ des ausgewachsenen Organismus führt eine typische Aufgabe aus und besteht aus spezialisierten Geweben, die sich ihrerseits aus verschiedenen Zellen zusammensetzen. In der Regel haben alle Zellen in einem vielzelligen Organismus bis auf wenige Ausnahmen die gleiche genetische Information in ihrer DNA verschlüsselt. Spezialisierte Zellen nutzen jedoch nur einen kleinen Teil des großen genetischen Potentials und erzeugen ein bestimmtes Sortiment von Proteinen. Die Ausdifferenzierung embryonaler Gewebe erfordert den Übergang zur Produktion gewebespezifischer Proteine, d.h. von Muskelproteinen in Muskelzellen, von Leberproteinen in Leberzellen, usw. Daraus ergeben sich zwei verschiedene Problemkreise:

Erstens: Wie werden Gene in differenzierten Zellen, d.h. verschiedenen Zelltypen unterschiedlich exprimiert?

Zweitens: Wie kommt es im Verlauf der Embryogenese zu dieser differentiellen Genexpression?

Um die erste Frage beantworten zu können, ist es wichtig zu wissen, wie eine Zelle nach ihren Bedürfnissen bestimmte Gene an- und abschalten kann. Ob ein bestimmtes Gen in mRNA umgeschrieben wird, entscheidet sich häufig bei der Initiation der Transkription, einem wichtigen Angriffspunkt für Regulationsmechanismen. Die wesentlichen Komponenten der Transkriptionskontrolle sind verschiedene cis-wirkende DNA-Sequenzen, Promotor und Enhancer, die sich meistens in der Nähe der kodierenden Region eines Gens befinden. Sie treten mit regulatorisch wirkenden Proteinen, die diese Sequenzen erkennen, in Wechselwirkung und beeinflussen damit die Funktion der Polymerase. Es hat sich gezeigt, daß sowohl Promotoren als auch Enhancer aus mehreren genetischen Funktionsbausteinen (Modulen) zusammengesetzt sind

(44). Ein gutes Beispiel für eine solche modulare Anordnung von DNA-Segmenten sind die Metallothioneingene der Maus und des Menschen. Deren Kontrollregionen enthalten verschiedene Module, die auf transkriptionelle Induktion durch Phorbolster, Schwermetalle oder Glucocorticoide reagieren (140). Der Ausdruck Promotor bezeichnet eine Gruppe von Kontrollmodulen, die um die Transkriptionsstartstelle herum angeordnet sind. Das bekannteste Beispiel ist die TATA-Box, zuständig für die korrekte Initiation der Transkription. Verantwortlich für die Effizienz der Transkriptionsinitiation sind sog. "upstream promoter elements, UPE," ca. 50-150 bp oberhalb des Transkriptionsstarts, z.B. die CCAAT- und die GC-Box (1, 140, 163).

Zum erstenmal 1981 beschrieben, sind Enhancer in großer Anzahl aus viralen und zellulären Genen charakterisiert worden (95). Die Eigenschaften dieser Kontrollelemente, die ebenfalls modularen Aufbau zeigen (1, 44), bilden zugleich die Grundlage für die Definition eines Enhancers: Verstärkung der Expression homologer und heterologer Promotoren, von der Orientierung unabhängige Funktionsweise sowie Wirkung über große Entfernungen hinweg, unabhängig von der Position. Enhancer können wie beim Maus-Albumingen sehr weit 5' (120), in manchen Fällen, z.B. bei den Immunglobulinen, 3' von der Transkriptionsstartstelle lokalisiert sein (109) oder sogar, wie das Beispiel des Hepatitis-B-Virus-Enhancers zeigt, innerhalb einer proteinkodierenden Region liegen (141, 151). Seit einiger Zeit ist eine genaue Abgrenzung zwischen Enhancer und "UPE" nicht mehr möglich, da sich beide strukturell und funktionell überlappen können. Eindrucksvolles Beispiel dafür ist die einzige Klasse regulatorischer Elemente bei der Hefe, die sog. "upstream activation sequences, UAS," die beide Eigenschaften besitzt (58).

Seit der Charakterisierung des GC-Box-bindenden Faktors Sp1 (13) stieg die Anzahl der gereinigten Transkriptionsfaktoren, die mit Promotor- und Enhancer-Elementen interagieren, sprunghaft an. Dies war und ist nicht zuletzt dank der Entwicklung leistungsfähiger Techniken möglich. Beispiele sind die Entwicklung zellfreier

Extrakte (40, 56), "Footprint"-Analyse (51, 81, 154) und "Bandshift"-Assays (3, 53, 143), mit denen es gelang, selbst geringe DNA-Bindungsaktivitäten in Rohextrakten verschiedenster Herkunft nachzuweisen. Schließlich konnte die Reinigung dieser Proteine beschleunigt werden durch die Weiterentwicklung der sequenzspezifischen DNA-Affinitätschromatographie (75, 86, 169).

Eine Klassifizierung der unterschiedlichsten Faktoren wird dadurch erleichtert, daß sie eine getrennte DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomäne besitzen (104). Viele verschiedene Proteine erkennen die DNA auf Grund von gemeinsamen Strukturmotiven. Am besten untersucht ist das Helix-Turn-Helix-Motiv (71, 146, 148), das man z.B. bei den Produkten der Drosophila-Gene "antennapedia, fushi tarazu und ultrabithorax" findet (85, 142), sowie das Zink-Finger-Motiv, dessen beide Klassen durch den TFIIIA- und den Steroidhormonrezeptor-Typ repräsentiert werden (7, 47, 78, 103, 148). Einen Hinweis auf die Existenz eines dritten Strukturtyps lieferten Homologien in der Aminosäuresequenz zwischen den Produkten der Onkogene fos, jun, myc und des Hefeproteins GCN4 (157). Zum erstenmal beschrieben wurde dieser sog. "leucine zipper" für das Enhancer-bindende Protein C/EBP (17, 84, 100, 114). Ebenfalls ein Sequenzvergleich führte dazu, ein neues, viertes DNA-Bindungsmotiv, die sog. "Helix-Loop-Helix"-Struktur, vorzuschlagen (111). Dieses hypothetische Motiv besteht aus zwei amphipathischen α -Helices, die durch eine Schleifenregion unterschiedlicher Länge voneinander getrennt sind (5, 111). Verantwortlich für die Aktivierung der Transkription durch DNA-bindende Proteine sind drei Haupttypen von Aktivierungsdomänen. Die charakteristischen Aminosäurereste sind bevorzugt sauer, wie z.B. bei GAL4 (122), reich an Prolin, wie z.B. bei CTF/NF-I (102) oder reich an Glutamin, wie z.B. beim GC-Box Faktor Sp1 (34).

Im Gegensatz zu typisch bakteriellen Repressor- und Aktivatorproteinen zeichnen sich eukaryontische Regulationsproteine durch mehrere unerwartete Eigenschaften aus. So kann ein Protein mehrere DNA-Bindungsstellen erkennen, die nur minimale Sequenzhomologien aufweisen. Beispiele sind das Hefeprotein HAP1

(71, 119), der Glucocorticoidrezeptor (71, 106) und das Enhancer-bindende Protein C/EBP (32, 72, 101). Das genaue Gegenteil, daß ein einziges DNA-Element von mehreren Regulationsproteinen erkannt wird, demonstrieren am eindrucksvollsten die Oktamer- (134, 138) und die CCAAT-bindenden Proteine (43, 71, 128). Drittens schließlich benötigt eine steigende Anzahl von Transkriptionsfaktoren das Zusammenwirken von zwei verschiedenen Polypeptidketten. Beispiele sind die CCAAT-bindenden Proteine (25, 65, 71), HAP2/HAP3 aus Hefe (61, 71) sowie die Produkte der Onkogene fos und jun (37, 71, 156).

Neben diesen beobachteten generellen Eigenschaften und Kontrollmechanismen für die Expression von Genen gibt es auch gewebespezifische Mechanismen. Bisher wurden zahlreiche Enhancer- und Promotorelemente definiert, die für eine gewebespezifische Regulation von Genen verantwortlich sind oder dazu beitragen (38, 94, 95, 109, 129, 163). Allerdings konnte daraus kein genereller Regulationsmechanismus abgeleitet werden. Inzwischen nimmt man an, daß ein gemeinsamer Satz von zellspezifischen Transkriptionsfaktoren die Grundlage für eine koordinierte Kontrolle der Genexpression bildet. Jeder Promotor scheint aber nur Bindungsstelle für einen Teil dieser zellspezifischen Faktoren zu besitzen. Auf Grund der individuellen Kombination seiner Komponenten hat der Transkriptionskomplex jedes Gens seine einzigartige Struktur. Das erklärt auch die Beobachtung, daß gewebespezifisch exprimierte Gene in unterschiedlichstem Ausmaß transkribiert werden und auf verschiedene externe Stimuli (Hormone, Xenobiotika, Nahrungsaufnahme oder pathologische Bedingungen) reagieren können.

Jede Zelle zeichnet sich durch ein spezielles Muster von aktiven und inaktiven Genen aus, das sich im Laufe der Entwicklung fortwährend ändert. Soll die Entwicklung eines Embryos fehlerlos ablaufen, müssen sowohl der Zeitpunkt der einzelnen Entwicklungsschritte als auch die räumliche Anordnung der Gewebe präzise reguliert werden. So ist z.B. das Muster der Genexpression

während der Entwicklung der Leber durch zahlreiche Umstellungen gekennzeichnet (116).

Als geeignetes Modellsystem für eine solche Analyse der Genexpression bieten sich die Vitellogenin- und Albumingene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* an: Sie werden hormon- und geschlechtsspezifisch ebenso wie entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert (136, 158, 159, 164). Der Schwerpunkt meiner Arbeit liegt auf der gewebespezifischen Genregulation. Sie läßt sich experimentell viel besser analysieren als die entwicklungsspezifische Regulation. Letztere ist einer gezielten Untersuchung schwerer zugänglich, da man bisher transgene Frösche mit regulierbaren Genen nicht herstellen kann (159).

Ein wichtiger Weg, der zum besseren Verständnis der gewebespezifischen Regulationsmechanismen beiträgt, ist die Analyse von Genen in heterologen Systemen, z.B. von Froschgenen in Säugerzellen. Dieser experimentelle Ansatz ist möglich, da bekannt ist, daß bestimmte cis-Elemente und die korrespondierenden Transkriptionsfaktoren während der Evolution erhalten geblieben sind (148).

Die vier Vitellogeningene A1, A2, B1 und B2 kodieren die Vorläufer der Dotterproteine von *Xenopus laevis* (158, 159, 160). *Xenopus* synthetisiert Vitellogenin wie alle eierlegenden Vertebraten in der Leber unter der Kontrolle von Östrogen (162). Dieses Hormon aktiviert nicht nur die Transkription, sondern erhöht auch die Stabilität der entsprechenden mRNA (9). Die Vitellogeningene können durch Östrogengabe auch in Männchen induziert werden. Die Kompetenz wird während der Metamorphose erworben und durch Thyroxin induziert (68). Vitellogenin wird als stark modifiziertes Calcium-bindendes Phospholipoglycoprotein ins Blut sezerniert, zum Ovar transportiert, selektiv über Rezeptor-gekoppelte Endocytose von den Oocyten aufgenommen und in die Dotterproteine Lipovitellin 1 und 2, Phosvitin sowie Phosvettes I und II gespalten (159). Dort dient es dann als Nahrungsquelle für den sich entwickelnden Embryo.

Analysen der Kern-RNA (126), der Chromatinstruktur (54) als auch direkte Transkriptionsmessungen *in vivo* (14) und *in vitro* (165) haben schlüssig gezeigt, daß die Vitellogeningene auf der Ebene der Transkription aktiviert werden.

Um regulatorische Elemente in den *Xenopus*-Vitellogeningenen zu identifizieren, die für die leberspezifische Expression dieser Gene verantwortlich sind, wurden verschiedene Hybridgene in Transfektionsexperimenten eingesetzt (77). Diese Konstrukte enthielten Deletionsmutanten aus dem 5'-flankierenden Bereich des Vitellogenin-A2-Gens (von Position -482 bis -87 relativ zur Transkriptionsstartstelle) verbunden mit dem Thymidinkinase-Promotor aus dem Herpes-Simplex-Virus, die vor das bakterielle Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Gen kloniert wurden. Durch Transfektion dieser Fusionsgene in die menschliche Brustkrebszelllinie MCF7 konnte eine gesteigerte CAT-Aktivität gemessen werden (55) auf Grund der Anwesenheit der Vitellogenin-gensequenzen aus dem 5'-flankierenden Bereich. Die Verwendung von Deletionsklonen unterschiedlicher Länge führte zur Entdeckung eines auf Östrogen reagierenden Elements (ERE) und einer hormonunabhängigen aktivierenden Sequenz (77). Diese A-Aktivator-Bindungsstelle (AABS) ist zwischen -121 und -87 im Vitellogenin-A2-Gen lokalisiert. Sie besteht aus drei Subelementen, von denen Element 1 und 2 ein partielles Palindrom bilden und unabhängig voneinander wirken können, in Kombination wirken sie jedoch synergistisch. Subelement 3 für sich allein ist nicht aktiv, unterstützt aber die Elemente 1 und 2 in Kombination mit ihnen (42). Diese Resultate konnten in einem *in vitro* Transkriptionssystem mit Rattenleberkernextrakt bestätigt werden (42). Eine Ausnahme stellt Element 3 dar: *In vitro* besitzt es nur minimalen Einfluß in Kombination mit den Elementen 1 und 2, während es *in vivo* unterstützend wirkt (42). Funktionelle Analysen wiesen nach, daß dieser DNA-Abschnitt eines Froschgens zellspezifische Genexpression vermittelt (42). Er ist z.B. aktiv in Hepatomzellen des Menschen (HepG2) und der Maus (BW1J), in Kernextrakt aus Rattenleber, nicht aber in menschlichen Zervixkarzinomzellen

(HeLa). Dies deutet darauf hin, daß die Faktoren, die an der leberspezifischen Genexpression beteiligt sind, innerhalb verschiedener Wirbeltierspezies konserviert worden sind.

Da die A- und B-Vitellogenine in der Froschleber koordiniert exprimiert werden (98, 159), erwartet man identische Regulations-elemente auch in der 5'-Region der Vitellogenin-B-Gene. Die der Aktivator-Bindungsstelle entsprechende Sequenz aus dem Vitellogenin-B1-Gen ist allerdings nicht in der Lage, die Transkription zu stimulieren (K. Roß, unveröffentlichte Ergebnisse). Die daraufhin durchgeführte funktionelle Analyse mit verschiedenen Deletionen aus dem 5'-flankierenden Bereich des Vitellogenin-B1-Gens (von Position -240 bis -48) brachte als Ergebnis die Identifikation eines neuen Regulationselements (79). Die Sequenz zwischen -55 und -37 ist ein positiv wirkendes DNA-Element, das als B-Aktivator-Bindungsstelle (BABS) des Vitellogenin-B1-Gens definiert wird. Es unterscheidet sich von bereits charakterisierten DNA-Elementen, ist aber wie die AABS in Rattenleberkernextrakt aktiv (79).

Albumin, das häufigste Plasmaprotein der Vertebraten (150), wird in großen Mengen ausschließlich von der Leber synthetisiert und sezerniert. Es scheint an der Regulation des osmotischen Gleichgewichts beteiligt zu sein, da in vielen Fällen von angeborener Albuminurie ein Ödem als Hauptkomplikation entsteht (38).

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* besitzt im Gegensatz zu den anderen Vertebraten zwei Albumingene, die ein 68 kDa- und 74 kDa-Protein kodieren (164), und die in der Leber von Kaulquappe und Frosch aktiv sind (125). Der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Albumine ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß das 74 kDa-Albumin im Gegensatz zum 68 kDa-Albumin glykosyliert ist (99). Die Albuminexpression wird bei *Xenopus* im Gegensatz zu Säugern durch verschiedene Faktoren moduliert. So ist z.B. Östrogen in der Lage, die Albuminsynthese drastisch zu reduzieren (76, 98, 167).

Um DNA-Elemente zu erfassen, die an der gewebespezifischen Regulation der Albumin-Genexpression beteiligt sind, wurden verschiedene 5'-Deletionen des *Xenopus*-68kDa-Albumin-Gens (von

Position -662 bis +19) vor das bakterielle CAT-Gen kloniert und transient in Säugerzellen transfiziert (137). Durch fortschreitende 5'-Deletionen, Sequenzvergleiche mit den Albumingenen anderer Vertebraten sowie Mutationsanalyse gelang es, ein 13 bp großes Promotorelement zu identifizieren (137). Diese DNA-Sequenz, das hepatozytenspezifische Promotorelement 1 (HP1), vermittelt selektive Expression in Hepatomzellen und hohe transkriptionelle Aktivität in vitro in Rattenleberkernextrakt, nicht dagegen in L- und HeLa-Zellextrakt (124, 137). Da HP1 aus einem Froschgen stammt, in Säugerzellen funktionell ist und ähnliche Sequenzen in entsprechenden Regionen von Albumin- und α -Fötoproteingenen verschiedener Säuger vorkommen (137), muß hier ein stark konserviertes Regulationssystem vorliegen.

Funktionelle Analysen der Vitellogenin- und Albumingene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* führten zur Identifikation von drei verschiedenen cis-wirkenden DNA-Elementen: AABS, BABS und HP1. Diese Differenz in den leberspezifischen Regulationselementen stimmt überein mit der differentiellen leberspezifischen Expression dieser beiden Gene im Verlauf der Ontogenese. Während die Albumingene schon in der Leber der Kaulquappe aktiv sind (125), sind die Vitellogeningene erst nach der Metamorphose in der Froschleber induzierbar (68).

Zielsetzung

Vielzellige Organismen zeichnen sich durch eine gewebe-spezifische Genexpression aus, die hauptsächlich auf einer selektiven Transkription der Gene beruht.

Bei den bisherigen funktionellen Untersuchungen wurden die drei cis-Elemente AABS, BABS und HP1 identifiziert (42, 79, 137). Da die Anwesenheit von AABS, BABS oder HP1 die transkriptionelle Aktivität eines Promotors in vitro in Kernextrakt aus Rattenleber erhöht (42, 79, 124, 137), müssen Transkriptionsfaktoren in Hepatozyten existieren, die mit der AABS, BABS und HP1 interagieren.

Ziel meiner Doktorarbeit ist die Identifikation der Transkriptionsfaktoren, die sich an AABS, BABS und HP1 binden. Damit sollen die Grundlagen für die spezifische Reinigung dieser Proteine und die Klonierung der faktorbindenden Gene geschaffen werden.

Man nimmt an, daß diese Faktoren Produkte von Genen sind, deren Aktivität die zellspezifische Genregulation steuert. Die spätere Analyse der Expression dieser Faktor-Gene soll Aufschluß darüber geben, wie eine leberspezifische Genregulation zustande kommt. Damit wird es möglich sein, eine zentrale entwicklungsbiologische Fragestellung zu beantworten: Wie wird eine gewebespezifische Genexpression im Verlauf der Embryogenese festgelegt?

In meiner Arbeit konzentriere ich mich auf folgende Fragestellungen:

1. Sind die Faktoren, die die AABS, BABS und HP1 erkennen zell-, vielleicht sogar leberspezifisch?
2. Sind diese Regulationsproteine an der Aktivierung von mehr als einem Gen beteiligt?
3. Binden diese drei DNA-Elemente unterschiedliche Faktoren?
4. Worin bestehen diese Unterschiede: posttranslationale Modifikation, Molekulargewicht, chromatographisches Verhalten?

MATERIALIEN UND METHODEN

Materialien

1. Chemikalien, Enzyme, Arbeitsmittel

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien, Lösungsmittel, etc. von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Äthanol	Roth, Karlsruhe
Agarose Typ II	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Amberlite	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Aprotinin	Sigma, München
Benzamidin	Sigma, München
β -Mercaptoäthanol	Roth, Karlsruhe
Biofuge A	Heraeus Christ, Osterode
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia LKB, Freiburg
desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dialyseschläuche	Bender&Hobein, Karlsruhe
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfat	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	Boehringer, Mannheim
Eichproteine für SDS-Gele	Boehringer, Mannheim
Einmal-Filterhalter 0,2 μ m	Schleicher und Schüll, Dassel
E. coli Polymerase I (Klenow)	Biolabs, Schwabach
E. coli tRNA	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, München
FPLC-System	Pharmacia LKB, Freiburg
Ficoll 400	Pharmacia LKB, Freiburg
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Geltrockner	Bio-Rad, München
Gene Assembler	Pharmacia LKB, Freiburg
Glasplatten für Elektrophorese	Renner, Darmstadt
Glycin	Bio-Rad, München
Harnstoff	Bio-Rad, München
Heparin-Sepharose CL-6B	Pharmacia LKB, Freiburg
HEPES	Sigma, München
Lachssperma-DNA Typ III	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Membranfilter 0,22 μ m	Schleicher und Schüll, Dassel
N-acetylglucosamin	Sigma, München
NACS-Prepac-Säulen	BRL Inc., Neu-Isenburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio-Rad, München
Nonidet-P 40	Bio-Rad, München
Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Nylongaze	Nybolt, Zürich
Pepstatin A	Sigma, München
PMSF	Sigma, München
PIPES	Sigma, München
Piperidin	Du Pont de Nemours, Dreieich
poly(dI-dC)	Pharmacia LKB, Freiburg
Quickszint	Zinsser Analytik, Frankfurt
Q-Sepharose FF	Pharmacia LKB, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, Schwalbach
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin, acetyliert	Promega/Atlanta, Heidelberg
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Saccharose, ultrapur	Serva, Heidelberg
Saure Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Sephadex G 50	Pharmacia LKB, Freiburg
Silan GF 31	Wacker-Chemie, München
Spermidin	Fluka, Neu-Ulm
Spermin	Fluka, Neu-Ulm
T4-DNA-Ligase	Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Polynukleotidkinase	Biolabs, Schwalbach
TEMED	Bio-Rad, München
Tris	Sigma, München
UV Lampe, 254 nm	Vetter, Wiesloch
Whatman DEAE-Elutionspapier	Bender&Hobein, Karlsruhe
Whatman 3 MM Papier	Bender&Hobein, Karlsruhe
Whatman GF/C Filter	Bender&Hobein, Karlsruhe
Weizenkeim-Lektin-Agarose	Sigma, München
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

2. Radiochemikalien

γ - ³² P-ATP (370 MBq/ml, >185 GBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α - ³² P-dCTP (370 MBq/ml, ~110 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
¹⁴ C-methylierte Proteine	Amersham-Buchler, Braunschweig

3. Kernextrakte

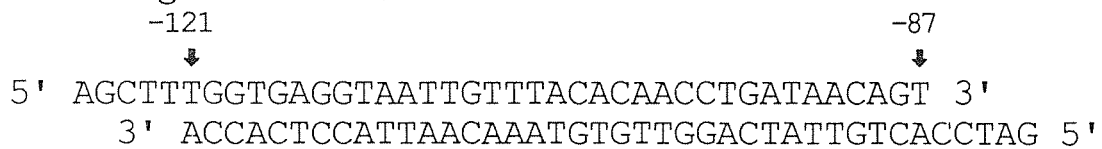
Kernextrakte aus folgenden Zelllinien wurden freundlicherweise von G.U. Ryffel und M. Kaling zur Verfügung gestellt:

C2:	dedifferenzierte Hepatomzelle
FTO-2B:	Hepatomzelle der Ratte
HeLa:	menschliche Zervixkarzinomzelle
Ltk-:	Fibroblastenzelle der Maus
MCF 7:	menschliche Brustkrebszelle

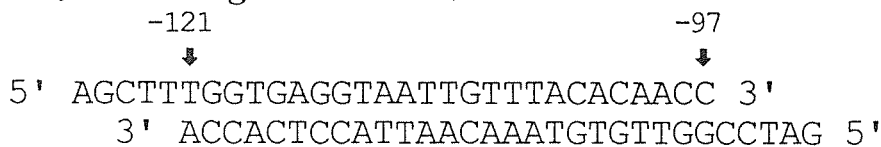
4. Oligonukleotide

Soweit nicht hier aufgeführt, finden sich die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide im Text (Tab. 1, Tab. 2)

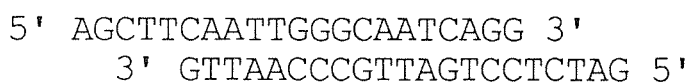
A2: Vitellogenin-A2-Gen, Position -121 bis -87



A2 I/II: Vitellogenin-A2-Gen, Position -121 bis -97



C/EBP: Bindungsstelle für den Faktor C/EBP (nach Ref. 83)



Methoden

Falls nicht anders vermerkt, stammen die Arbeitsprotokolle aus den Methodensammlungen von Maniatis et al. (1982) und Ausubel et al. (1989).

1. Analyse von Nukleinsäuren

1.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wird spektrophotometrisch durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Um einen Hinweis auf Verunreinigungen zu erhalten, wird ein Absorptionsspektrum von 320 nm bis 220 nm aufgenommen. Dabei sollte das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} (hier absorbieren Phenol und EDTA) bei DNA 1,8:1 und bei RNA 2:1 sein.

1.2 Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen nach Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA-Strangenden wird mit H_2O bidest. auf mindestens 100 μl aufgefüllt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform-Gemisches (gesättigt mit 0,5 M Tris-base pH 8,5 und 10 mM EDTA pH 8) wird gründlich gemischt und zur Phasentrennung 2 min abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert.

1.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wird mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und

mit dem 2,5-fachen Volumen Äthanol gemischt. Die Fällung erfolgt entweder über Nacht bei -20°C oder für 30-60 min im Methanol-Trockeneisbad. Das Präzipitat wird für 20 min bei $13000 \times g$ abzentrifugiert, zur Entfernung von Salzresten mit 80% Äthanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend unter Vakuum getrocknet.

1.4 Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit einer Restriktionsendonuklease, 1U, ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die $1 \mu\text{g}$ DNA des Phagen λ in einer Stunde verdaut. In der Regel wird ein 2- bis 3-facher Überschuß an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Für den einzelnen Restriktionsverdau werden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen eingehalten.

1.5 Dephosphorylierung von DNA-Strangenden

Restriktionsverdaute DNA wird mit 24 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm 30 min bei 37°C und 10 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt.

2. DNA-Gelelektrophorese

2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden 0,8% bis 2% Agarose-Gele benutzt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wird bei Gelen bis 1,5% Agarose in 50 ml 1xTAE (40 mM Tris-base, 1 mM EDTA, mit Eisessig eingestellt auf pH 8,2), bei höherprozentigen Gelen in 1xTBE (90 mM Tris-base, 90 mM krist. Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) eingewogen und im Mikrowellenherd aufgekocht. Nach Zugabe von $2 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid (10 mg/ml) wird die Gellösung in eine horizontale Elektrophorese-

kammer (7,5 x 13,5 cm) gegossen und man läßt 30-60 min abkühlen. Nach Eingießen des Laufpuffers (ca. 150 ml 1xTAE bzw. TBE) und Entfernen des Probenkammes werden die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8, 10% Glycerin, 0,1% SDS, 0,02% Bromphenolblau) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt für 1 h bei 100 V. Die DNA-Banden werden anschließend auf einem UV-Lichttisch ($\lambda=302$ nm) sichtbar gemacht.

2.2 Acrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden 4% bis 10% Acrylamidgele benutzt. Für ein 7%iges Gel benötigt man 7 ml einer deionisierten (+ 50 g/l Amberlite; mindestens 3 h rühren, anschließend steril filtrieren) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8), die mit 3 ml 10xTBE und 20 ml Wasser in einer Saugflasche entgast wird. Nach Zufügen und Mischen von 250 μ l 10% APS und 25 μ l TEMED wird das Gel zwischen zwei 14 x 16 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach 30-60 min werden die Gelplatten in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt, mit Laufpuffer (ca. 400 ml 1xTBE) aufgefüllt, der Kamm entfernt und die Probenaschen gut ausgespült. Nach dem Auftragen der Proben in Glycerin-Probenpuffer erfolgt die Auftrennung der Proben für 1 h bei 200 V. Nach Beendigung des Laufes wird das Gel von den Glasplatten entfernt, 15 min mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

2.3 Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele

Erreicht wird die Auftrennung von DNA unter denaturierenden Bedingungen durch die hohe Harnstoffkonzentration (8,3 M) und die hohe Temperatur während der Elektrophorese. Benutzt werden große Glasplatten (19,5 x 38,5 cm) mit 0,1 mm dicken Abstandhaltern. Die beiden Glasplatten müssen verschieden vorbehandelt werden, da diese sehr dünnen Gele an der Glasplatte

haften: Auf die Glasplatte mit Ausschnitt werden 5 ml 5% Dimethyldichlorsilan (gelöst in Tetrachlorkohlenstoff) mit einer Glaspipette gleichmäßig verteilt und man läßt 5 min trocknen. Nach Abspülen mit Äthanol wird gründlich mit Papiertüchern poliert. Die gleiche Behandlung erfährt die ungeschnittene Glasplatte, hier wird allerdings eine Mischung aus 5 ml Haftsilan (300 µl Silan GF 31 gelöst in 100 ml Äthanol) und 150 µl Eisessig gleichmäßig aufgetragen. Nach 5 min Wartezeit werden die Glasplatten mit den Abstandhaltern zusammengebaut; eine Abdichtung ist nicht nötig. Für ein 8%iges Gel werden 30 ml einer 8%igen Acrylamid/Harnstoff-Stammlösung benötigt (252 g Harnstoff, 46,4 g Acrylamid, 1,6 g Bisacrylamid werden mit H₂O bidest. auf 450 ml aufgefüllt und bei 37⁰ C gelöst. Nach Zugabe von 20 g Amberlite wird 30 min gerührt, steril filtriert, mit 60 ml 10xTBE versetzt und mit H₂O bidest. auf 600 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4⁰ C im Dunkeln aufbewahrt). Nach Entgasen und Zufügen von 300 µl 10% APS und 30 µl TEMED wird das Gel gegossen und der Kamm für die Proben taschen eingesetzt.

Nach 60 min ist das Gel polymerisiert, und wird senkrecht in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt sowie zur gleichmäßigen Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Elektrophoresepuffer dienen ca. 600 ml 1xTBE. Der Kamm wird entfernt und die Taschen mit einer Spritze von Harnstoff und Gelresten freigespült. Ein 30 min Vorlauf bei 1200 V führt zur Erwärmung des Gels. Die in Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 8, 99% Formamid, 0,03% Xylencyanol, 0,03% Bromphenolblau) gelösten Proben werden 3 min gekocht und sofort auf Eis gestellt. Nach erneutem Ausspülen der Taschen werden 2 µl der Proben aufgetragen und bis zur gewünschten Laufstrecke bei 1200 V aufgetrennt. Danach wird mit einem dünnen Spatel die Glasplatte mit dem Ausschnitt abgehoben. Das Herauslösen des Harnstoffs erfolgt durch sofortiges Einlegen (10-15 min) in 10% Essigsäure. Nach Spülen unter Wasser wird das Gel für ca. 1 h bei 80⁰ C getrocknet und mit der Glasplatte auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP) mit Verstärkerfolie bei -80⁰ C exponiert.

3. Markierung von DNA mit Radionukleotiden

3.1 Extraktion und Reinigung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotid-Einzelstränge werden auf einem Pharmacia-Gene-Assembler nach der Phosphoramidit-Methode (45) synthetisiert (Reaktionsgröße: 0,2 μmol) und entsprechend den Herstellerangaben aus der Kassette durch 16 h Inkubation bei 50⁰ C mit konz. Ammoniaklösung herausgelöst. Nach Entfernen des Ammoniaks unter Vakuum wird jeder Oligonukleotid-Einzelstrang in 50 μl H₂O bidest. aufgenommen, die Konzentration bestimmt und je 250 μg davon unter Vakuum eingetrocknet. Die Reinigung erfolgt über ein präparatives, denaturierendes 20% Acrylamid/Harnstoff-Gel (beide Gelplatten werden hier mit Dimethyldichlorsilan behandelt, die Abstandhalter sind 1 mm dick, benötigt werden 80 ml Gellösung sowie je 160 μl 25% APS und TEMED). Die Einzelstränge werden dazu in je 60 μl Formamid-Probenpuffer gelöst, 3 min gekocht, sofort auf Eis gestellt und auf drei ca. 2,5 cm breite Taschen verteilt. Die Auftrennung erfolgt für 3-4 h bei 1200 V mit 1xTBE (4 h) als Laufpuffer (135 mM Tris-base, 45 mM krist. Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,9). Nach 15 min Anfärben im Laufpuffer (ca. 600 ml) mit 1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) wird unter UV-Licht diejenige Bande ausgeschnitten, die dem vollständig synthetisierten Produkt entspricht.

Das Acrylamid wird zerkleinert und die Einzelstränge mit je 1 ml H₂O bidest. über Nacht bei 37⁰ C im Schüttler eluiert. Das Eluat wird über Quarzsand filtriert und die Konzentration bestimmt. Gleiche Mengen der komplementären Einzelstränge werden zusammengegeben und mit 4 M Ammoniumacetat (NH₄Ac) auf eine Endkonzentration von 0,25 M eingestellt. Eine NACS-Prepac-Säule wird mit 4 M NH₄Ac gewaschen und mit 0,25 M NH₄Ac äquilibriert. Die Oligonukleotide werden auf die Säule aufgetragen und nach Waschen mit 0,25 M NH₄Ac dreimal mit je 100 μl 4 M NH₄Ac eluiert. Das im Eluat enthaltene NH₄Ac wird in der Vakuumzentrifuge entfernt, wobei es nötig ist, das zähe Pellet immer wieder in H₂O bidest.

aufzunehmen, bis kein weißer Salzbückstand mehr zu sehen ist. Das eingetrocknete Oligonukleotid wird in 100 µl 1/10 TE aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

3.2 Kinasierung von DNA

20 ng Oligonukleotid oder DNA-Fragment werden mit 5 µl γ -³²P-ATP, 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) und 2 µl 10xKinase-Puffer (500 mM Tris-base pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT) in einem Endvolumen von 20 µl versetzt. Die Reaktion bei 37⁰ C wird nach 30 min durch Zugabe von 80 µl Stopplösung (10 mM Tris-base pH 7,5, 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 µg E. coli tRNA) beendet. Eine NACS-Prepac-Säule wird viermal mit je 1 ml 1 M NaCl in TE (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8) gewaschen und dreimal mit je 1 ml 0,1 M NaCl in TE äquilibriert. 100 µl kinasierte Probe werden auf die Säule appliziert und zweimal mit je 100 µl 0,1 M NaCl in TE ohne Druck nachgespült. Anschließend wird fünfmal mit je 1 ml 0,1 M NaCl in TE gewaschen und die markierte Probe dreimal mit je 100 µl 1 M NaCl in TE eluiert. Das Eluat wird mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 50 µg E. coli-tRNA versetzt und mit 2,5 Vol. Äthanol ausgefällt. Im Durchschnitt erhält man 1-2 x 10⁷ cpm. Bei der Berechnung des molaren Überschusses an Kompetitor-oligonukleotid in "Bandshift"-Experimenten (5.1) liegt die Annahme zugrunde, daß die eingesetzten 20 ng Oligonukleotid zu 100% kinasiert werden (gilt auch für 3.3).

3.3 Auffüllen von 5'-Überhängen mit α -³²P-dCTP

20 ng Oligonukleotid werden in einem Endvolumen von 20 µl mit 2 µl 10xPol-I-Puffer (70 mM Tris-base pH 7,5, 70 mM MgCl₂, 500 mM NaCl), 4 µl α -³²P-dCTP, je 2 µl der restlichen 5 mM dNTP-Lösungen und 2 µl E. coli-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) inkubiert. Die Reaktion wird nach 30 min bei Raumtemperatur abgestoppt (s.o. 3.2) und über eine NACS-Prepac-Säule gegeben. Die Ausbeute beträgt 1,5-3,5 x 10⁶ cpm.

3.4 Gelfiltration über Sephadex G50

Das Säulenmaterial Sephadex G50 trennt Moleküle von 500 bis 10000 Dalton auf. Die Gelfiltration wird im Anschluß an die Ligation bei der Präparation einer DNA-Affinitätssäule (6.3) zur Abtrennung freier, nicht eingebauter Nukleotide von dem radioaktiven Ligationsprodukt eingesetzt. Eine kurze Pasteurpipette wird mit Glaswolle abgedichtet, silikonisiert und bis zur oberen Einengung luftblasenfrei mit dem Säulenmaterial (gequollen in TE) gefüllt, das dann mehrmals mit TE gewaschen wird. Nach dem vollständigen Einsinken des Puffers ins Gelbett wird die radioaktive Probe aufgetragen und mit TE nachgespült. Dabei werden je 3 Tropfen (ca. 100 µl) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und nach 12 Fraktionen die Gelfiltration beendet. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wird nach der Cerenkov-Methode gemessen und die 2-3 Fraktionen mit der höchsten Aktivität werden vereinigt.

4. Analyse von Proteinen

4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry et al., 1951)

10 µl Proteinextrakt werden mit 190 µl H₂O bidest. versetzt und mit 1 ml Lösung D [1 ml Lösung A (2% Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH), 0,01 ml Lösung B (2% Natriumtartrat), 0,01 ml Lösung C (1% CuSO₄)] gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 100 µl frisch angesetztes 50% Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz zugegeben, gründlich gemischt und 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 600 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve (aufgestellt mit einer Stammlösung von Rinderserum-Albumin, 1 mg/ml) bestimmt.

4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wird ein 10%iges Trenngel mit einem 5%igen

Kammgel zwischen zwei 14 x 16 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen. Für 20 ml Trenngellösung werden 6,6 ml einer deionisierten Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8) mit 5 ml 1,5 M Tris-base (pH 8,8), 8,2 ml H₂O bidest. und 0,2 ml 10% SDS in einer Saugflasche entgast. Nach Zugabe und Mischen von 40 µl 10% APS und 5 µl TEMED wird das Gel bis zu einer Höhe von 1,5 cm unterhalb des Kamms gegossen. Sofort nach dem Gießen wird es mit 0,1% SDS überschichtet. Das Trenngel ist auspolymerisiert, wenn nach ca. 45 min die Phasengrenze wieder erscheint. Das SDS wird abgegossen und der Plattenzwischenraum nach Spülen mit Wasser mit Filterpapier getrocknet. Für das Kammgel werden 1,7 ml der deionisierten Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8) mit 2,5 ml 0,5 M Tris-base (pH 6,8), 5,7 ml H₂O bidest. und 0,1 ml 10% SDS entgast und mit 50 µl APS und 10 µl TEMED versetzt. Das Kammgel wird auf das Trenngel gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach ca. 45 min werden die Platten senkrecht in eine Elektrophoreseapparatur mit 1xLaemmli-Laufpuffer (25 mM Tris-base pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) eingespannt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Proben werden mit dem gleichen Volumen 2xLaemmli-Probenpuffer (Endkonzentrationen: 0,0625 M Tris-base, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% β-Mercaptoäthanol, 0,001% Bromphenolblau) versetzt, 3 min gekocht und sofort auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen der Proben werden die Geltaschen gründlich mit Puffer ausgespült. Bis zum Eindringen der Proben in das Trenngel werden 25 mA angelegt, danach 35 mA zur Auftrennung bis zum Herauslaufen der Bromphenolblaubande aus dem Gel. Daraufhin wird das Gel von den Glasplatten gelöst, entweder mit Silberionen angefärbt (4.3) oder 10 min in 10% Essigsäure fixiert, auf Whatman-3MM-Papier transferiert, mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf einem Geltrockner getrocknet (ca. 1 h). Anschließend wird es direkt auf einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80⁰ C exponiert.

4.3 Silberfärbung von Proteingelen (Wray et al., 1981)

Alle Arbeitsgänge werden unter leichtem Schütteln ausgeführt, wobei äußerste Sauberkeit unbedingte Voraussetzung ist: Handschuhe sind zu tragen, die Färbeschalen (besser aus Plastik als aus Glas) müssen vorher gründlich gereinigt werden, das Gel ist für jeden neuen Schritt in eine frische, saubere Schale zu transferieren, es empfiehlt sich außerdem die Benutzung von Chemikalien mit mindestens p.a. Qualität (besonders wichtig für das Methanol).

Das Proteingel wird zweimal für je 1 h in 200 ml 50% Methanol fixiert. In der Zwischenzeit wird Lösung A (1,6 g AgNO_3 gelöst in 8 ml H_2O) und Lösung B (42 ml 0,36% NaOH versetzt mit 2,8 ml konz. Ammoniaklösung) vorbereitet. Unmittelbar vor Gebrauch wird die Färbelösung C angesetzt: Lösung A wird unter Rühren tropfenweise in Lösung B gegeben (das Auftreten eines bleibenden braunen Niederschlags aus Ag_2O läßt sich mit wenig konz. Ammoniaklösung wieder auflösen), mit H_2O bidest. auf 200 ml aufgefüllt und das Gel nach dem Fixiervorgang in dieser Lösung für 15 min gefärbt. Das Gel wird danach 10 min in Wasser gewaschen und in Lösung D (2,5 ml 1% Zitronensäure gemischt mit 0,25 ml 38% Formaldehyd, mit H_2O bidest. auf 500 ml aufgefüllt) entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Das Gel wird noch zweimal für je 5 min in Wasser gewaschen und dann darin aufbewahrt.

5. Proteinbindung an DNA, *in vitro*

5.1 "Bandshift"-Analyse (Barberis et al., 1987)

Soweit nicht anders vermerkt, wird das Blwt-Oligonukleotid (Tab. 1) durch Auffüllen mit *E. coli*-Polymerase I (Klenow) und α - ^{32}P -dCTP markiert, alle anderen Oligonukleotide mit γ - ^{32}P -ATP und T4-Polynukleotidkinase kinasiert. 3-5 μg Kernextrakt werden mit einer geeigneten Menge an unspezifischem Kompetitor [poly(dI-dC) oder Ultraschall-behandelte Lachssperma-DNA] in 15 μl Bindungspuffer (10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT,

4% Ficoll 400) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird radioaktiv markiertes Oligonukleotid (10000 cpm) in 5 μ l Bindungspuffer dazugegeben und weitere 15 min inkubiert. In Konkurrenzexperimenten werden die spezifischen Oligonukleotide vor der Zugabe des Extraktes eingesetzt. Bei der Analyse von affinitätsgereinigten Fraktionen werden 50 ng unspezifischer Kompetitor und 0,1 mg/ml Rinderserum-Albumin (acetyliert) verwendet. Die Reaktionsansätze werden dann direkt, ohne Farbmarker, auf ein 14 x 15 cm großes 4% Polyacrylamidgel (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8) in 0,25xTBE aufgetragen. Die Elektrophorese (Laufpuffer: 0,25xTBE) erfolgt für 90 min bei 100 V. Das Gel wird dann in 10% Essigsäure fixiert, auf Whatman-3MM-Papier transferiert, ca. 1 h getrocknet und auf Hyperfilm MP bei -80⁰ C exponiert.

In zwei Experimenten (Abb. 7, Abb. 9a) werden bei sonst gleichen Bedingungen folgende Puffer (nach Singh et al., 143) verwendet: Bindungspuffer (10 mM Tris-base pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% Glycerin), Laufpuffer (6,7 mM Tris-base pH 7,5, 3,3 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA).

5.2 Protein-DNA-Vernetzung mit UV-Licht ("UV cross-link")

"Bandshift"-Reaktionsansätze [9 μ g Protein, 1 μ g poly(dI-dC) für A2- und syn 0-, 0,5 μ g Lachssperma-DNA für Blwt-Oligonukleotid, 10⁴ cpm, in 20 μ l Endvolumen] werden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, als Tropfen auf ein Stück Parafilm pipettiert und für 20 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt (λ = 254 nm; Proben 6 cm von der UV-Quelle entfernt). Nach der Bestrahlung werden die Proben mit dem gleichen Volumen 2xLaemmli-Probenpuffer versetzt, 3 min gekocht und auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie analysiert.

5.3 Behandlung mit saurer Phosphatase (Boxer et al., 1989)

Saure Phosphatase aus Kartoffeln wird als Ammoniumsulfat-Präzipitat geliefert. Ein Aliquot davon wird 10 min in einer Biofuge A im Kühlraum zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und durch das gleiche Volumen 10 mM PIPES pH 7, 50 mM KCl, 5% Glycerin ersetzt, um eine Konzentration von 1 µg/µl zu erhalten. 1 µg des Enzyms werden dann zu 5 µg Kernextrakt und einer geeigneten Menge an unspezifischem Kompetitor in "Bandshift"-Bindungspuffer (5.1) gegeben und für 20 min bei 37^o C inkubiert. An den angegebenen Stellen werden 20 mM Natriummolybdat (Na₂MoO₄) vor Zugabe der Phosphatase eingesetzt. Nach Zufügen des Oligonukleotids (aufgefüllt mit E. coli-Polymerase-I, markiert mit α-³²P-dCTP) wird die Inkubation für weitere 15 min bei Raumtemperatur fortgesetzt und die entstandenen Komplexe werden auf einem 4% Polyacrylamidgel (5.1) aufgetrennt.

5.4 "Methylation interference" Analyse

5.4.1 Präparation der markierten DNA-Fragmente

Um Proteinkontaktstellen auf dem oberen Strang zu bestimmen, werden 50 µg des Deletionklons 39 [B1wt (-95/-37)-TG, (79)] mit HindIII verdaut, das an der Position -95 schneidet. Die verdaute DNA wird mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und mit XhoI, dessen Erkennungsstelle 20 bp unterhalb der Position -37 im Polylinker liegt, nachgeschnitten. Für die entsprechende Analyse auf dem unteren DNA-Strang werden 30 µg des Deletionsklons 29 [B1wt (ca. -120/-37)-TG, (79); der genaue 5'-Endpunkt wurde noch nicht durch Sequenzierung bestimmt] mit EcoRI verdaut, das 26 bp unterhalb der Position -37 im Polylinker schneidet. Die mit alkalischer Phosphatase weiter behandelte DNA wird anschließend mit HindIII nachgeschnitten. Auf einem 1% Agarosegel wird getestet, ob die Proben vollständig verdaut sind.

Die Reaktionsansätze werden auf einem 7% Polyacrylamidgel (oberer Strang) bzw. einem 2% Agarosegel (unterer Strang) aufgetrennt, die gewünschten Fragmente mit 300 µl Elutionspuffer (0,5 M NH₄Ac, 1 mM EDTA) über Nacht im Schüttler bei 37⁰ C eluiert und mit 1 Volumen Isopropanol im Trockeneisbad gefällt. Das Präzipitat wird mit 13000 x g abzentrifugiert, mit 80% Äthanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 50 µl H₂O bidest. aufgenommen.

Je 10 µl der beiden dephosphorylierten DNA-Proben (ca. 50 ng) werden danach mit 5 µl γ-³²P-ATP und T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert (3.2).

5.4.2 Methylierungsreaktion

Je 2,5 µl der am 3'- oder 5'-Ende markierten Restriktionsfragmente (ca. 5x10⁵-10⁶ cpm) werden unter einem Abzug in 200 µl Natriumcacodylatpuffer pH 8,3 mit 1 µl Dimethylsulfat (DMS) versetzt, die Reaktionsgefäße sofort verschlossen und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl DMS-Stop (1,5 M Natriumacetat pH 7, 1 M β-Mercaptoäthanol), 750 µl Äthanol (vorgekühlt auf -20⁰ C) und sofortiges Eintauchen in ein Methanol-Trockeneisbad gestoppt. Die methylierten Fragmente werden durch zwei Fällungen mit Äthanol bei -80⁰ C gewonnen. Um das DMS vollständig zu entfernen, wird nach jeder Fällung zweimal mit 80% Äthanol gewaschen. Das Pellet wird in 50 µl "Bandshift"-Bindungspuffer (5.1) aufgenommen und die Radioaktivität gemessen.

5.4.3 "Bandshift"-Assay und Elution der DNA

Präparative Bindungsreaktionen werden für jeden Strang dreimal mit dem 10-fachen Ansatz einer analytischen Reaktion (30 µg Protein, 500 ng Lachssperma-DNA, 10⁵ cpm, in 40 µl Endvolumen) durchgeführt. Die Reaktionsansätze werden auf einem 4% Polyacrylamidgel aufgetrennt und naß für 2 h bei 4⁰ C auf Hyperfilm-MP exponiert. Die entsprechenden Bereiche des Gels (freie und

komplexierte DNA) werden ausgeschnitten und in ein 0,8% Agarosegel eingebettet. Die DNA wird aus den Gelstückchen durch Elektrophorese (100 V, 3 h, Puffer:1xTAE) auf DEAE-Elutionspapier eluiert.

Die Extraktion aus dem DEAE-Papier erfolgt mittels 500 µl 1,5 M NaCl, gründlichem Mischen und 30 min Inkubation bei 65⁰ C. Die Mischung wird anschließend über Quarzsand filtriert, das Filtrat mit 1 ml Äthanol für 30 min bei -80⁰ C gefällt und das Sediment unter Vakuum getrocknet.

5.4.4 Piperidinspaltung und Auftrennung der Spaltprodukte

Das getrocknete Sediment wird in 100 µl frisch angesetzter Piperidinlösung (1:10) gelöst und 30 min bei 90⁰ C inkubiert. Dabei müssen die Reaktionsgefäße äußerst sorgfältig verschlossen werden (Eppendorfggefäße mit Schraubdeckel), um Piperidinverluste zu vermeiden. Zugleich wird auch ein Aliquot der ursprünglich methylierten DNA (ca.10⁵ cpm) mit Piperidin behandelt, um als Sequenzleiter zu dienen. Das Piperidin wird unter Vakuum entfernt, das Pellet in 30 µl H₂O bidest. aufgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut unter Vakuum getrocknet. Dieser Vorgang wird drei- bis viermal wiederholt, um das Piperidin möglichst vollständig zu entfernen.

Anschließend wird die Radioaktivität der getrockneten Proben nach der Cerenkov-Methode gemessen. Gleiche Mengen an cpm (ca. 3000-6000 cpm) von gebundener und freier DNA sowie einer als Sequenzleiter dienenden G>A-Reaktion (97) werden auf einem 8% denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt (2 h bei 1000 V) und auf Hyperfilm-MP mit Verstärkerfolie bei -80⁰ C exponiert.

6. Proteinreinigung

6.1 Präparation von Rattenleberkernextrakt (nach Gorski et al., 1986)

Alle Arbeitsschritte werden im Kühlraum oder auf Eis ausgeführt und die verwendeten Lösungen, Zentrifugenbecher, Rotoren, Zentrifugen etc. auf 0-4⁰ C vorgekühlt. Unmittelbar vor Gebrauch wird die angegebene Menge an DTT sowie folgende Proteinaseinhibitoren allen Pufferlösungen des Extrakt- und Reinigungsprotokolls zugesetzt: Pepstatin A, Leupeptin (je 1 µg/ml) und Benzamidin, PMSF, (je 0,1 mM). Rattenleberrohextrakt wird von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (ca. 150g) präpariert. Die nachfolgenden Angaben gelten für die Leber eines Männchens (ca. 10-15 g).

Die präparierte Leber wird gut in PBS (137 mM NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,7 mM CaCl₂, 3 mM KCl, 0,6 mM MgCl₂) gewaschen, grob zerkleinert, mit Homogenisationsmedium (10 mM HEPES-KOH pH 7,6, 25 mM KCl, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 1 mM EDTA, 2 M Saccharose ultrapur, 10% Glycerin) auf 30 ml gebracht und im Glas-Teflon-Homogenisator (Fa. B. Braun, Melsungen) homogenisiert (10x, Stellung 950). Die Suspension wird mit Homogenisationsmedium auf 85 ml verdünnt, gemischt und pro Zentrifugenröhrchen 27 ml mit einer Glasspritze auf ein 10 ml-Kissen aus Homogenisationsmedium aufgetragen. Das Gewebehomogenat wird dann für 60 min in einem SW27-Rotor (Beckman) bei 24000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Kernsediment in 20 ml Kernpuffer (10 mM HEPES-KOH pH 7,6, 0,1 M KCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerin, 1 mM DTT) suspendiert und mit einem Douncer 5x homogenisiert. Ein Aliquot dieser Suspension wird 1:100 in 0,5% SDS verdünnt, die Extinktion gemessen (Leerwert 1:100 Verdünnung von Kernpuffer) und die Kernsuspension anschließend mit Kernpuffer auf 10 OD₂₆₀ verdünnt. Dann wird tropfenweise 1/10 Volumen 4 M Ammoniumsulfatlösung (pH 7,9, eingestellt mit NaOH) zugegeben und 30 min leicht gerührt. Das visköse Lysat wird

anschließend für 60 min bei 35000 rpm in einem TI70-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wird sofort (!) vorsichtig in ein Becherglas abgegossen, festes, fein pulverisiertes Ammoniumsulfat portionsweise zugegeben (0,3 g/ml Überstand) und langsam (ca. 30 min) unter Rühren gelöst. Nach einer einstündigen Ruhezeit wird das Präzipitat für 25 min bei 35000 rpm im TI70-Rotor (Beckman) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in Dialysepuffer (Puffer D = 25 mM HEPES-KOH pH 7,6, 40 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerin, 1 mM DTT) aufgenommen (0,1 ml pro 20 OD₂₆₀). Die anschließende Dialyse erfolgt 2x2 h gegen je 250 ml Puffer D. Dazu werden zuvor Dialysmembranen in geeignete Stücke geschnitten, 10 min in 2% Na₂CO₃, 1 mM EDTA gekocht, innen und außen mit H₂O bidest. gewaschen, nochmals 10 min in Wasser gekocht und in 1 mM EDTA bei 4⁰ C aufbewahrt. Das Dialysat wird 5 min bei 10000 x g sedimentiert und der Überstand portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Extrakte für die Proteinreinigung werden nach der Dialyse sofort bei -80⁰ C eingefroren und erst vor der Applikation auf die Säulen filtriert (0,22 µm). Die Proteinkonzentration wird nach der Methode von Lowry et al. bestimmt (4.1). Pro adultem Männchen erhält man durchschnittlich 10 mg Leberkernproteine.

6.2 Präparation von Rattenleberkernextrakt (nach Dignam et al., 1983)

Alle Arbeitsschritte werden bei 0-4⁰ C und mit vorgekühlten Materialien ausgeführt. Die präparierte Leber wird gründlich in PBS gewaschen, grob zerkleinert, mit dem zweifachen Volumen (v/w) Homogenisationsmedium (10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT) versetzt und im Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert. Die Suspension wird durch Nylongaze filtriert und 10 min mit 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet erneut für 20 min mit 20000 x g sedimentiert. Der restliche cytoplasmatische Überstand wird abgegossen, das "Rohkern"-Pellet in Puffer B (20 mM HEPES-KOH

pH 7,9, 25% Glycerin, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) resuspendiert (1 ml pro 1 mg Ausgangsgewebe) und in einem Douncer homogenisiert. Anschließend wird die Suspension 30 min auf Eis gerührt, dann 30 min mit 25000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und gegen 50 Vol. des Dialysepuffers C (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 20% Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) für 5 h dialysiert. Danach wird das Dialysat 20 min mit 25000 x g zentrifugiert und der Überstand in Aliquots in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

6.3 Präparation einer DNA-Affinitätssäule (Kadonaga and Tjian, 1986)

Je 1 mg Oligonukleotid-Einzelstrang wird über ein 20% denaturierendes Polyacrylamidgel gereinigt und die gleiche Menge von jedem Strang (ca. 200 µg) über eine NACS-Prepac-Säule gegeben (s. 3.1). Das getrocknete Pellet wird in 75 µl Kinasepuffer (67 mM Tris-base pH 7,6, 13 mM MgCl₂, 6,7 mM DTT, 1,3 mM Spermidin, 1,3 mM EDTA) aufgenommen und 2 min bei 88⁰ C, 10 min bei 65⁰ C, 10 min bei 37⁰ C und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 15 µl 20 mM ATP, 0,5 µl γ-³²P-ATP und 10 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei 37⁰ C inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 100 µl 5 M NH₄Ac (pH 5,5), 25 µl 100 mM MgCl₂, 25 µl TE-Puffer (10 mM Tris-base pH 7,6, 1 mM EDTA) und anschließend die Mischung für 15 min auf 65⁰ C erhitzt, um die Kinase zu inaktivieren. Die DNA wird mit Äthanol gefällt, resuspendiert in 200 µl TE-Puffer, 25 µl Natriumacetat, 25 µl 100 mM MgCl₂, erneut mit Äthanol gefällt und unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wird in 75 µl Ligationspuffer (88 mM Tris-base pH 7,5, 13,3 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1,3 mM Spermidin) aufgenommen und die Ligation durch Zugabe von 20 µl 20 mM ATP und 10 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) gestartet. Die Mischung wird über Nacht bei 15⁰ C inkubiert. Um zu testen, ob die Ligation erfolgreich verlaufen ist,

und um die Größe der Multimere zu bestimmen, wird je 1 μ l des Reaktionsansatzes (vor und nach der Ligation) auf einem 7,5% Polyacrylamidgel getestet. Daraufhin wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und die nichteingebauten Nukleotide über eine Sephadex-G50-Säule entfernt (3.4). Die vereinigten Fraktionen werden mit Äthanol gefällt, unter Vakuum getrocknet und in 100 μ l H₂O bidest. aufgenommen.

Für eine 1 ml Affinitätssäule werden 0,3 g CNBr-derivatisierte Sepharose CL-4B 15 min in 1 mM HCl gequollen und aktiviert. Daraufhin wird das Säulenmaterial mit je 50 ml 1 mM HCl und 10 mM Kaliumphosphat pH 8 gewaschen. Die Sepharose wird in ein Greiner-Röhrchen (12 ml) transferiert, in 2 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 8 suspendiert und mit der ligierten DNA versetzt. Die Kopplungsreaktion läuft über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend wird das Material auf eine Glasfritte transferiert, mit 100 ml H₂O bidest. und 50 ml 0,2 M Glycin pH 8 gewaschen und in 5 ml 0,2 M Glycin pH 8 resuspendiert. Diese Inaktivierung der nichtreagierten CNBr-derivatisierten Sepharose wird bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 4-6 h ausgeführt. Das auf einer Glasfritte gesammelte Säulenmaterial wird dann nacheinander mit je 50 ml der folgenden Lösungen gewaschen: 10 mM Kaliumphosphat pH 8, 1 M Kaliumphosphat pH 8, 1 M KCl, H₂O bidest. und Aufbewahrungspuffer (10 mM Tris-base pH 7,6, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,02% NaN₃). Die fertige Säule wird daraufhin bei 4⁰ C in Aufbewahrungspuffer gelagert. Nach einem Reinigungslauf wird die Säule mit 10 ml Puffer R (5 mM Tris-base pH 7,6, 2,5 M NaCl, 0,5 mM EDTA) regeneriert.

6.4 Reinigung des Transkriptionsfaktors BAP

Für die Reinigung (durchgeführt auf einer FPLC-Anlage) wird die Leber von 60 Ratten eingesetzt (603 mg in 132 ml). Kernextrakt von 20 Rattenlebern (44 ml), präpariert nach der Methode von Gorski et al. (6.1), wird auf eine selbstgepackte Q-Sepharose-FF-Säule (1,6 x 12 cm) appliziert, äquilibriert mit Dialysepuffer plus 20 mM

Na_2MoO_4 und 0,1% Nonidet P-40 (Puffer D). Die Säule wird mit einem 250 ml linearen Gradienten von 40-500 mM NaCl entwickelt (2 ml/min). 10 ml Fraktionen werden gesammelt und auf BAP-Aktivität durch einen "Bandshift"-Assay getestet. Der Durchfluß, der die BAP-Aktivität enthält, wird portionsweise mit Ammoniumsulfat (0,3 g/ml) gefällt, in Puffer D aufgenommen (38 ml) und gegen Puffer D dialysiert. Aliquots von 19 ml (85 mg) werden auf eine selbstgepackte Heparin-Sepharose-CL-6B-Säule (1,6 x 8 cm), äquilibriert mit Puffer D, aufgetragen. Die Säule wird mit 100 ml Puffer D gewaschen und die Proteine mit einem 200 ml Stufengradienten an NaCl (0,3;0,6;0,9;1,2 M) in Puffer D eluiert (10 ml/h). Die BAP-Aktivitäten, die bei 0,6 M NaCl eluieren, werden vereinigt, gegen Puffer Z (25 mM HEPES-KOH pH 7,8, 0,1 M NaCl, 12,5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 20% Glycerin, 20 mM Na_2MoO_4 , 0,1% Nonidet P-40) dialysiert und auf einer selbstgepackten DNA-Affinitätssäule chromatographiert. Die Säule wird wie beschrieben präpariert (6.3), wobei Multimere einer synthetischen B-Aktivator-Bindungsstelle (B1wt), erzeugt durch Hybridisierung und Ligation der beiden B1wt-Oligonukleotide 5'-AGCTTGGTGACATGCGCCA-3' und 3'-ACCACGTGTACGCGGTCTAG-5', als Ligand eingesetzt werden. Aliquots von Heparin-Sepharose-gereinigtem BAP (20 ml, 39 mg) werden 10 min bei 4⁰ C mit Lachssperma-DNA (5 µg/ml) inkubiert und auf eine 1 ml Affinitätssäule, äquilibriert mit Puffer Z, appliziert. Die Säule wird mit 8 ml desselben Puffers gewaschen und die Proteine stufenweise mit 10 ml Puffer Z eluiert (10 ml/h), der steigende Mengen an NaCl (0,24;0,48;0,72;0,96;1,2 M) enthält. Der Aktivitätspeak wird in einem "Bandshift"-Assay in Fraktionen von 480 mM NaCl nachgewiesen. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt, gegen Puffer Z dialysiert und noch zweimal, wie oben beschrieben, auf derselben Affinitätssäule ohne Zugabe unspezifischer Kompetitor-DNA chromatographiert.

6.5 Reinigung des Transkriptionsfaktors HPF1

Alle verwendeten Puffer enthalten zusätzlich je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A und 0,5 mM PMSF, die kurz vor Gebrauch zugegeben werden. Leberkernextrakt von 30 männlichen Ratten wird nach der Methode von Dignam et al. (6.2) präpariert und vor der Dialyse mit Ammoniumsulfat (0,3 g/ml) gefällt. 120 ml Extrakt (3,5 g) werden auf eine selbstgepackte, mit Dialysepuffer C voräquilibrierte Q-Sepharose-FF-Säule (5 x 5 cm) appliziert. Der Ionenaustauscher wird mit einem 1000 ml linearen Gradienten von 0,1-0,6 M KCl entwickelt (3 ml/min). "Bandshift"-Experimente mit den einzelnen Gradientenfraktionen (je 10 ml) weisen die HPF1-Aktivität in Fraktionen von 0,35-0,45 M KCl nach. Die aktiven Fraktionen (250 ml) werden vereinigt, gegen Puffer C dialysiert und portionsweise (125 ml, 450 mg) auf eine selbstgepackte Heparin-Sepharose-CL-6B-Säule (1,6 x 12 cm), äquilibriert mit Puffer C, aufgetragen. Die Elution erfolgt mit einem 250 ml linearen Gradienten von 0,1-0,6 M KCl (10 ml/h). Die HPF1-Bindungsaktivität befindet sich in Fraktionen zwischen 0,35 und 0,4 M KCl. Diese Fraktionen (45 ml) werden vereinigt, dialysiert gegen Puffer Z und in Aliquots (15 ml, 40 mg) auf einer 1 ml-Affinitätssäule, äquilibriert mit Puffer Z, chromatographiert. Als Ligand dienen multimerisierte Oligonukleotide der HP1-Sequenz (syn0) aus den beiden synthetischen Einzelsträngen 5'-AGCTTGAGGTTAATAATTTTCCA-3' und 3'-ACTCCAATTATTA AAAAGGTCTAG-5'. Die Säule wird mit 10 ml Puffer Z gewaschen und die Proteine mit einem 10 ml linearen Gradienten von 0,1-0,6 M KCl eluiert (10 ml/h). Der Aktivitätspeak wird in Fraktionen (2 ml), von 0,5 M KCl nachgewiesen. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt, gegen Puffer Z dialysiert und noch zweimal auf derselben Affinitätssäule chromatographiert. Nach der dritten Affinitätssäule befindet sich die HPF1-Bindungsaktivität in einer einzigen Fraktion (1 ml). Folgende Mengen an unspezifischem Kompetitor poly(dI-dC) werden zur Vorinkubation (10 min) bei 40°C eingesetzt: 1. Lauf 100 µg, 2. Lauf 50 µg und 3. Lauf 5 µg.

ERGEBNISSE

1. Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die an der Expression der Vitellogeningene beteiligt sind

1.1 Die Faktoren des Vitellogenin-A2-Gens

Die Regulation von Genen erfolgt durch spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotor- und Enhancersequenzen. Mit einem "Bandshift"-Assay (53) läßt sich überprüfen, ob eine solche Interaktion im Falle eines bestimmten Regulationselementes stattfindet. Die Methode beruht darauf, daß Protein-DNA-Komplexe gegenüber einer elektrophoretischen Auftrennung stabil sind und als diskrete Banden langsamer wandern als das unkomplexierte DNA-Fragment. Dabei wird ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid, das die betreffende Regulationssequenz enthält, mit Kernextrakt inkubiert. Beim Arbeiten mit rohem oder teilgereinigtem Extrakt ist es essentiell, zusätzlich nichtmarkierte DNA in den Reaktionsansatz zu geben. Da sich unspezifische Proteine mit geringer Affinität an jede DNA-Sequenz binden können, lassen sie sich durch einen großen Überschuß an Träger-DNA abfangen. Am häufigsten werden poly(dI-dC) oder Lachssperma-DNA als Kompetitor-DNA eingesetzt. Die Identifikation erfolgt elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie (die radioaktiv markierte DNA schwärzt einen aufgelegten Röntgenfilm). Das Auftreten einer oder mehrerer Banden wird als Indiz dafür gewertet, daß der Extrakt ein oder mehrere Proteine enthält, die sich an das eingesetzte DNA-Fragment binden.

1.1.1 Die AABS wird von mehreren Transkriptionsfaktoren erkannt

Um herauszufinden, ob es zu einer Bindung von Proteinen an die AABS (Abb. 1a) kommt, wird ein "Bandshift"-Assay eingesetzt.

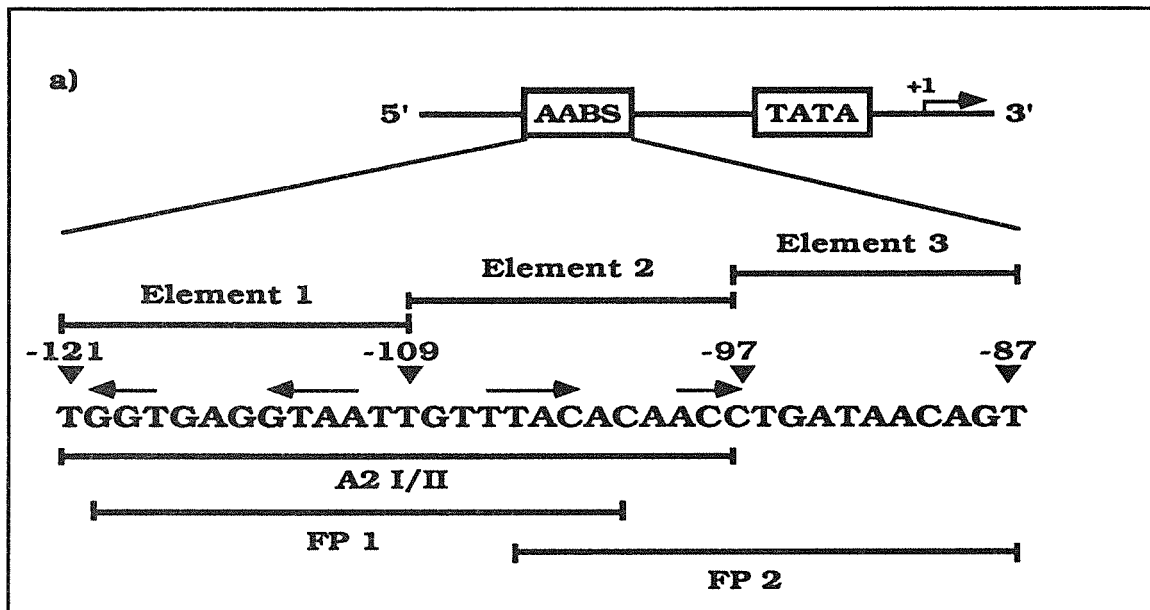


Abb. 1: Die A-Aktivator-Bindungsstelle (AABS) wird von mehreren DNA-bindenden Proteinen erkannt.

a) Sequenz und relative Position zur Transkriptionsstartstelle der AABS und TATA-Box im *Xenopus*-Vitellogenin-A2-Gen (42). Die einzelnen Subelemente sind durch Querbalken oberhalb der Sequenz markiert, ebenso die Position des unvollständigen Palindroms (Pfeile). Darunter ist die Größe der einzelnen Kompetitor-Oligonukleotide angegeben (Querbalken): A2I/II (Elemente 1 und 2), FP1 und FP2 ("Footprint"-Oligonukleotid 1 bzw. 2).

Abb. 1b zeigt eine solche Bindungsstudie mit Kernextrakt aus Rattenleber und radioaktiv markiertem A2-Oligonukleotid, das die Sequenz von Position -121 bis -87 des *Xenopus*-Vitellogenin-A2-Gens (Abb. 1a) enthält, wobei mindestens sechs DNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher Mobilität zu sehen sind (Bahn 1). Zu einer spezifischen Komplexbildung kommt es in den Banden II und IV, da die Bindungsaktivität auch noch bei 1 µg an unspezifischer Kompetitor-DNA zu erkennen ist (vgl. Bahn 3 mit 1). Am wenigsten beeinflusst werden die Wechselwirkungen in den Komplexen I und III, da sie in Reaktionen mit bis zu 2 µg poly(dI-dC) aufrechterhalten bleiben (vgl. Bahn 4 mit 1). Die Bindung der Proteine an die DNA in den Komplexen I bis IV läßt sich durch einen 50-fachen molaren Überschuß an nichtmarkiertem A2-Oligonukleotid effizient kompetieren (vgl. Bahn 7 mit 5). Das bedeutet: Wird als Kompetitor das homologe Oligonukleotid benutzt, so konkurrieren beide um den Transkriptionsfaktor. In diesem Fall binden sich weitaus weniger

Proteinmoleküle an das radioaktiv markierte Oligonukleotid, eine reduzierte Schwärzung auf dem Röntgenfilm ist die Folge. Die Spezifität der Bindung in den Komplexen I bis IV ergibt sich durch Zugabe eines heterologen Oligonukleotids, B1wt (s. unten), als Kompetitor, das auf die DNA-Protein-Interaktion keinen Einfluß hat (vgl. Bahn 13 mit 5; Abb. 2b, Abb. 8). Nicht gekennzeichnet sind die Banden, die zwischen den Komplexen III und IV sichtbar sind. Ihre Bindungsaktivität wird sowohl in Gegenwart geringer Mengen poly(dI-dC) stark abgeschwächt (vgl. Bahn 2 mit 1) als auch von der heterologen Probe gut kompetiert (vgl. Bahn 13 mit 1), sie zeigen also eine unspezifische Wechselwirkung. Auch die unter Komplex I liegende Bande scheint eine spezifische Wechselwirkung zu verkörpern, jedoch lassen mehrere andere, hier nicht gezeigte Ergebnisse (ihr ungewöhnliches Laufverhalten; die Bande ist in mehreren Experimenten nicht konsistent zu sehen, ebenso die Kompetierbarkeit) darauf schließen, daß es sich um eine unspezifische Interaktion handelt. Die Eigenschaften des daran beteiligten Proteins werden nicht weiter untersucht.

Um einem der Proteine, die an der Bildung der Komplexe I-IV beteiligt sind, einen bestimmten Bindungsbereich innerhalb der AABS zuordnen zu können, werden in weiteren Kompetitions-experimenten Oligonukleotide eingesetzt, die Bereichen der AABS entsprechen, die wichtig für deren Funktion und Bindung sind (Abb. 1a). Dazu gehören das Oligonukleotid A2 I/II [von Position -121 bis -97; die Kombination der Elemente 1 und 2 hat bei in-vitro-Transkriptionsexperimenten eine ähnlich hohe Aktivität wie die gesamte AABS (42)], sowie FP1 [von Position -120 bis -101] und FP2 [von Position -105 bis -87]. Die beiden letztgenannten entsprechen DNA-Bereichen der AABS, die durch Proteinbindung vor DNase I-Verdau geschützt sind ["Footprint"-Experimente (51) von M. Kaling, pers. Mitteilung]. Abb. 1b zeigt für die Oligonukleotide A2 I/II und FP1 effiziente Konkurrenz um Bindung in den Komplexen I, II und IV, sowie abgeschwächtes Kompetieren in Komplex III (vgl. die Bahnen 10 und 11 mit 5). Dagegen kompetiert Oligonukleotid FP2 die Proteinbindung nur in Komplex I (vgl. Bahn 12 mit 5).

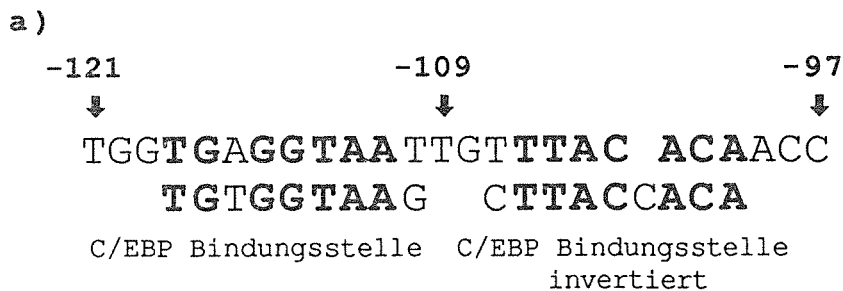
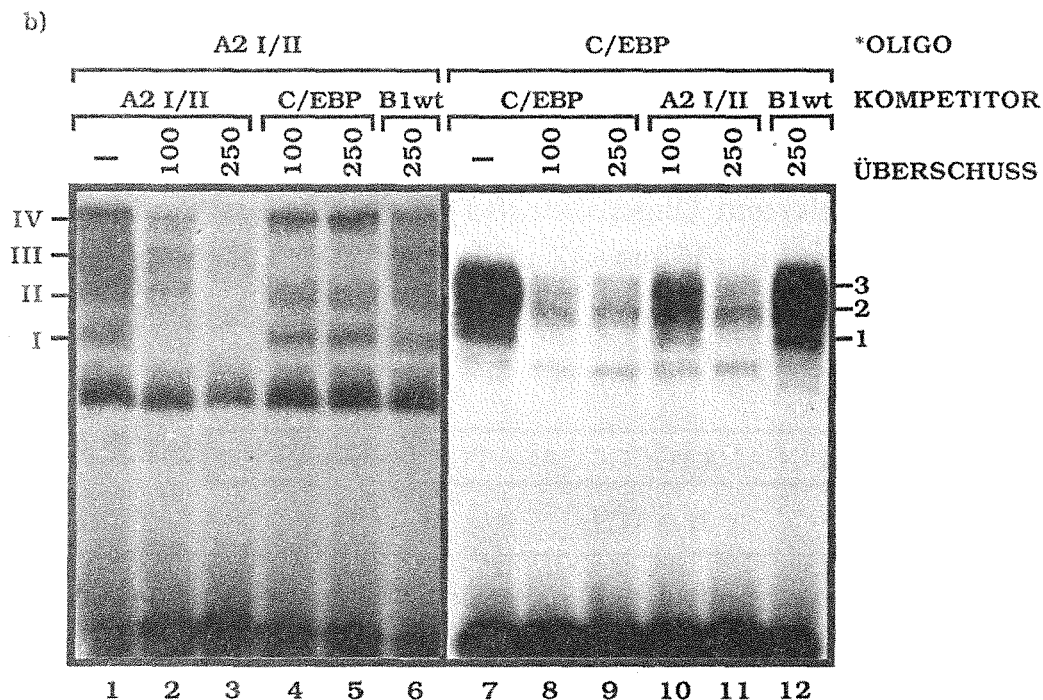


Abb. 2: C/EBP erkennt die AABS.

a) Aufgeführt ist die Sequenz der Elemente 1 und 2 des Vitellogenin-A2-Gens von Position -121 bis -97 (A2 I/II), darunter die Sequenz des zentralen Bereichs einer C/EBP-Bindungsstelle (72). Identische Nukleotide sind fett gedruckt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese werden "Bandshift"-Kompetitionsexperimente durchgeführt mit radioaktiv markiertem A2-Oligonukleotid A2 I/II (von Position -121 bis -97; es enthält den Bindungsbereich der AAP I-IV; Abb. 2b, Bahn 1-6) und einem C/EBP-Oligonukleotid mit einer C/EBP Bindungsstelle (Abb. 2b, Bahn 7-12; Sequenz in Materialien&Methoden). Dieses C/EBP-Oligonukleotid hat mit der AABS-Sequenz keine Ähnlichkeit. Die Gruppe von McKnight verwendete es als markierte Probe, um in einer "Southwestern"-Analyse das gelelektrophoretisch aufgetrennte C/EBP-Polypeptid zu detektieren (83). Durch dieses Oligonukleotid wird ausgeschlossen, daß sich Proteine, die die AABS erkennen, an ein C/EBP-Oligonukleotid, wie in Abb. 2a gezeigt, nur auf Grund der Sequenzhomologie binden. Abb. 2b veranschaulicht, daß mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid A2I/II, das die Elemente 1 und 2 enthält, vier Komplexe gebildet werden (s. Bahn 1). Dabei ist das Bandenmuster nicht so klar ausgeprägt wie bei der Verwendung der kompletten AABS (von Position -121 bis -87, Abb. 1a). Eine schwache oder diffuse Ausbildung der Komplexe I bis IV tritt häufig dann auf, wenn das A2-Oligonukleotid nur die Sequenz von -121 bis -97 (Abb. 1a) enthält. Erwartungsgemäß ist die homologe Probe in der Lage, die Bindung in den Komplexen I-IV effizient zu kompetieren (vgl. Bahn 3 mit 1). Der Einsatz eines 100-fachen molaren Überschusses an nichtmarkiertem C/EBP-Oligonukleotid beeinflußt nur die Interaktion, die zur Bildung von Komplex III führt (vgl. Bahn 4 mit 1). Die Spezifität der Bindung zeigt sich durch Verwendung eines

heterologen Oligonukleotids, das auf die Bindungsaktivitäten keinen Einfluß hat (vgl. Bahn 6 mit 1).



b) Rattenleberkernextrakt wurde mit markiertem A2 I/II- und C/EBP-Oligonukleotid in Anwesenheit von 0,5 µg poly(dI-dC) inkubiert (Bahn 1-6 bzw. 7-12). Die Bahnen 2 bis 6 und 8 bis 12 enthielten zusätzlich den angegebenen molaren Überschuß folgender nichtmarkierter Oligonukleotide als Kompetitor: A2 I/II (von Position -121 bis -97), C/EBP (Sequenz Materialien&Methoden) und B1wt (von Position -55 bis 37, Abb. 3a). Markiert ist die Position der spezifischen Komplexe (I bis IV und 1 bis 3).

Radioaktiv markiertes C/EBP-Oligonukleotid kann ebenfalls Proteine aus Rattenleberkernextrakt binden und bildet die Komplexe 1 bis 3 (s. Bahn 7), die durch einen Überschuß an nichtmarkiertem homologen Oligonukleotid kompetierbar sind (vgl. Bahn 9 mit 7). Alle drei Komplexe lassen sich auch durch einen 250-fachen molaren Überschuß an nichtmarkiertem A2 I/II-Oligonukleotid stark abschwächen (vgl. Bahn 11 mit 7), nicht dagegen durch ein heterologes Oligonukleotid (vgl. Bahn 12 mit 7). Es handelt sich also auch hier um eine spezifische Interaktion.

Diese Experimente zeigen, daß sich der Transkriptionsfaktor C/EBP aus Rattenleberkernextrakt an die AABS bindet und an der Bildung von Komplex III beteiligt ist.

1.2 Die Faktoren des Vitellogenin-B1-Gens

1.2.1 BABS wird von zwei DNA-bindenden Proteinen erkannt

Zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch mit der BABS (Abb. 3a) interagieren, wird Rattenleberkernextrakt mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid B1wt, das die Vitellogenin-B1-Sequenz von Position -55 bis -37 und damit BABS enthält, inkubiert.

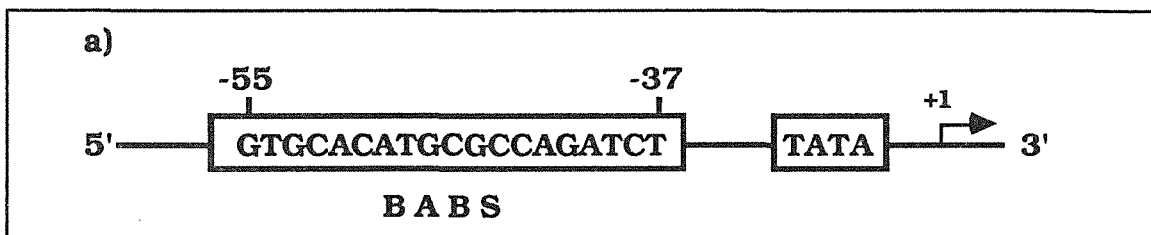
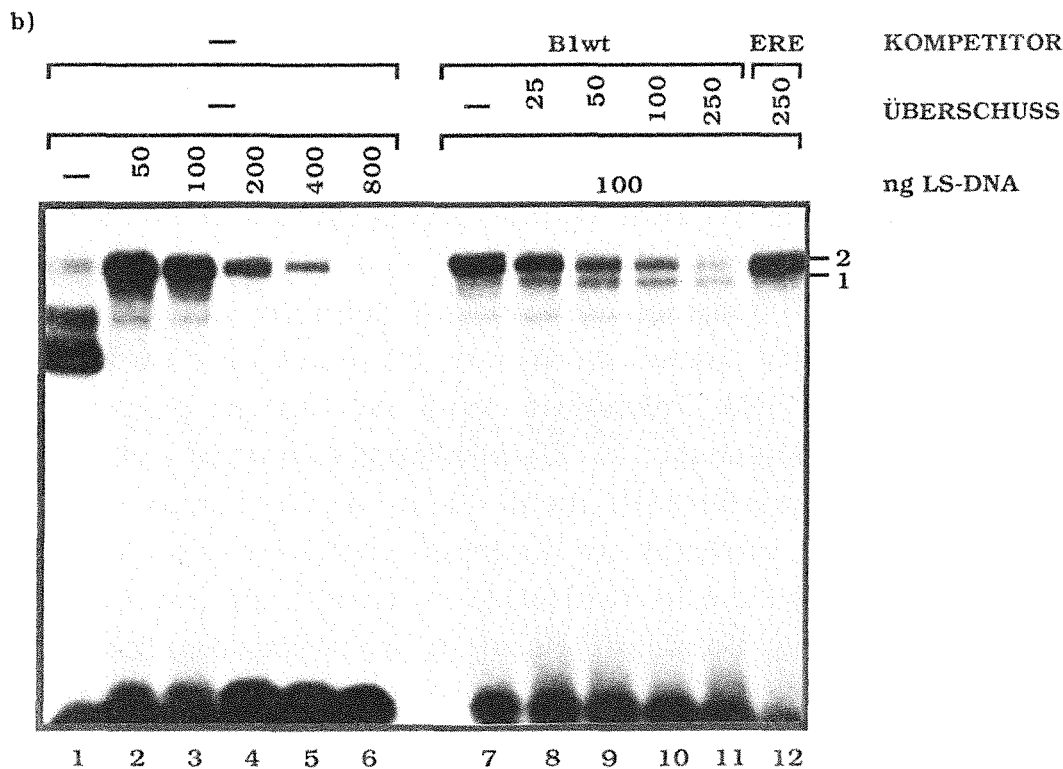


Abb. 3: Zwei Proteine erkennen die B-Aktivator-Bindungsstelle (BABS).
a) Sequenz und Position der BABS und TATA-Box im *Xenopus*-Vitellogenin-B1-Gen (161) relativ zur Transkriptionsstartstelle.

Aus Abb. 3b geht hervor, daß es zur Bildung von mehreren Komplexen unterschiedlicher Mobilität kommt (Bahn 1). Die Komplexe 1 und 2 sind spezifisch, weil die Bindung auch noch bei höheren Mengen an unspezifischer Kompetitor-DNA (400 ng bei Komplex 2, 100 ng bei Komplex 1) erhalten bleibt (vgl. Bahn 3 und 5 mit 1). Unspezifisch sind dagegen die Interaktionen, die unterhalb von Komplex 1 sichtbar sind, da sie bereits durch 50 ng Lachssperma-DNA stark abgeschwächt sind (vgl. Bahn 2 mit 1). Die Spezifität der Bindung wird durch Konkurrenzexperimente mit 100 ng Lachssperma-DNA und nichtmarkiertem homologen und heterologen Oligonukleotid überprüft (Bahn 7-12). In den beiden Komplexen 1 und 2 läßt sich durch einen Überschuß an nichtmarkiertem BABS-Oligonukleotid um Bindung kompetieren (vgl. Bahn 8-11 mit 7), während der Einsatz des nichtverwandten ERE- (auf Östrogen reagierendes Element)-Oligonukleotids (77) als Kompetitor die DNA-Protein-Interaktion nicht beeinflusst (vgl. Bahn 12 mit 7).



b) "Bandshift"-Analyse mit Rattenleberkernproteinen und radioaktiv markiertem B1wt-Oligonukleotid, das die BABS-Sequenz enthält (Bahn 1 -12). Die Bahnen 2 bis 6 enthielten ferner die angegebene Menge (50 bis 800 ng) an Lachssperma-DNA (LS-DNA). Die Bahnen 7 bis 12 zeigen die Komplexbildung in Anwesenheit von 100 ng LS-DNA und dem angegebenen molaren Überschuß an homologem- (B1wt) und heterologem Oligonukleotid (ERE) als Kompetitor. Die Position der spezifischen Komplexe 1 und 2 ist gekennzeichnet.

Diese Experimente weisen nach, daß sich mit markiertem B1wt-Oligonukleotid und Proteinen aus Rattenleberkernextrakt zwei spezifische Komplexe bilden.

1.2.2 Je drei Guaninnukleotide interferieren auf dem oberen und unteren DNA-Strang der BABS mit der Proteinbindung

Durch *in vitro* Transkriptionsexperimente (79) und Bindungsstudien (Abb. 3b) ist es möglich, die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit dem DNA-Element BABS nachzuweisen. Um diese Bindungsstelle genauer zu charakterisieren, wird die "Methylation interference"-Analyse eingesetzt. Sie liefert Informationen über die Kontaktstellen von Protein mit der DNA

dadurch, daß chemisch modifizierte Guaninreste mit der Proteinbindung interferieren (97).

Um solche modifizierten Nukleotide an beiden DNA-Strängen zu identifizieren, werden in zwei Versuchsansätzen der obere bzw. der untere Strang an jeweils einem ihrer Enden mit dem radioaktiven Phosphor-Isotop ^{32}P markiert und anschließend die Guaninreste mit Dimethylsulfat (DMS) partiell methyliert. Proteinextrakt wird mit der so behandelten DNA inkubiert und in einem präparativen "Bandshift"-Reaktionsansatz (s. Materialien&Methoden) aufgetrennt. Da methylierte Guaninreste nicht mehr in der Lage sind, als Kontaktstellen für Proteine zu fungieren, befinden sich die DNA-Fragmente, die modifizierte Nukleotide innerhalb der Bindungsstelle enthalten, bei einem "Bandshift"-Assay in der nichtgebundenen DNA-Fraktion. Nach der Elution von freier und komplexierter DNA-Fraktion aus dem Gel läßt man Piperidin einwirken, das an den Stellen der Basenmodifizierung das Phosphatrückgrat zerbricht. So entsteht eine Reihe markierter Fragmente, deren Länge vom Abstand der zerstörten Base zum markierten Ende des Moleküls abhängt. Das erhaltene Fragmentgemisch wird gelelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Beim Vergleich des Bandenmusters auf dem Autoradiogramm muß in der Bahn mit proteingebundener DNA jene Bande fehlen oder nur sehr schwach ausgeprägt sein, die den an dieser Stelle methylierten Guaninen der Bindungsstelle entspricht, während sie in der Bahn mit freier DNA noch vorhanden ist. Zur genauen Identifizierung der Lage der einzelnen Banden trägt man auf dem gleichen Gel eine G>A-Reaktion als Sequenzleiter des verwendeten DNA-Fragments (97) auf.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis einer solchen Analyse mit zwei verschiedenen langen DNA-Fragmenten, dem oberen und unteren Strang der BABS (s. Materialien&Methoden). Ein Vergleich von freier und gebundener DNA ergibt, daß auf dem oberen und unteren Strang je drei Nukleotide stark (●) und je ein Nukleotid schwach (○) mit der Proteinbindung interferieren (vgl. Bahn 4 mit 5 und 2 mit 3). Dabei wird auf beiden Strängen je ein Nukleotid außerhalb der BABS (Position -74 und -63) von Protein erkannt. Die Ursache liegt darin,

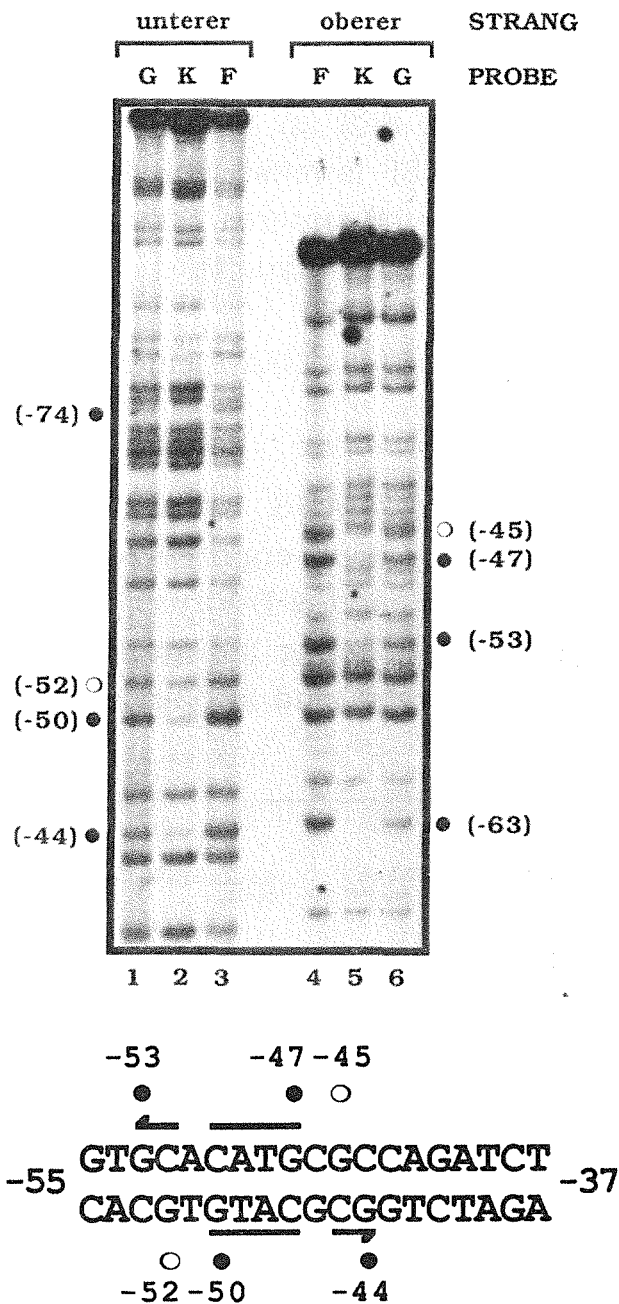


Abb. 4: "Methylation interference"-Analyse. Präparative Bindungsreaktionen wurden mit partiell methylierten DNA-Fragmenten, dem unteren und oberen Strang der BABS, wie in Materialien&Methoden beschrieben, durchgeführt. Nach Elution und Behandlung mit Piperidin wurden gleiche Mengen an cpm (gemessen nach der Cerenkov-Methode) der einzelnen Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Bahnen 2 und 5 enthielten DNA, gewonnen aus den komplexierten Fraktionen (K), die Bahnen 3 und 4 DNA aus den freien Fraktionen (F). Die G>A-Sequenzleiter (G) wurde in den Bahnen 1 und 6 aufgetragen. Markiert sind die Nukleotide, die stark (●) bzw. schwach (○) mit Protein aus affinitätsgereinigtem Rattenleberkernextrakt (1 Passage) interferieren. Das Ergebnis der Analyse ist unter dem gezeigten Gel zusammengefaßt. Pfeile bezeichnen das unvollständige Palindrom.

daß bei der Analyse kein hochgereinigtes Protein eingesetzt wurde. Diese Proteine werden nicht weiter analysiert.

Aus diesen Daten folgt, daß im Bereich von -55 bis -37 des Vitellogenin-B1-Gens (BABS) jeweils drei Guaninreste auf dem oberen (Pos. -53, -47, -45) und unteren Strang (Pos. -52, -50, -44) durch Protein kontaktiert werden (Abb. 4).

1.2.3 Mehrere Gene enthalten ein DNA-Element mit Ähnlichkeit zur BABS

Ein Vergleich der BABS mit bekannten DNA-Regulationselementen (73, 166) ergibt Ähnlichkeiten zu einer Sequenz im Enhancer des Hepatitis-B-Virus (HBV, 6, 141) und zur USF/MLTF-Bindungsstelle im "major late promoter" des Adenovirus (19, 132). Die beiden Sequenzen sind im Vergleich zur BABS in Tab. 1 aufgeführt.

Vitellogenin B1 Genpromotor (Blwt)	<p style="text-align: center;">-53 -44</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p style="text-align: center;"><u>AGCTTGTGCACATGCGCCAGATC</u></p> <p style="text-align: center;">HindIII Bgl II</p>
Hepatitis B Virus Enhancer (HBV)	<p style="text-align: center;">1240 1249</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p style="text-align: center;"><u>AGCTTGC[•]GCATGC[•]GTAGATC</u></p> <p style="text-align: center;">HindIII Bgl II</p>
"adeno major late promoter" (USF)	<p style="text-align: center;">-61 -52</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p style="text-align: center;"><u>AGCTTGGGCCACGTGACC^{••}GCTAGAGGATC</u></p> <p style="text-align: center;">HindIII Bam HI</p>

Tab. 1: Nukleotidsequenz der zur BABS ähnlichen DNA-Elemente. Angegeben sind die Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide, wie sie im "Bandshift"-Assay eingesetzt wurden sowie die zur Klonierung benutzten Restriktionsschnittstellen und die Position im Promotor oder Enhancer. Sie sind so angeordnet, um maximale Homologie zu der 10bp-Sequenz (von Position -53 bis -44 im Blwt-Oligonukleotid) zu erzielen (fettgedruckt), die in in-vitro-Transkriptionsexperimenten noch funktionell ist (42). Punkte bezeichnen von der Blwt-Sequenz abweichende Nukleotide. Die Sequenzen für Blwt, HBV und USF stammen aus den Ref. 161, 6, 27.

Zur Klärung der Frage, ob diese ähnlichen DNA-Sequenzen identische Regulationselemente darstellen, werden die entsprechenden Oligonukleotide, aufgelistet in Tab. 1, synthetisiert und getestet, ob sich Proteine aus Rattenleberkernextrakt daran binden. Abb. 5 zeigt einen "Bandshift"-Assay mit Blwt als ³²P-

markiertem Oligonukleotid, das die BABS-Sequenz enthält. Die Analyse bringt als Ergebnis zwei spezifische DNA-Protein-Komplexe, 1 und 2 (Bahn 1; vgl. Bahn 3 mit 1, s. Abb. 3b). Um zu überprüfen, ob die Sequenz im HBV-Enhancer und im "adeno major late promoter" zu BABS verwandt ist, werden die entsprechenden nichtmarkierten Oligonukleotide als Kompetitor im "Bandshift"-Assay eingesetzt. Abb. 5 macht deutlich, daß das HBV-Element selektiv um Bindung in Komplex 2 kompetiert (vgl. Bahn 5 mit 1), das USF/MLTF-Oligonukleotid beeinflusst selektiv Komplex 1, nicht dagegen die Intensität von Komplex 2 (vgl. Bahn 7 mit 1).

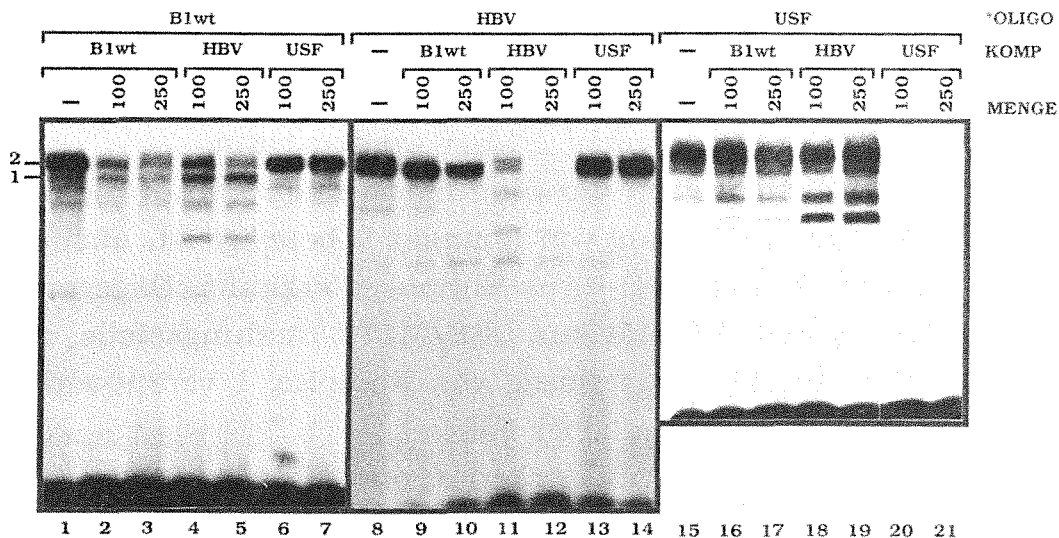


Abb. 5: Bindungseigenschaften von BABS verwandten Sequenzen.

Kernproteine aus Rattenleber wurden mit ^{32}P -markiertem Blwt-Oligonukleotid inkubiert und auf einem 4% Polyacrylamidgel aufgetrennt (Bahn 1-7). Die Bahnen 2 bis 7 enthielten zusätzlich den angegebenen molaren Überschuß an nichtmarkiertem Kompetitor-Oligonukleotid (KOMP). Gezeigt sind ferner zwei entsprechende Versuchsansätze mit markiertem HBV- (Bahn 8-14) und USF-Oligonukleotid (Bahn 15-21). Die retardierten Komplexe 1 und 2 wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

In einem zweiten und dritten Versuchsansatz wird dieses Experiment wiederholt, allerdings mit dem HBV- bzw. dem USF/MLTF-Oligonukleotid als radioaktiv markierter Probe. Bestätigt sich der Befund der ersten Analyse, erwartet man folgendes Resultat: Konkurrenz um Bindung durch nichtmarkiertes Blwt-Oligonukleotid im Fall der markierten HBV-Probe, keine oder nur eine sehr schwach ausgeprägte Beeinflussung der Komplexbildung

mit radioaktiv markiertem USF/MLTF-Oligonukleotid. Die Ergebnisse in Abb. 5 bestätigen diese Annahme: Die mit den beiden radioaktiven Oligonukleotiden gebildeten Komplexe werden effizient durch die homologe Probe kompetiert (vgl. Bahn 12 mit 8 und 20 mit 15). Nichtmarkiertes Blwt-Oligonukleotid kompetiert mit der radioaktiven HBV-Probe selektiv um Bindung in Komplex 2 (vgl. Bahn 9 und 10 mit 8), nur bei größeren Mengen auch etwas in Komplex 1 (vgl. Bahn 10 mit 8). Das USF/MLTF-Oligonukleotid übt keinen Einfluß aus (vgl. Bahn 14 mit 8). Dagegen läßt sich in den mit markiertem USF/MLTF-Oligonukleotid gebildeten Komplexen nicht durch das Blwt-Oligonukleotid um Bindung kompetieren (vgl. Bahn 17 mit 15). Identisches Verhalten zeigt das HBV-Oligonukleotid (vgl. Bahn 19 mit 15), wobei noch zusätzlich zwei schwächere Banden zu sehen sind, deren Auftreten nicht erklärt werden kann.

Zusammenfassend weisen die Bindungsstudien darauf hin, daß der Faktor, der an der Bildung von Komplex 2 beteiligt ist, auch das Element aus dem Hepatitis-B-Virus-Enhancer erkennt. Dagegen ist ein Protein mit hoher Affinität zur USF/MLTF-Bindungsstelle, aber auch zur BABS, für die Entstehung von Komplex 1 verantwortlich (USF/MLTF oder ein sehr ähnlicher Faktor).

Das Protein, welches BABS erkennt und für die Bildung von Komplex 2 verantwortlich ist, wird als BAP für B-Aktivator-Protein bezeichnet.

2. Mehrere leberspezifisch exprimierte Gene enthalten das Promotorelement HP1, das vom gleichen Transkriptionsfaktor erkannt wird

Neben den Vitellogeninen sind auch die Albumingene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* ein Beispiel für leberspezifisch exprimierte Gene, deren 5'-flankierende Regionen bereits charakterisiert wurden (136, 137).

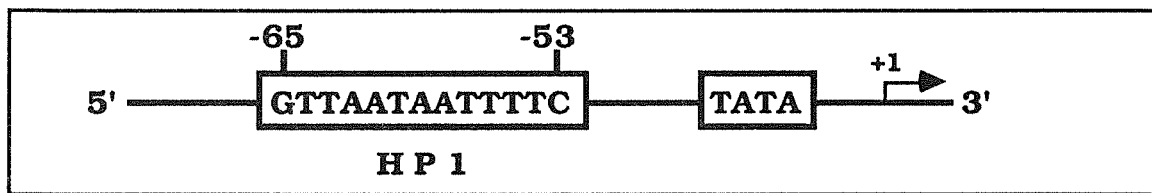


Abb. 6: Sequenz und relative Position zur Transkriptionsstartstelle des hepatozyten-spezifischen-Promotorelements HP1 und der TATA-Box im Xenopus-68kDa-Albumingen (136, 137).

Das identifizierte Regulationselement HP1 (Abb. 6) stammt aus einem Froschgen und ist in Säugerzellen funktionell (137). Das deutet darauf hin, daß es im Verlauf der Evolution konserviert worden ist. Die Beobachtungen, daß HP1-ähnliche Sequenzen in entsprechenden Promotorregionen von Albumin- und α -Fötoprotein-Genen verschiedener Säuger vorkommen (137), z.B. der Maus (Tab. 2, Alb, AFP), unterstützen diese Interpretation. Auch Experimente anderer Gruppen legen den Schluß nahe, daß HP1-ähnliche Elemente in anderen leberspezifisch exprimierten Genen zu finden sind. So konnte gezeigt werden, daß ein Protein, HNF1, mit einer Sequenz interagiert, die große Ähnlichkeit mit HP1 hat und für optimale Promotorfunktion des β -Fibrinogen- und α_1 -Antitrypsin-Genes notwendig ist (36). Die Analyse des menschlichen Transferrin-Genes identifizierte ebenfalls ein Element mit Ähnlichkeit zu HP1 (M. Zakin, pers. Mitteilung; die Sequenz findet sich in Ref. 91). Die in ihrer Sequenz ähnlichen Elemente sind in Tab. 2 aufgelistet.

Um herauszufinden, ob die HP1-ähnlichen Elemente in den verschiedenen Genen miteinander verwandt sind, werden die entsprechenden Oligonukleotide, aufgeführt in Tab. 2, synthetisiert und ihre Bindungseigenschaften für Proteine aus Rattenleberkernextrakt verglichen. Abb. 7 beweist, daß sich ein Protein an die HP1-Sequenz (syn 0) bindet (Bahn 1). Im mit syn 0 gebildeten Komplex läßt sich durch die homologe Probe sowie durch nichtmarkiertes α_1 -Antitrypsin-, β -Fibrinogen-, Albumin- und α -Fötoprotein-Oligonukleotid um Bindung kompetieren (vgl. die Bahnen 2, 3, 4 und 6, 7 mit 1). Keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß auf die Bindungsaktivität haben das Transferrin-Oligonukleotid sowie die eingesetzte α_1 -Antitrypsinmutante (pml in Ref. 39), bei der fünf

Nukleotide der Wildtypsequenz ersetzt sind (Tab. 2). Diese Mutation zerstört ein proximales Promotorelement, das Ähnlichkeit zu HP1 aufweist (39).

Das Protein, welches an der Komplexbildung mit dem syn 0-Oligonukleotid beteiligt ist, erhält den Namen hepatozyten-spezifischer Promotorfaktor 1, HPF1 (s. unten).

	-65	-53
	↓	↓
syn 0	AGCTTGAGGTTAATAATTTCCAGATC	
	HindIII	Bgl II
	-75	-63
	↓	↓
AT	AGCTTTTGGTTAATATTCACCAAGATC	
	-75	-63
	↓	↓
ATmt	AGCTTGATATCAATATTCACCAAGATC	
	-95	-83
	↓	↓
FB	AGCTTGCTGTCAAATATTAAC TAGATC	
	-67	-55
	↓	↓
TF	AGCTTGGAGGTCAAAGATTGCGAGATC	
	-64	-52
	↓	↓
Alb	AGCTTGTGGTTAATGATCTACAAGATC	
	-62	-50
	↓	↓
AFP	AGCTTGAGGTTACTAGTTAACAAGATC	

Tab. 2: Sequenzen HP1-ähnlicher Promotorelemente.

Oben ist das HP1-Element des Xenopus-Albumin-Gens angegeben, wie es in dem synthetischen Oligonukleotid syn 0 vorkommt. Die fettgedruckte Sequenz entspricht dem definierten funktionellen Element (137). Darunter sind die Oligonukleotide aufgeführt, die regulatorischen Elementen entsprechen, wie sie in den Promotoren folgender Gene vorkommen: α_1 -Antitrypsin (AT) und α_1 -Antitrypsin-Mutante (ATmt) des Menschen, β -Fibrinogen der Ratte (FB), menschliches Transferrin (TF), Albumin (Alb) und alpha-Fötoprotein (AFP) der Maus (39, 36, 91, 137). Die einzelnen Sequenzen sind so angeordnet, um maximale Homologie zum HP1-Element in syn 0 zu erzielen. Gekennzeichnet sind die Positionen der DNA-Elemente relativ zur Transkriptionsstartstelle und die zur Klonierung benutzten Restriktionsschnittstellen. Punkte markieren von der funktionellen HP1-Sequenz abweichende Nukleotide. Unterstrichen sind die Nukleotide des ATmt-Oligonukleotids, die im Vergleich zum AT-Oligonukleotid mutiert sind.

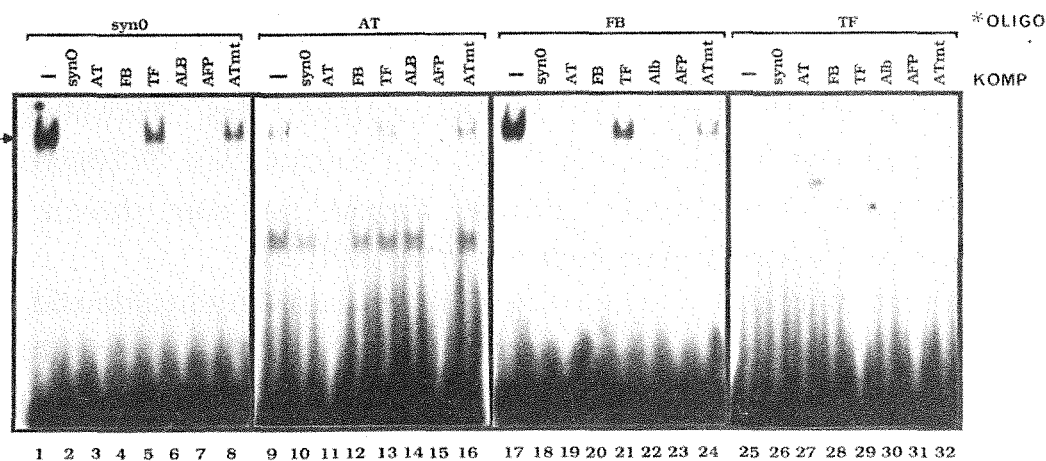


Abb. 7: Der Transkriptionsfaktor HPF1 bindet sich an verschiedene Promotorelemente.

In Bahn 1 wurden Kernproteine aus Rattenleber mit ^{32}P -markiertem syn 0-Oligonukleotid und $0,5 \mu\text{g}$ poly(dI-dC) inkubiert (nach Singh et al., 143). Die Bahnen 2 bis 8 enthielten zusätzlich 6 ng des angegebenen nichtmarkierten Oligonukleotids (s. Tab. 2 bzgl. der verwendeten Abkürzungen) als Kompetitor (KOMP). Der gleiche experimentelle Versuchsansatz mit radioaktiv markiertem AT-, FB- und TF-Oligonukleotid ist in den Bahnen 9 bis 16, 17 bis 24 und 25 bis 32 gezeigt.

Zur Klärung der Frage, ob die zu HP1-ähnlichen Sequenzen ebenfalls Proteine binden können und wenn ja, ob die Komplexe, die mit den verschiedenen Oligonukleotiden entstehen, die gleichen Proteine enthalten, wird der gleiche experimentelle Ansatz gewählt. Als radioaktiv markierte Probe wird das α_1 -Antitrypsin-, das β -Fibrinogen- und das Transferrin-Oligonukleotid verwendet. Aus Abb. 7 geht hervor, daß sich mit den markierten Oligonukleotiden α_1 -Antitrypsin und β -Fibrinogen (Tab. 2) wie mit dem syn 0-Oligonukleotid ein entsprechender, markanter Komplex bildet (vgl. die Bahnen 9 und 17 mit 1). Mit dem markierten Transferrin-Oligonukleotid kann dagegen keine diskrete Komplexbildung nachgewiesen werden (vgl. Bahn 25 mit 1). Experimente mit einem Überschuß der verschiedenen nichtmarkierten Oligonukleotide als Kompetitor demonstrieren, daß in dem Komplex, der mit dem markierten α_1 -Antitrypsin- und β -Fibrinogen-Oligonukleotid gebildet wird (Bahn 9 und 17), mit allen eingesetzten nichtmarkierten Oligonukleotiden außer dem Transferrin- und dem α_1 -Antitrypsinmutanten-Oligonukleotid um Bindung kompetiert werden kann (vgl. die Bahnen 10-16 mit 9 und 18-24 mit 17).

Auch die Vermutung der Andersartigkeit des Transferrin-Elements bestätigt sich: Die im Falle des markierten Transferrin-Oligonukleotids entstehende diffuse Bande ist nur durch die homologe Probe kompetierbar (vgl. Bahn 29 mit 25).

Verwendet man das markierte α_1 -Antitrypsin-Oligonukleotid, so beobachtet man einen zusätzlichen Komplex (Bahn 9), der nur durch die homologe Probe und das α -Fötoprotein-Oligonukleotid kompetiert werden kann (vgl. die Bahnen 11 und 15 mit 9). Dieser Komplex entsteht also aus einer andersartigen DNA-Protein-Interaktion und wird nicht weiter analysiert.

Zusammenfassend weisen die Bindungsexperimente nach, daß sich an die DNA-Elemente aus den Genen, die für das Xenopus- und Maus-Albumin, das α -Fötoprotein der Maus, das β -Fibrinogen der Ratte und das α_1 -Antitrypsin des Menschen kodieren, das gleiche Protein bindet. Sie sind daher als HP1-Homologe anzusehen.

3. Vergleichende Analyse der Transkriptionsfaktoren, die die AABS, BABS und HP1 erkennen

3.1 Die Faktoren AAP, BAP und HPF1 sind nicht identisch

Die Analyse der 5'-flankierenden Region der Vitellogenin- und Albumingene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (42, 79, 137), führte zur Identifikation der cis-wirkenden DNA-Elemente AABS, BABS und HP1 sowie der korrespondierenden Transkriptionsfaktoren AAP, BAP und HPF1. "Bandshift"-Kompetitionsexperimente mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden A2 (enthält AABS), B1wt (enthält BABS) und syn 0 (enthält HP1) sollen die Frage klären helfen, ob es sich dabei um verschiedene Regulationssequenzen und unterschiedliche Proteine handelt.

Alle drei Oligonukleotide bilden mit Kernextrakt aus Rattenleber Komplexe unterschiedlicher Zahl und Mobilität (Abb. 1b, Abb. 3b, Abb. 7, Abb. 8). Ob die gebildeten Komplexe identische oder unterschiedliche Proteine enthalten, zeigen Kompetitions-

experimente mit einem Überschuß der entsprechenden nicht-markierten Oligonukleotide. Abb. 8 verdeutlicht, daß sich die Bindungen in den mit markiertem A2-Oligonukleotid gebildeten Komplexen I-IV nur von der homologen Probe, nicht aber vom B1wt-Oligonukleotid kompetieren lassen (vgl. Bahn 1 mit 2 und 3). Das nichtmarkierte HP1-Oligonukleotid (syn0) kompetiert um Bindung in Komplex IV (vgl. Bahn 4 mit 1). Die Interaktion des BAP mit der BABS läßt sich nur durch das homologe Oligonukleotid kompetieren (vgl. Bahn 5 mit 7), während die anderen Kompetitoren keinen Einfluß ausüben (vgl. Bahn 5 mit 6 und 8). Im Falle der HPF1/HP1-Wechselwirkung kommt es zu einer effizienten Konkurrenz mit dem homologen syn 0- und dem heterologen A2-Oligonukleotid, nicht jedoch mit der B1wt-Probe (vgl. Bahn 9 mit 10 und 12 sowie mit 11).

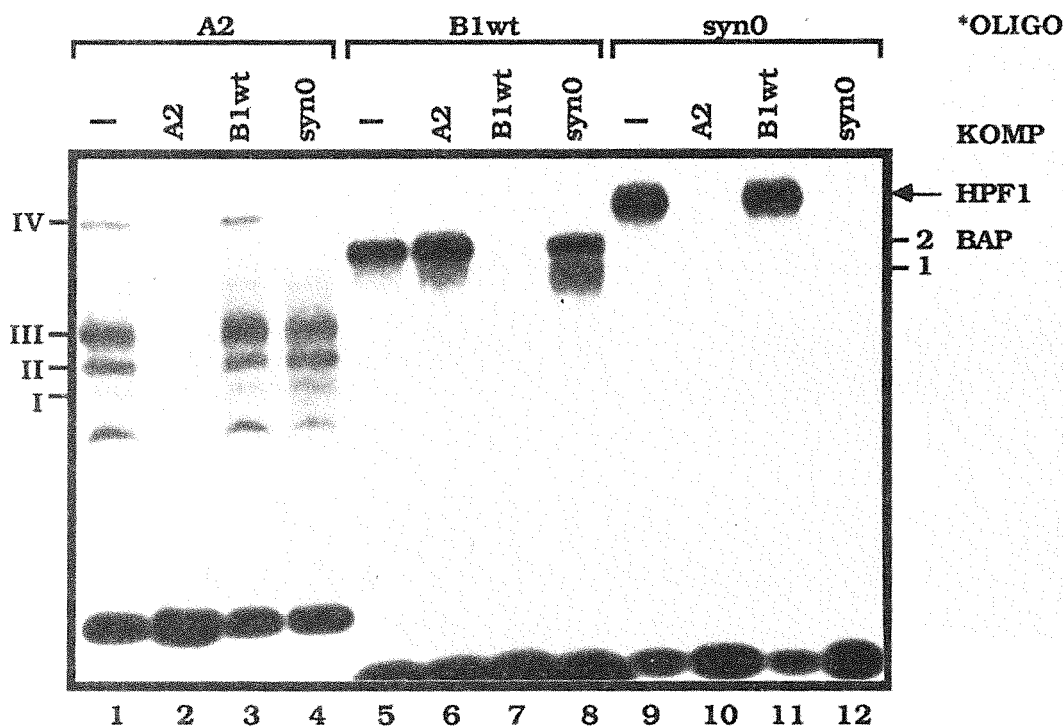


Abb. 8: Verschiedene Transkriptionsfaktoren binden sich an die AABS, BABS und HP1.

"Bandshift"-Assay mit radioaktiv markiertem A2-Oligonukleotid (von Position -121 bis -87) und Kernextrakt aus Rattenleber (Bahn 1). Zusätzlich wurden als Kompetitor (KOMP) nichtmarkierte Oligonukleotide eingesetzt (250-facher molarer Überschuß), die die Bindungsstelle für AAP (A2), BAP (B1wt) und HPF1 (syn 0) enthalten (Bahn 2-4). Gleiche Reaktionsansätze wurden mit B1wt- (Bahn 5-8) und syn 0-Oligonukleotid (Bahn 9-12) als markierter Probe durchgeführt. Gekennzeichnet sind die Positionen der spezifischen Protein-DNA-Komplexe mit der AABS (I-IV), der BABS (1 und 2) sowie mit HP1 (Pfeil).

Der Faktor, der sich an das HP1-Element bindet, ähnelt also dem für die Bildung von Komplex IV an der AABS verantwortlichen. Dagegen unterscheiden sich alle anderen an der Komplexbildung mit den diversen Elementen beteiligten Proteine voneinander. Zur Unterstützung dieser Aussage werden die einzelnen Faktoren weiter charakterisiert.

3.2 AAP, BAP und HPF1 existieren in verschiedenen Zelltypen

Es ist bekannt, daß die Vitellogenin- und Albumingene nur in Leberzellen aktiv sind (38, 159). Daher ist es naheliegend, daß die AABS, BABS und HP1 die Erkennungssequenz für leberspezifische Transkriptionsfaktoren enthalten.

Diese Annahme läßt sich durch "Bandshift"-Assays mit ^{32}P -markiertem AABS- (A2), BABS- (B1wt) und HP1-Oligonukleotid (syn 0) und Kernextrakten aus Leber- und Nichtleberzellen überprüfen.

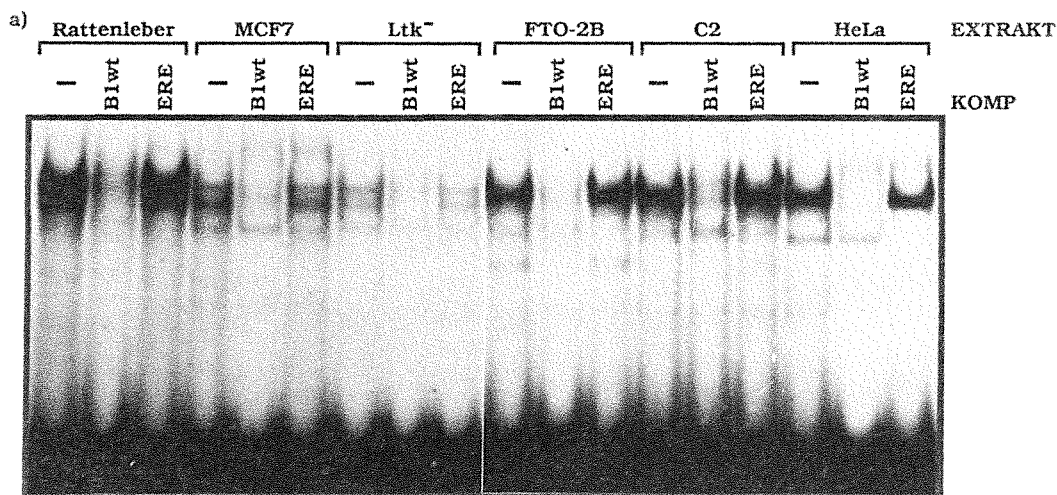
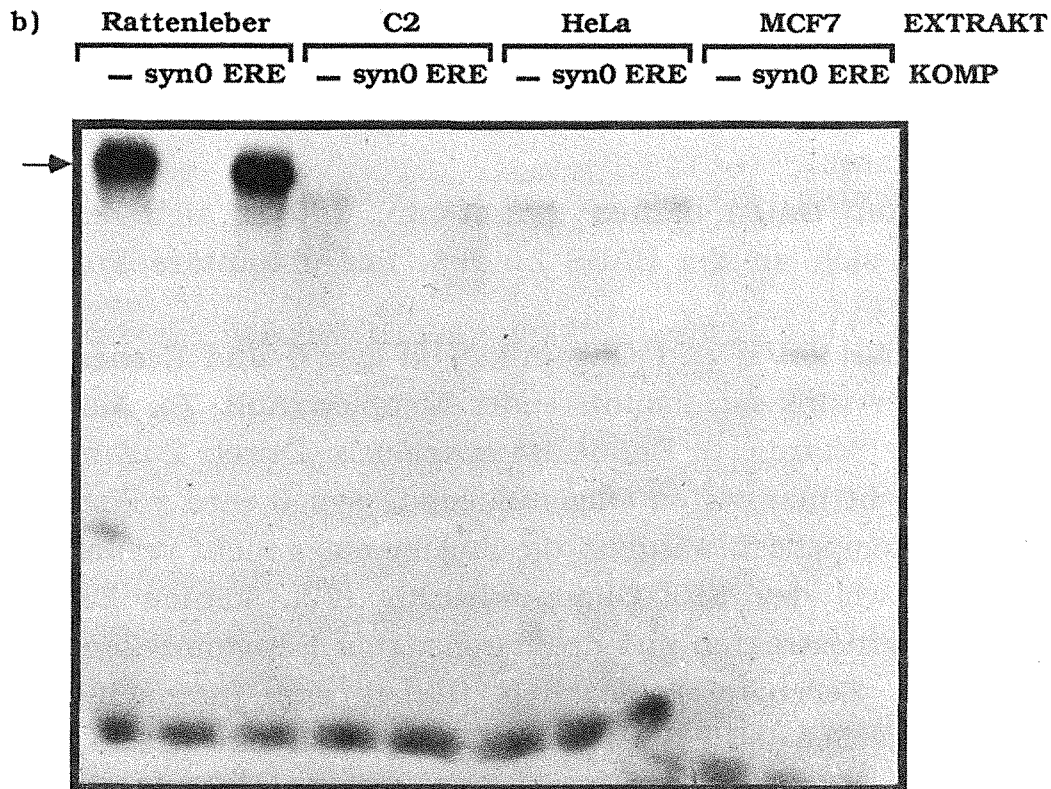


Abb. 9: Die Transkriptionsfaktoren BAP und HPF1 findet man in unterschiedlichen Zelltypen.

a) Markiertes B1wt-Oligonukleotid (Sequenz s. Tab. 1) wurde mit Kernextrakt aus Leberzellen (Ratte, FTO-2B, C2) und Nichtleberzellen (MCF7, Ltk⁻, HeLa) und 100 ng Lachssperma-DNA inkubiert und durch "Bandshift"-Assay (nach Singh et al., 143) analysiert. Als Kompetitor (KOMP) enthielten die Reaktionsmischungen zusätzlich den angegebenen 250-fachen molaren Überschuß an nichtmarkiertem B1wt- oder der gleichen Menge an heterologem ERE-Oligonukleotid.



b) Das markierte Oligonukleotid syn 0, das die HP1-Sequenz enthält (Sequenz s. Tab. 2), wurde mit Kernextrakt aus Leberzellen (Ratte, C2) und Nichtleberzellen (HeLa, MCF7) in Anwesenheit von 0,5 μg poly(dI-dC) inkubiert und auf einem 4% Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie analysiert. Wo angegeben befand sich ein 100-facher molarer Überschuß an nichtmarkiertem syn 0- oder die gleiche Menge an heterologem ERE-Oligonukleotid als Kompetitor (KOMP) im Reaktionsansatz. Der Pfeil markiert die Position des spezifischen Komplexes.

Die entsprechenden Daten für die AABS sind bereits publiziert, so daß sie hier nicht mehr aufgeführt werden: Verwendung von Kernextrakten aus Rattenleber und HeLa-Zellen demonstrierte, daß die AABS *in vitro* zellspezifisch mit Transkriptionsfaktoren interagiert (42). Auch *in vivo* ist die Funktion der AABS mit Ausnahme von MCF7-Zellen auf Leberzellen beschränkt (42). Abb. 9a zeigt, daß es mit allen getesteten Kernextrakten aus Leber- (Rattenleber; Hepatomzellen der Ratte, FT0-2B; dedifferenzierte Hepatomzellen, C2) und Nichtleberzellen (menschliche Brustkarzinomzellen, MCF7; Fibroblasten der Maus, Ltk⁻; menschliche Zervixkarzinomzellen, HeLa) und Blwt-Oligonukleotid als radioaktiver Probe zu einer DNA-Protein-Interaktion kommt. Die dabei entstehenden Komplexe besitzen die gleiche Mobilität. Diese

Wechselwirkungen sind spezifisch, da man mit homologem B1wt-, nicht aber mit heterologem ERE-Oligonukleotid (77) um Bindung kompetieren kann.

Die gezeigten Daten deuten darauf hin, daß es sich bei den Faktoren, die sich an die BABS binden, um ubiquitäre Proteine handelt.

Mit dem markierten HP1-Oligonukleotid syn 0 und Kernextrakt aus Rattenleber wird ein dominierender Komplex (Abb. 7b, Abb. 9b) gebildet. Diese retardierte Bande ist spezifisch: Durch Zugabe des homologen, nicht markierten Oligonukleotids syn 0 wird vollständig um Bindung kompetiert, während die Zugabe eines nicht verwandten Kompetitors, wie des ERE-Oligonukleotids (77), keinen Einfluß ausübt. Mit Kernextrakten aus dedifferenzierten Hepatomzellen (C2), menschlichen Zervixkarzinomzellen (HeLa) oder menschlichen Brustkarzinomzellen (MCF7) ist diese DNA-Protein-Interaktion nicht nachweisbar.

Daraus läßt sich ableiten, daß HP1 mit einem Protein aus Hepatozyten interagiert, nicht aber mit Faktoren aus Nichtleberzellen.

3.3 Die Faktoren AAP, BAP und HPF1 sind unterschiedlich modifiziert

Viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren werden einer posttranslationalen Modifikation, in erster Linie einer Glykosylierung oder Phosphorylierung, unterworfen (64, 104). Die Arbeitsgruppe von Tjian hat bereits gezeigt, daß einige Transkriptionsfaktoren, z.B. Sp1, glykosyliert sind (69). Charakteristisch für die dabei auftretende Glykosylierung ist der O-glykosidisch verknüpfte Zuckerrest N-acetylglucosamin (O-GlcNAc), der sich durch eine starke Affinität zu Lektin aus Weizenkeimlingen auszeichnet (113). Es stellt sich die Frage, ob die AAP, BAP und HPF1 in der gleichen Weise wie Sp1 modifiziert sind.

Um diese Frage zu beantworten, wird eine Weizenkeimlektin-Agarosesäule mit Kernextrakt aus Rattenleber beladen (70). Mehr als

90% der gesamten Kernproteine werden nicht gebunden. Die zurückgehaltenen Proteine lassen sich mit 0.3 M N-acetylglucosamin eluieren, da es mit den Proteinen um Bindungsstellen konkurriert. Lade-, Durchfluß-, Wasch- und Elutionsfraktionen werden im "Bandshift"-Assay mit den verschiedenen radioaktiv markierten Oligonukleotiden getestet (Abb. 10). Von den A-Aktivor-Proteinen ist nur das an Komplex IV beteiligte ausreichend glykosyliert, um auf der Lektinsäule zurückgehalten zu werden (vgl. Bahn 4 mit 2). Mehr als 95% der B-Aktivor-Bindungsaktivität befindet sich dagegen im Durchfluß (vgl. Bahn 6 mit 8): BAP ist also nicht glykosyliert. Im Gegensatz dazu wird der größte Teil von HPF1 auf der Säule gebunden und durch 0.3 M N-acetylglucosamin eluiert (vgl. Bahn 12 mit 10). Das deutet darauf hin, daß HPF1 glykosyliert ist.

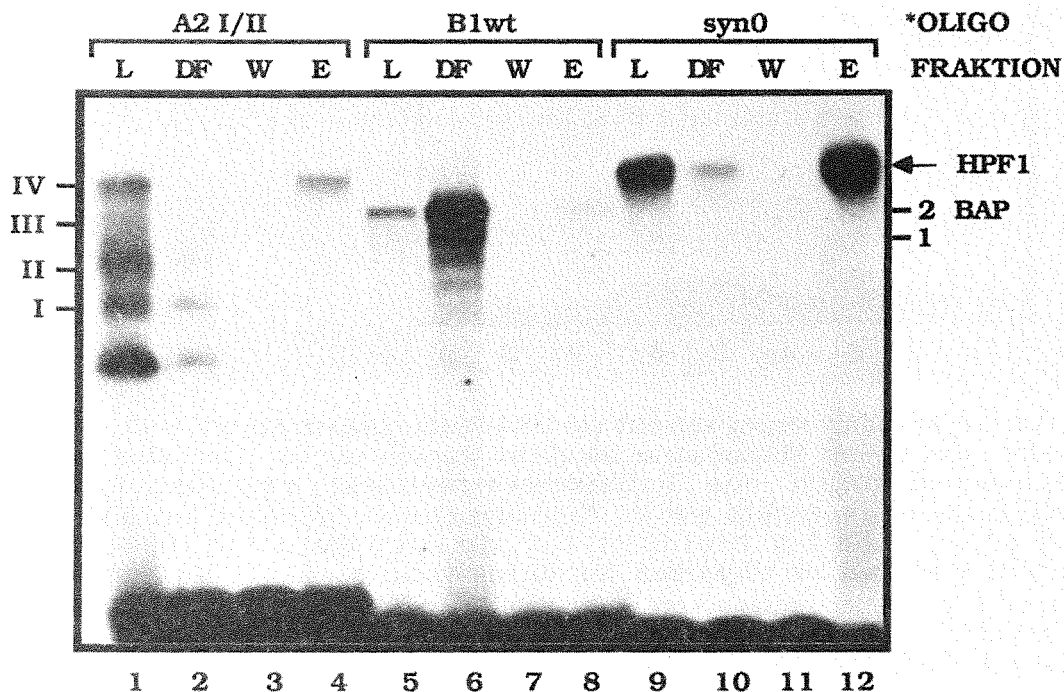


Abb. 10: Glykosylierung von AAP, BAP und HPF1.

2 ml Kernextrakt aus Rattenleber wurden auf einer Weizenkeim-Lektin-Agarose-Säule (1 ml) chromatographiert und 2 ml Fraktionen gesammelt. Die gebundenen Proteine wurden mit 0,3 M N-acetylglucosamin eluiert. Lade- (L), Durchfluß- (DF), Wasch- (W) und Elutionsfraktionen (E) wurden auf DNA-Bindungsaktivität getestet. Die markierten Oligonukleotide entsprechen Regulationselementen aus dem Vitellogenin-A2-Gen (AABS, Elemente 1 und 2, A2 I/II), dem Vitellogenin-B1-Gen (BABS, B1wt) oder dem Albumin-Gen (HP1 in syn 0). Die Position der gebildeten Komplexe ist angegeben (I-IV mit A2 I/II, 1 und 2 mit B1wt, Pfeil mit syn 0).

Die Lektin-Affinitätschromatographie zeigt, daß die Transkriptionsfaktoren AAP, BAP und HPF1 unterschiedlich modifiziert sind. Während HPF1 ein Glykoprotein ist, trägt BAP keine O-GlcNAc-Reste. Von den Proteinen, die die AABS erkennen, ist nur das am Komplex IV beteiligte glykosyliert.

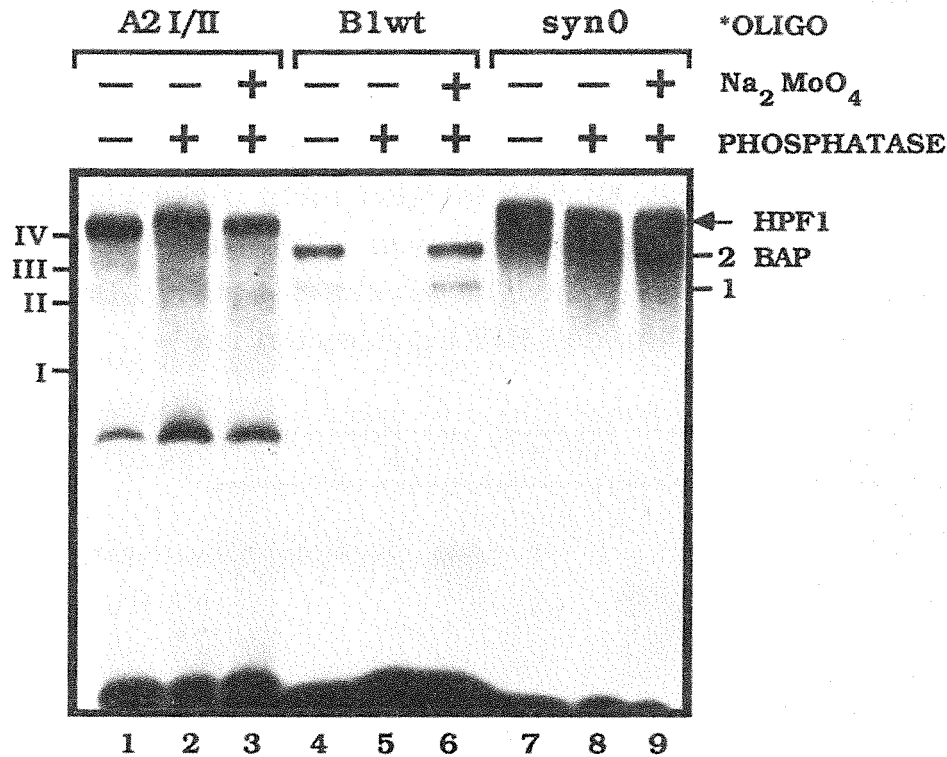


Abb. 11: Dephosphorylierung zerstört die DNA-Bindungsaktivität von BAP. Mit oder ohne saurer Phosphatase inkubiert wurden vor der "Bandshift"-Analyse Reaktionsmischungen aus Rattenleberkernextrakt und den folgenden Oligonukleotiden (aufgefüllt mit *E. coli*-Polymerase-I, markiert mit alpha-³²P-dCTP): A2 I/II (Bahn 1-3), B1wt (Bahn 4-6) oder syn 0 (Bahn 7-9). Die Reaktionen enthielten zusätzlich, wo angegeben, Natriummolybdat (Na₂MoO₄) als Phosphatase-Inhibitor. Die mit der radioaktiven Probe gebildeten Komplexe sind gekennzeichnet (I-IV für A2 I/II, 1 und 2 für B1wt, Pfeil für syn 0).

Die Phosphorylierung ist ein anderer wichtiger Typ der posttranslationalen Modifikationen (104). Um deren Bedeutung für die Bindung der Faktoren AAP, BAP und HPF1 an ihre Erkennungssequenzen zu untersuchen, wird Kernextrakt aus Rattenleber mit saurer Phosphatase behandelt und durch Zugabe von radioaktiv markiertem A2 I/II- (enthält die Elemente 1 und 2 der AABS), B1wt- (enthält die BABS) und syn 0-Oligonukleotid (enthält das HP1) auf

Bindungsaktivität hin getestet. Abb. 11 veranschaulicht, daß die Bindungsaktivität im Falle des Blwt-Oligonukleotids nach Phosphatasebehandlung verlorengelht (vgl. Bahn 4 mit 5). Dieser Effekt ist spezifisch, da die Komplexbildung in Gegenwart von 20 mM Natriummolybdat (Na_2MoO_4), eines Phosphatasehemmers, nicht beeinflußt wird (vgl. Bahn 6 mit 4). Im Fall der AAP ist nur Komplex IV deutlich ausgeprägt (Bahn 1). Phosphatasebehandlung führt zu einer leichten Veränderung der Mobilität von Komplex IV (vgl. Bahn 2 mit 1). Daraus könnte man schließen, daß das daran beteiligte Protein zwar phosphoryliert ist, die Phosphorylierung aber auf die DNA-Bindung keinen Einfluß hat. Phosphatasebehandlung verändert nicht die Bindung des Faktors HPF1 an HP1 (vgl. Bahn 8 mit 7).

Neben Unterschieden im Glykosylierungsgrad lassen sich solche bei den Transkriptionsfaktoren auch im Hinblick auf den Einfluß der Phosphorylierung feststellen. Während Phosphatasebehandlung auf die Bindung der Proteine AAP und HPF1 an ihre Erkennungssequenzen keinen Einfluß hat, ist die Phosphorylierung des BAP für seine DNA-Bindung absolut erforderlich.

3.4 Molekulargewicht der Faktoren AAP, BAP und HPF1

Die bisherigen Daten deuten an, daß es sich bei den AAP, BAP und HPF1 um verschiedene Regulationsproteine handelt. Zusätzliche Informationen, z.B. über ihre Größe, sind deshalb für die weitere Charakterisierung von Interesse. Zur Bestimmung des Molekulargewichts von AAP, BAP und HPF1 wird die Methode einer Protein-DNA-Vernetzung mit UV Licht ("UV cross-link") eingesetzt (41,123). Dabei inkubiert man den Reaktionsansatz 30 Min. bei Raumtemperatur, anschließend wird auf Eis mit UV Licht bestrahlt, um reaktive Bindungen zu erzeugen. Befindet sich nun ein Protein, welches sich an das eingesetzte DNA-Element bindet, mit einer geeigneten Aminosäureseitenkette in direkter Nachbarschaft zur energiereichen Bindung, kann sich eine kovalente Bindung als Vernetzung zwischen Protein und DNA ausbilden. Die so behandelte Probe wird auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch

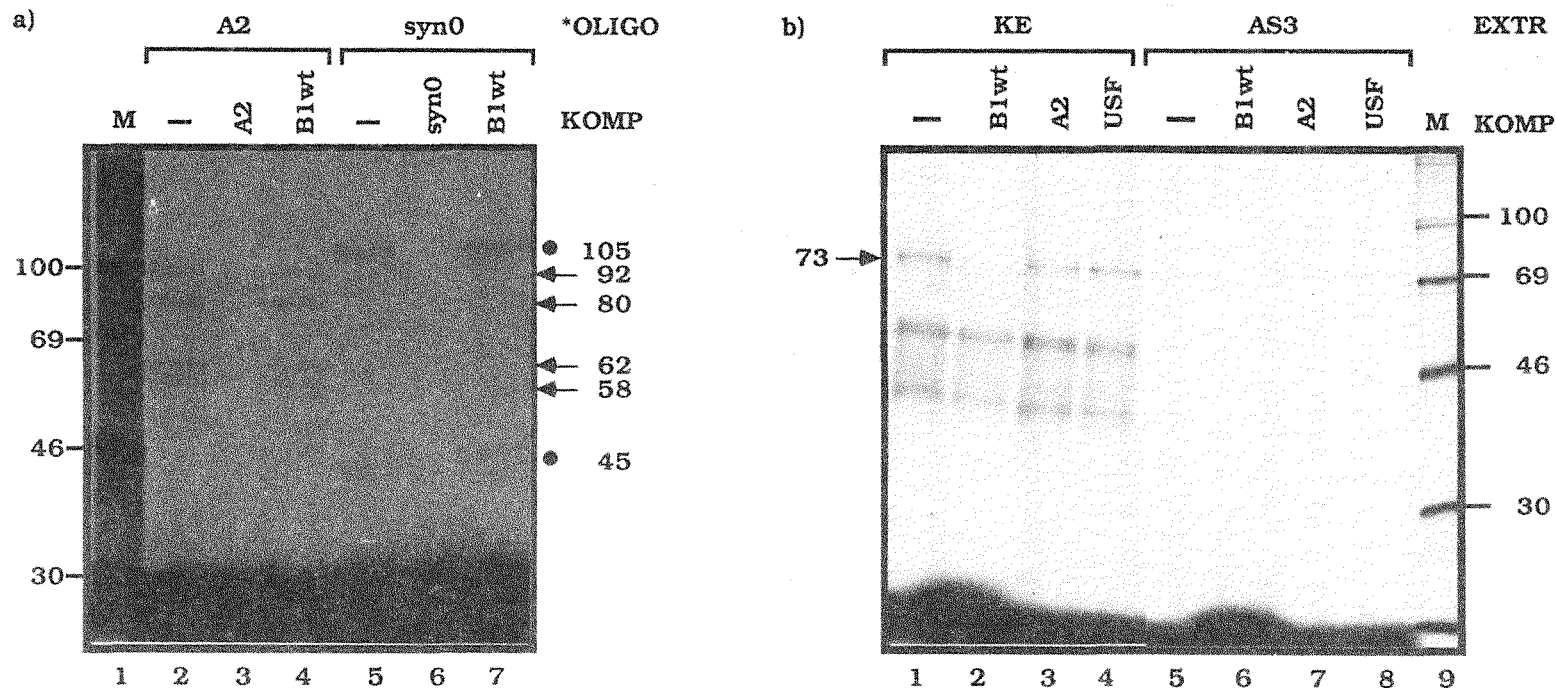


Abb. 12: Molekulargewicht von AAP, BAP und HPF1 bestimmt durch "UV cross-link"-Analyse.

a) Rattenleberkernextrakt (9 µg) wurde mit je 10^4 cpm an markiertem A2- (Bahn 2-4) und syn 0-Oligonukleotid (Bahn 5-7) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, 20 min mit UV bestrahlt und auf einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. In den Mischungen befand sich zusätzlich ein 250-facher molarer Überschuß an homologem- (A2 in Bahn 3, syn 0 in Bahn 6) und heterologem Oligonukleotid (B1wt in Bahn 4 und 7) als Kompetitor. Das Molekulargewicht der Polypeptide, die mit der Probe interagieren (Pfeile für A2, Punkte für syn 0), sowie das der Markerproteine (M, Bahn 1) ist angegeben (in kDa).

b) "UV cross-link"-Experimente (Bedingungen s. bei a) mit radioaktiv markiertem B1wt-Oligonukleotid und Kernextrakt aus Rattenleber (KE, Bahn 1-4) und einer hochgereinigten BAP-Präparation (AS3, dreimal über eine DNA-Affinitäts-säule, Bahn 5-8; Abb. 16). Zusätzlich zum homologen B1wt- und heterologen A2-Oligonukleotid (Bahn 2 und 6 bzw. 3 und 7) wurde noch das USF-Oligonukleotid (Tab. 1) als Kompetitor (KOMP) eingesetzt (Bahn 4 und 8). Das Molekulargewicht des spezifisch interagierenden Polypeptids (73 kDa) sowie das der Markerproteine (Bahn 9) ist aufgeführt.

aufgetrennt und die stabilen Komplexe durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Abb. 12a zeigt die Ergebnisse einer solchen Analyse für radioaktiv markiertes A2- und syn 0-Oligonukleotid (HP1) mit Kernextrakt aus Rattenleber. An die AABS sind vier Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 92 kDa, 80 kDa, 62 kDa und 58 kDa vernetzt (Bahn 2). Da die Konkurrenz um Bindung in allen vier Banden nur mit dem homologen, nicht aber mit dem heterologen Oligonukleotid erfolgreich verläuft (vgl. Bahn 3 und 4 mit 2), ist es eine spezifische Interaktion der verschiedenen Proteine mit der eingesetzten Probe. Mit der HP1-Probe (syn 0) bilden sich zwei Komplexe mit einem Molekulargewicht von 105 kDa und 45 kDa (Bahn 5). Durch einen Überschuß an nichtmarkiertem syn 0-Oligonukleotid verschwinden beide Komplexe (vgl. Bahn 6 mit 5), während die gleiche Menge an heterologem ERE-Oligonukleotid (77) nur das 45 kDa Polypeptid partiell kompetiert (vgl. Bahn 7 mit 5). Es handelt sich also bei der 105 kDa Bande um eine spezifische Interaktion zwischen HPF1 und der HP1 Probe. Die 45 kDa Bande stellt vermutlich ein Abbauprodukt dar, das noch die DNA-Bindungsdomäne enthält.

Aus Abb. 12b ist zu erkennen, daß mit der markierten BABS-Probe drei Komplexe mit einem Molekulargewicht von 73 kDa, 51 kDa und 39 kDa entstehen (Bahn 1). Durch einen Überschuß an nichtmarkiertem Blwt-Oligonukleotid läßt sich nur um Bindung in der 73 kDa Bande kompetieren (vgl. Bahn 2 mit 1). Diese ist also das Produkt der spezifischen Interaktion zwischen BAP und der Probe, da die gleiche Menge an heterologem Oligonukleotid keinen Einfluß hat (vgl. Bahn 3 mit 1). Da "Bandshift"-Experimente gezeigt haben, daß der Transkriptionsfaktor USF/MLTF auch die BABS erkennt (Abb. 5), wird überprüft, ob USF/MLTF an der Bildung des 73 kDa Komplexes beteiligt ist. Mit dem USF/MLTF-Oligonukleotid läßt sich nicht um Bindung kompetieren (vgl. Bahn 4 mit 1). Damit kann der Faktor, der für die Bildung des 73 kDa Komplexes verantwortlich ist, nicht identisch mit demjenigen sein, der das USF/MLTF-Oligonukleotid erkennt. Wird der Kernextrakt über eine Heparin-Sepharosesäule und dreimal über eine DNA-Affinitätssäule mit der

Blwt-Sequenz als Ligand gereinigt (s. unten), zeigt die "UV cross-link"-Analyse nur die 73 kDa Bande (Bahn 5). Dies bestätigt, daß der 51 kDa und der 39 kDa Komplex auf Kernproteine zurückzuführen sind, die unspezifisch mit der Probe interagieren. Die Spezifität der Interaktion in der 73 kDa Bande wird bestätigt durch Kompetition mit homologer und heterologer Probe (vgl. Bahn 6, 7 und 8 mit 5).

Mit der Technik des "UV cross-link" zeigt sich, daß die drei DNA-Elemente AABS, BABS und HP1 von Proteinen unterschiedlicher Größe erkannt werden. Bei den Werten ist zu berücksichtigen, daß die noch an UV vernetzte Proteine gebundenen Oligonukleotide AABS, BABS und HP1 zur berechneten Größe ein eigenes Molekulargewicht beitragen. Nimmt man für die Oligonukleotide AABS, BABS und HP1 29 kDa, 15 kDa und 18 kDa an, so haben die A-Aktivator Proteine ein Molekulargewicht von 63 kDa, 51 kDa, 33 kDa und 29 kDa; BAP ist 58 kDa groß, während HPF1 ein Molekulargewicht von 87 kDa besitzt.

4. Reinigung der Faktoren AAP, BAP und HPF1

Die Reinigung von Regulationsproteinen ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Klonierung der faktorkodierenden Gene. Unterschiedlich große und verschieden modifizierte Transkriptionsfaktoren sollten sich auch in ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden und daher zu trennen sein. Für die Analyse ist es von Bedeutung, eine rasche und empfindliche Nachweismethode wie den "Bandshift"-Assay (3, 53) zur Verfügung zu haben. Dieser relativ einfache Test wird auf jeder Reinigungsstufe eingesetzt, um Lade-, Durchfluß-, Wasch-, und Gradientenfraktionen auf Bindungsaktivität zu testen.

Im folgenden werden die Ergebnisse zur Reinigung der Transkriptionsfaktoren, die sich an die BABS und an HP1 binden, vorgestellt. Die gezeigten Elutiosprofile und die dazu gehörenden "Bandshift"-Analysen stehen exemplarisch für mehrere Reinigungsschritte (Abb. 13-16). Auf eine Reinigung der AAP wird verzichtet, da

experimentell noch nicht geklärt ist, welchen Beitrag die einzelnen Subelemente der AABS für Bindung und Funktion in vivo und in vitro leisten. Daher ist es auch nicht möglich, eine Auswahl zu treffen, welches der vier AAP primär gereinigt werden soll.

Die ausgewählten Reinigungsschritte sind: Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und als deren spezielle Anwendung die sequenzspezifische-DNA-Affinitätschromatographie. Das Trennprinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf einem Ionenbindungsgleichgewicht zwischen geladenen Gruppen (hier: quarternäres Amin, Q) an einer festen Phase (hier: Sepharose) und ladungstragenden Molekülen (hier: Kernproteine aus Rattenleber) in einer beweglichen flüssigen Phase (hier: Pufferlösung, s. Materialien&Methoden). Diese Technik hat gegenüber der Gelfiltration oder der Affinitätschromatographie den Vorteil, relativ große Volumina zu konzentrieren und dabei mit hoher Flußrate in angemessener Zeit reinigen zu können. Während der Affinitätschromatographie kommt es zu einer spezifischen Komplexbildung zwischen einem Matrix-gebundenen Reaktionspartner (hier: Heparin) und einem gelösten Molekül (hier: Kernproteine aus Rattenleber). Bei der sequenzspezifischen DNA-Affinitätschromatographie wird die Erkennungssequenz des zu reinigenden Proteins an eine Sepharosematrix gekoppelt (75, 169).

4.1 Reinigung des Transkriptionsfaktors BAP

Für die Reinigung des BAP wird Rattenleberkernextrakt, präpariert nach Gorski et al. (56), eingesetzt. Bei dieser Technik werden die Kerne durch ein Saccharosekissen aufgereinigt. Die extrahierten Kernproteine werden anschließend noch mit Ammoniumsulfat gefällt. "Bandshift"-Assays weisen nach, daß mit dieser Technik eine höhere Ausbeute an spezifischen DNA-bindenden Proteinen erzielt werden kann (Daten hier nicht gezeigt). Der Rohextrakt wird zunächst über eine Anionenaustauschersäule, Q-Sepharose, gereinigt. Abb. 13a zeigt das chromatographische Profil einer solchen Reinigung, Abb. 13b die dazu gehörende "Bandshift"-

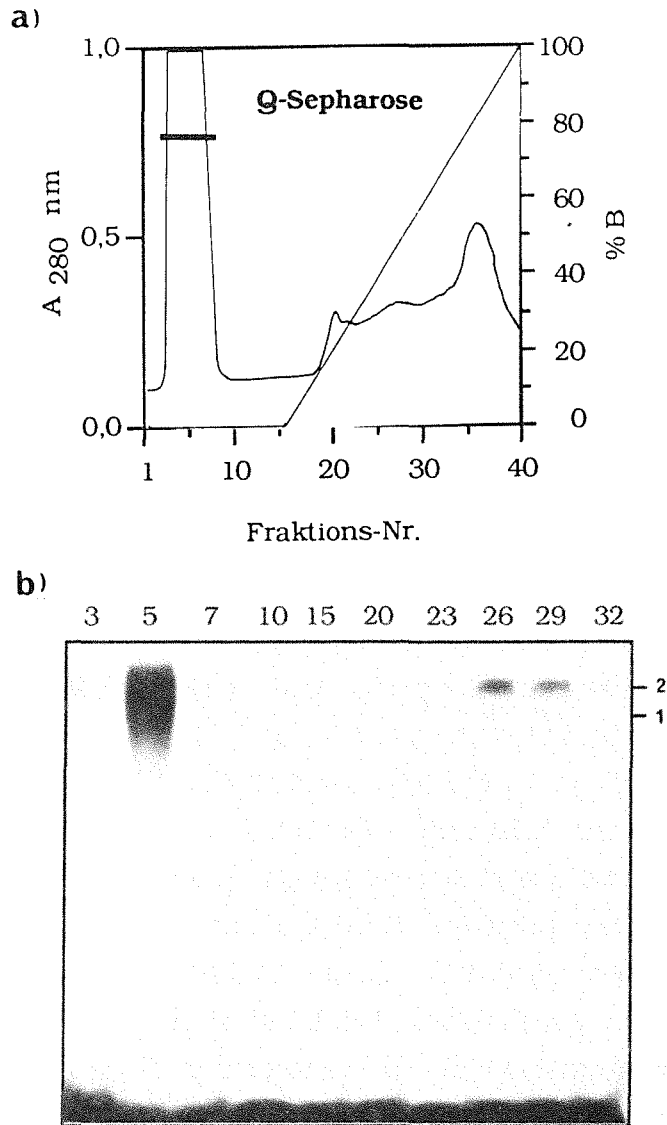


Abb. 13: Anionenaustauschchromatographie des BAP.

a) Dargestellt ist das FPLC-Elutionsprofil von Rattenleberkernextrakt-Aliquots (44 ml) auf Q-Sepharose. Nach dem Auftragen und Waschen (Fraktion 1-15) mit 100 ml Puffer D (0,04 M NaCl, definiert als 0% B) wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl Gradienten (0,04-0,5 M NaCl, definiert als 0-100% B) von der Säule eluiert (Fraktion 16-40). Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 10 ml. Ein Strich kennzeichnet diejenigen Fraktionen, die BAP-Aktivität enthielten und für den folgenden Reinigungsschritt verwendet wurden.

b) "Bandshift"-Analyse mit radioaktiv markiertem B1wt-Oligonukleotid und 3 μ l der angegebenen Fraktionen (Durchfluß: Nr. 3 und 5; Waschen: Nr. 7, 10, 15; Gradient: Nr. 20, 23, 26, 29 und 32) der Q-Sepharosesäule (Abb. 13a). Die Position der spezifischen Komplexe 1 und 2 (s.auch Abb. 3b) ist markiert.

Analyse mit ausgewählten Fraktionen. Die beiden mit 1 und 2 bezeichneten Banden (Abb. 13b-16b) entsprechen den mit Rohextrakt gebildeten Komplexen (Abb. 3b, Abb. 5). Aus Abb. 13b ist ersichtlich, daß sich der größte Teil der BAP-Aktivität im

Säulendurchlauf befindet (Fraktion 5). Die gebundenen Proteine werden mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0-100% B (40-500 mM NaCl) eluiert (Abb. 13a). Nur ein geringer Prozentsatz an BAP-Aktivität hat dabei an die Säule gebunden und läßt sich bei 50% B (0,25 M NaCl; Fraktion 26-29) eluieren und nachweisen (Abb. 13b).

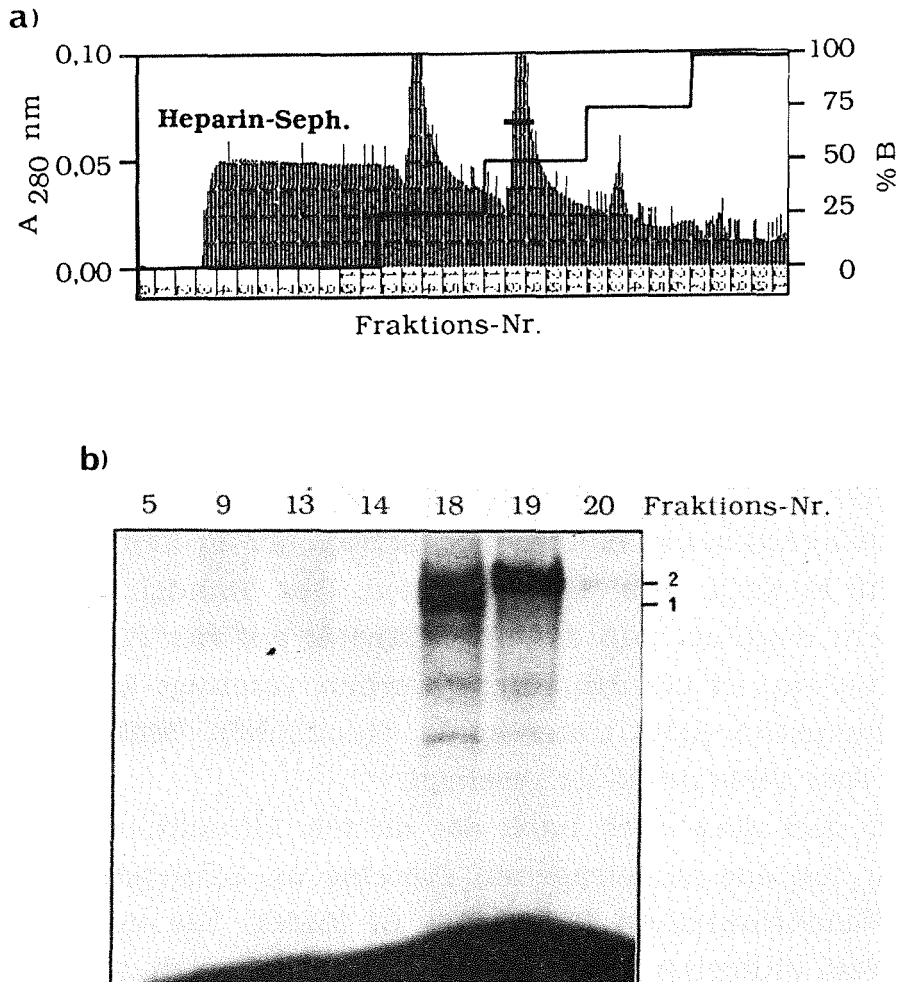


Abb. 14: Affinitätschromatographie des BAP.

a) Dargestellt ist das FPLC-Elutionsprofil von Aliquots des Ammoniumsulfatgefällten Q-Sepharose-Durchflusses (19 ml; Abb. 13) auf Heparin-Sepharose. Die Säule wurde nach Applikation der Probe mit 100 ml Puffer D (0,04 M NaCl, definiert als 0% B) gewaschen (Fraktion 0-11) und die Proteine durch einen 200 ml Stufengradienten (25, 50, 75, 100% B; 100% B sind definiert als 1,2 M NaCl) eluiert (Fraktion 12-31). Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 10 ml. Ein Strich kennzeichnet diejenigen Fraktionen, die BAP-Aktivität enthielten und für den folgenden Reinigungsschritt verwendet wurden.

b) "Bandshift"-Analysen mit radioaktiv markiertem B1wt-Oligonukleotid und 3 μ l der angegebenen Fraktionen (Waschen: Nr. 5, 9; Gradient: Nr. 13, 14, 18, 19, 20) der Heparin-Sepharosesäule (Abb. 14a). Die Position der spezifischen Komplexe 1 und 2 (s. auch Abb. 3b) ist markiert.

Der Durchfluß wird mit Ammoniumsulfat gefällt, dialysiert und einer Heparin-Sepharose-Chromatographie unterzogen (Abb. 14). Dabei werden DNA-bindende Proteine zurückgehalten und mit einem Stufengradienten eluiert (Abb. 14a). Abb. 14a zeigt je einen Proteinpeak bei 25% B (0,3 M NaCl), 50% B (0,6 M NaCl) und 75% B (0,9 M NaCl). Der "Bandshift"-Assay mit ausgewählten Fraktionen (Abb. 14b) weist nach, daß die BAP-Aktivität in den Fraktionen 18 und 19 (50% B; 0,6 M NaCl) enthalten ist (nicht gezeigt ist hier die getestete Fraktion 23, die aber keine BAP-Bindungsaktivität enthält). Die aktive, auf Komplex 2 angereicherte Fraktion Nr. 19 (s. unten), wird dialysiert, mit unspezifischer Kompetitor-DNA versetzt und dreimal über eine DNA-Affinitätssäule gereinigt.

Abb. 15a gibt das Elutionsdiagramm des ersten Laufes über diese Säule wieder. Deutlich zu erkennen ist, daß sich die große Masse der Proteine des Heparin-Sepharose-Eluats im Durchlauf befindet (Fraktionen 1 bis 5). Die an die Säule gebundenen Proteine werden mit einem Stufengradienten eluiert. Ein schwacher Proteinpeak ist bei 40% B (0,48 M NaCl; Abb. 15a) zu sehen. Der "Bandshift"-Assay (Abb. 15b) macht deutlich, daß die BAP-Aktivität auf vier Fraktionen verteilt ist (Fraktion 13 bis 16). Diese werden vereinigt und ohne Zugabe von Kompetitor-DNA unter sonst identischen Bedingungen noch zweimal über dieselbe Säule gereinigt.

Abb. 16a zeigt, daß man auch nach der dritten Affinitätssäule den überwiegenden Teil der aufgetragenen Proteine im Säulendurchlauf und in den Waschfraktionen (Nr. 1 bis 6) findet. Die mit einem Stufengradienten eluierten Proteine konzentrieren sich in einem scharfen Peak bei 40% B (0,48 M NaCl; Abb. 16a). Der Test der einzelnen Fraktionen auf BAP-Aktivität ergibt maximale Bindung in den Gradientenfraktionen 9 und 10 (Abb. 16a), was mit dem Proteinpeak korreliert (vgl. Abb. 16b mit 16a).

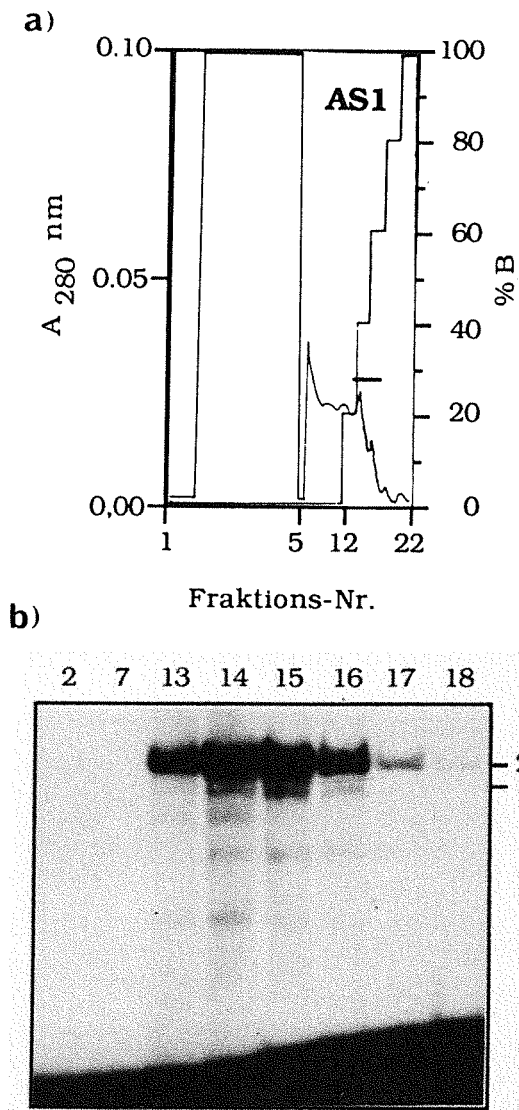


Abb. 15: Sequenzspezifische DNA-Affinitätschromatographie des BAP, 1. Säule.

a) Dargestellt ist das FPLC-Elutionsprofil von Aliquots des Heparin-Sepharose-Eluats (20 ml; Abb. 14, F19) auf einer DNA-Affinitätssäule mit der BABS-Sequenz (Abb. 3a) als Ligand. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 8 ml Puffer Z (0,1 M NaCl, definiert als 0% B) gewaschen. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden stufenweise eluiert (1,2 M NaCl definiert als 100% B). Das Volumen der Durchlaufaktionen (Nr. 1-4) betrug je 5 ml, das der Wasch- (Nr. 5-12) und Gradientenaktionen (Nr. 13-22) je 1 ml. Ein Strich kennzeichnet diejenigen Fraktionen, die BAP-Aktivität enthielten und für den folgenden Reinigungsschritt verwendet wurden.

b) "Bandshift"-Assay mit radioaktiv markiertem B1wt-Oligonukleotid und 3 μ l der angegebenen Fraktionen (Durchlauf: Nr. 2, Waschen: Nr. 7, Gradient: Nr. 13-18) der 1. DNA-Affinitätssäule (Abb. 15a). Die Position der spezifischen Komplexe 1 und 2 (s. auch Abb. 3b) ist markiert.

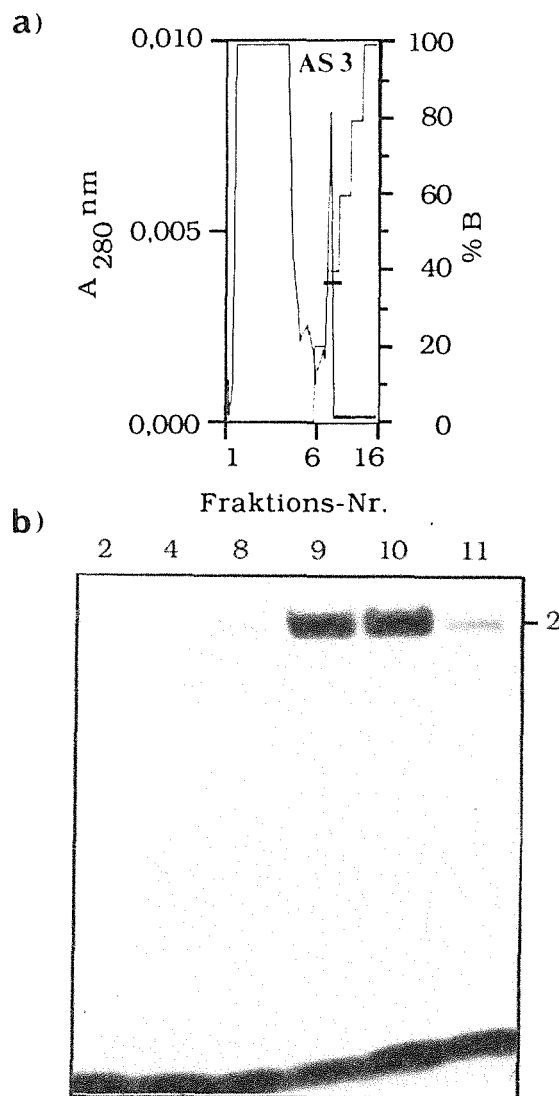


Abb. 16: Sequenzspezifische DNA-Affinitätschromatographie des BAP, 3. Säule.
 a) Dargestellt ist das FPLC-Elutionsprofil des DNA-Affinitätssäuleneluats (2. Säule, hier nicht gezeigt) auf derselben DNA-Affinitätssäule. Nach Applikation der Probe (4 ml) wurde die Säule mit 8 ml Puffer Z (0,1 M NaCl, definiert als 0% B) gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem Stufengradienten (1,2 M NaCl definiert als 100% B) eluiert. Das Volumen der Durchlauf- und Waschfraktionen (Nr. 1-6) betrug je 2 ml, das der Gradientenfraktionen (Nr. 7-16) je 1 ml. Ein Strich kennzeichnet diejenigen Fraktionen, die BAP-Aktivität enthielten.
 b) "Bandshift"-Assay mit radioaktiv markiertem B1wt-Oligonukleotid und 5 µl der angegebenen Fraktionen (Durchlauf: Nr. 2, Waschen: Nr. 4, Gradient: Nr. 8-11) der 3. DNA-Affinitätssäule (Abb. 16a). Die Position des spezifischen, BAP enthaltenden Komplexes 2 (Abb. 5, Abb. 18) ist markiert.

Um zu überprüfen, ob durch die Verwendung der Affinitätssäule ein oder mehrere Proteine angereichert werden können ("UV cross-link"-Experimente deuten bei BAP auf ein Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa hin; Abb. 12b), werden Fraktionen der

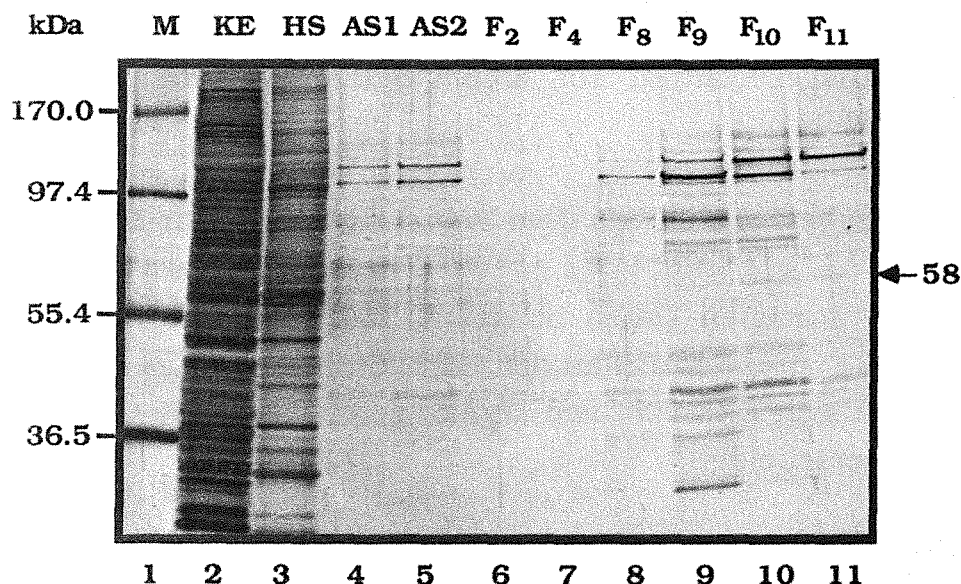


Abb. 17: Analyse von affinitätsgereinigtem BAP durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

BAP wurde, wie in Materialien&Methoden beschrieben, aus Rattenleberkernextrakt gereinigt. Je 20 μ l von Kernextrakt (KE), Heparin-Sepharose-Säule (HS, Abb. 14, F19), den ersten beiden Affinitätssäulen (AS1, Abb. 15, F14 und AS2) sowie je 30 μ l der angegebenen Fraktionen der dritten Affinitätssäule (Abb. 16, AS3, Durchfluß: F2, Waschen: F4, Gradient: F8-11) wurden einer 10% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung unterzogen (Bahn 2-11). Zur Molekulargewichtsbestimmung befand sich eine Mischung aus Markerproteinen (je 75 ng) auf dem gleichen Gel (Bahn 1). Das Molekulargewicht des möglichen BAP-Polypeptids (58 kDa) ist angegeben.

einzelnen Reinigungsstufen einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (82) mit anschließender Silberfärbung des Gels (168) unterzogen. Abb. 17 zeigt das silbergefärbte Proteingel mit Fraktionen der einzelnen Reinigungsstufen. Klar zu erkennen ist, daß im Verlauf der Reinigung (Abb. 13-16) bestimmte Proteine angereichert werden (vgl. Bahn 4 und 5 mit 2 und 3). Nach der dritten Affinitätssäule (Abb. 16) ist die Anzahl der Polypeptide reduziert, wobei in den Fraktionen 9 und 10 drei prominente Banden mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, 98 kDa und 110 kDa auftreten (Bahn 9 und 10). In diesen Fraktionen läßt sich auch maximale Bindungsaktivität nachweisen (Abb. 16b). Ein Polypeptid von 58 kDa kann man, wenn auch sehr schwach, im SDS-Gel sehen (Abb. 17). Der eindeutige Beweis, ob es sich dabei um BAP handelt, erfordert den Nachweis der spezifischen BABS-Bindung dieses

Polypeptids, ausgeschnitten aus einem SDS-Polyacrylamidgel und renaturiert (60).

4.2 BAP unterscheidet sich von dem Transkriptionsfaktor USF/MLTF

Die bisher gezeigten Daten beweisen, daß sich sowohl BAP als auch USF/MLTF an die BABS binden (Abb. 5). Daher ist es wichtig zu überprüfen, ob sich BAP von dem bereits gereinigten USF/MLTF (27, 131, 133) unterscheidet.

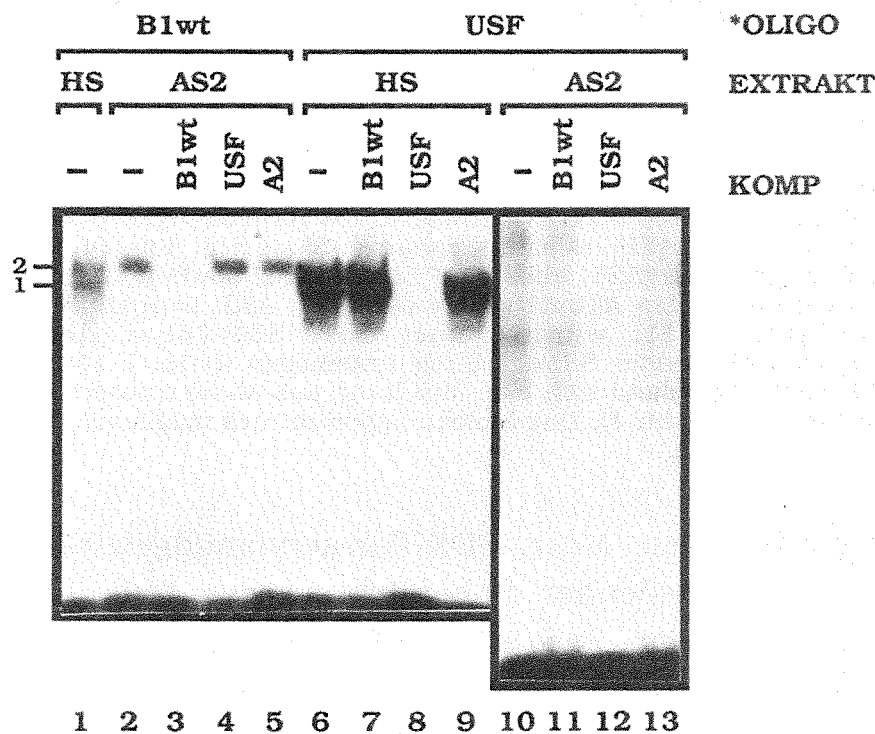


Abb. 18: BAP und USF/MLTF werden während der Reinigung abgetrennt. "Bandshift"-Assay mit Fraktionen des Heparin-Sepharose-Eluats (HS, Abb. 14, F18), der zweiten Affinitätssäule (AS 2) und markiertem Blwt- (Bahn 1-5) sowie USF/MLTF-Oligonukleotid (Bahn 6-13). Als Kompetitor (KOMP) enthielten die Reaktionsansätze einen 250-fachen molaren Überschuß an nichtmarkiertem Blwt-, USF/MLTF- oder A2-Oligonukleotid. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Abb. 1a und Tab. 1 angegeben, die Positionen der entstehenden DNA-Protein-Komplexe markiert.

Abb. 18 verdeutlicht, daß USF/MLTF bei dem hier verwendeten Reinigungsschema spezifisch abgetrennt wird: Der "Bandshift"-Assay mit markiertem Blwt-Oligonukleotid führt zu den Komplexen 1 und

2 (Abb. 3b, Abb. 5) in der Heparin-Sepharose-Fraktion (Bahn 1, vgl. auch Abb. 14b, F18). Wird BAP zweimal über eine DNA-Affinitätssäule gereinigt, bildet sich nur noch Komplex 2, der von nichtmarkiertem B1wt-Oligonukleotid, nicht aber vom USF/MLTF-Oligonukleotid oder einem heterologen Oligonukleotid, A2, kompetiert werden kann (Bahn 2-5). Der "Bandshift"-Assay mit den gleichen Fraktionen des Reinigungsschemas und der radioaktiv markierten USF/MLTF-Probe zeigt das Vorhandensein von USF/MLTF in der Heparin-Sepharosefraktion (Bahn 6-9). Die Verwendung von affinitätsgereinigtem Material ergibt eine diffuse, unspezifische Bande, was darauf zurückzuführen ist, daß bei diesem so gereinigten Material keine unspezifische Kompetitor-DNA eingesetzt wird (Bahnen 10-13). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß bei den hier gezeigten Experimenten BAP und nicht USF/MLTF gereinigt worden ist.

4.3 Reinigung des leberspezifischen Transkriptionsfaktors HPF1

Für die Reinigung von HPF1 wird Rattenleberkernextrakt zunächst über Q-Sepharose vorgereinigt. Die Fraktionen, welche die HPF1-Bindungsaktivität enthalten, eluieren bei 0,4 M KCl innerhalb eines linearen Gradienten von 0,1-0,6 M KCl. HPF1 bindet also im Gegensatz zu BAP (Abb. 13) an den Anionenaustauscher. DNA-bindende Proteine werden auf der sich anschließenden Heparin-Sepharosesäule zurückgehalten und mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0,1-0,6 M KCl eluiert. Die HPF1-Aktivität befindet sich in Fraktionen mit einem KCl-Gehalt zwischen 0,35 M und 0,4 M, während BAP erst bei höheren Salzkonzentrationen (0,6 M NaCl) von der Säule eluiert werden kann (Abb. 14). Diese Fraktionen werden vereinigt, dialysiert, mit unspezifischer Kompetitor-DNA poly(dI-dC) versetzt und auf eine sequenzspezifische DNA-Affinitätssäule geladen. Die gebundenen Proteine werden mit einem linearen Gradienten (0,1-0,6 M KCl) eluiert. HPF1-Bindungsaktivität läßt sich in zwei Fraktionen von 0,5 M KCl nachweisen. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und mit reduzierter Menge unspezifischer Kompetitor-DNA unter sonst gleichen Bedingungen

noch zweimal über diese Säule chromatographiert. HPF1-Bindungsaktivität eluiert von der 3. Säule, wie bei Säule 1 und 2, bei 0,5 M KCl. Bei 0,48 M NaCl eluiert auch BAP von einer sequenzspezifischen Affinitätssäule (Abb. 15 und 16).

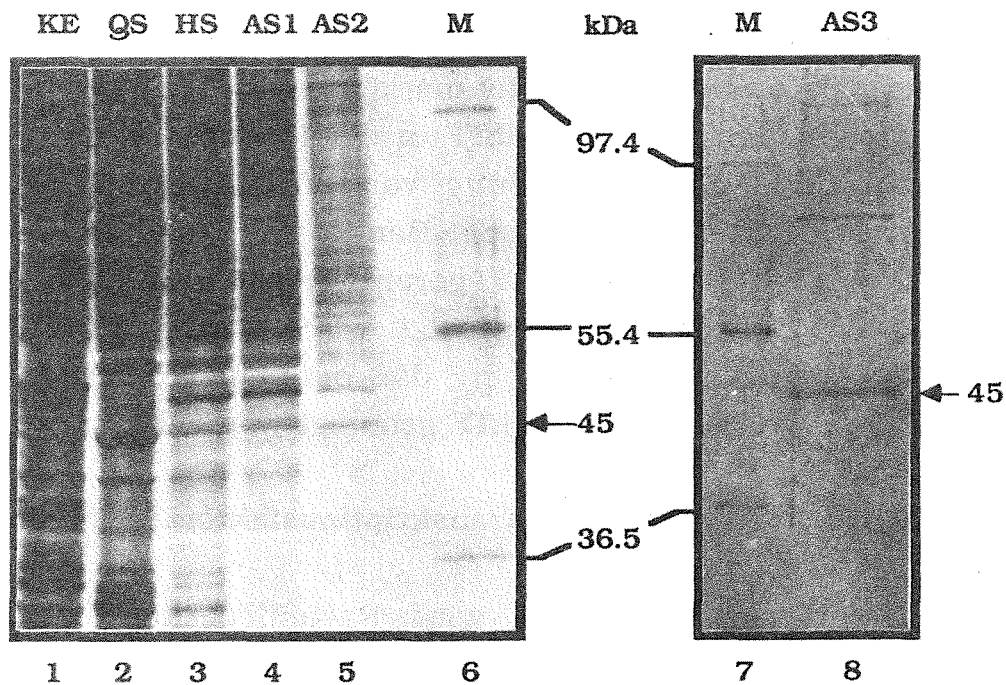


Abb. 19: Analyse von affinitätsgereinigtem HPF1 durch SDS-PAGE. HPF1 wurde, wie in Materialien&Methoden beschrieben, aus Rattenleberkernextrakt gereinigt. Von jeder Reinigungsstufe wurden 30 μ l gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Silberionen angefärbt: Kernextrakt (KE), Q-Sepharose-Säule (QS.), Heparin-Sepharose-Säule (HS) und zwei Affinitätssäulen, AS 1 und 2 (Bahn 1-5). Bahn 8 zeigt die Analyse der dritten DNA-Affinitätssäule. Um das Molekulargewicht bestimmen zu können, wurde eine Mischung aus Markerproteinen (je 75 ng) auf das gleiche Gel mit aufgetragen (Bahn 6 und 7). Das Molekulargewicht des dominierenden Polypeptids (45 kDa) ist angegeben.

Das silbergefärbte SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 19) zeigt deutlich, daß im Verlauf der Reinigung bestimmte Proteine angereichert werden (vgl. Bahn 3, 4 und 5 mit 1 und 2). Nach der dritten Affinitätssäule liegt eine wesentlich bessere Anreicherung als bei der BAP-Reinigung (Abb. 17) vor: Es sind nur noch drei Polypeptide zu erkennen, wobei eines mit einem Molekulargewicht von 45 kDa dominiert (Abb. 19, Bahn 8).

DISKUSSION

1. AAP, BAP und HPF1 repräsentieren unterschiedliche Transkriptionsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die mit den charakterisierten Regulationselementen AABS, BABS und HP1 aus den Xenopus-Vitellogenin- (42, 79) und Albumingenen (137) interagieren. Diese DNA-Elemente differieren in ihrer Länge und Fähigkeit, die transkriptionelle Aktivität in Kernextrakten verschiedener Herkunft zu steigern. Während die AABS in vitro die Transkription in Extrakten aus Leber-, nicht aber aus HeLa-Zellen stimuliert (42), also zellspezifisch wirkt, aktiviert die BABS die Transkription in allen getesteten Extrakten. HP1 dagegen weist eine strikte Leberspezifität auf (124, 137). Diese Unterschiede in den Regulationselementen lassen vermuten, daß auch die daran sich bindenden Transkriptionsfaktoren AAP, BAP und HPF1 nicht identisch sind. Die gezeigten Bindungsstudien, Reinigungsdaten ebenso wie die Unterschiede in Bezug auf das Molekulargewicht und die Art der posttranslationalen Modifikation bestätigen diese Hypothese; Tab. 3 faßt diese Merkmale zusammen.

Mit der Identifizierung der Transkriptionsfaktoren und anhand ihrer Unterschiede ist eine spezifische Reinigung der einzelnen Faktoren möglich. Damit ist die Basis geschaffen, in einer cDNA-Bank aus Leber z.B. mit Hilfe von Antikörpern, die diese Proteine erkennen, oder auf Grund von Aminosäureteilsequenzen dieser Proteine nach den faktorkodierenden Genen zu suchen, nach Genen, die am Mechanismus der zellspezifischen Expression beteiligt sind.

Im folgenden werden die einzelnen Transkriptionsfaktoren und deren Unterschiede (Tab. 3) diskutiert sowie auf ihre mögliche Rolle bei der gewebespezifischen Genexpression eingegangen.

Regulationsprotein	mehrere AAP	BAP	HPF1
Bindungsstelle	TGGTGAGGTAATTGTTTACACAACC	GCACAT●●C●C	GT●A●A●T●A●ATTTTC
Molekulargewicht	63 kDa, 51 kDa, 33 kDa, 29 kDa	58 kDa	87 kDa
Modifikation	Glykoprotein (AAP IV)	Phosphoprotein	Glykoprotein
Zelltypspezifität	zellspezifisch	ubiquitär	leberspezifisch
DNA-Bindung in vitro	+	+	+
transkriptioneller Aktivator	+	+	+

Tab. 3: Charakteristika der Transkriptionsfaktoren AAP, BAP und HPF1 aus Rattenleber

Als Erkennungssequenz der AAP ist der Bereich der AABS angegeben, der sowohl in "Bandshift"-Assays als Bindungsstelle eingegrenzt werden konnte (Abb. 1b) als auch in in-vitro-Transkriptionsexperimenten eine ähnlich hohe Aktivität wie die gesamte AABS vermittelt (42). Die entsprechende Bindungsstelle des BAP zeigt die 10 bp Sequenz innerhalb der BABS, die in einem in-vitro-Transkriptionssystem mit Rattenleberkernextrakt ausreicht, die Transkription zu stimulieren. (79). Gekennzeichnet sind ferner die Nukleotide (●), deren Mutation die transkriptionelle Aktivität in vitro zerstört (79). Von den verschiedenen Sequenzen, die als HPF1-Bindungsstelle dienen können (Tab. 2, Tab. 4), ist diejenige aufgeführt, die dem funktionellen HP1 aus dem Xenopus-Albumin-Gen entspricht (137) und in den Bindungsstudien dieser Arbeit verwendet wurde. Die markierten Nukleotide (●) kennzeichnen diejenigen Basen, deren Mutation die transkriptionelle Aktivität fast auf Null reduziert (124). Die weiteren aufgeführten Unterschiede werden im Text diskutiert.

1.1 Mehrere Faktoren erkennen die AABS

Die funktionelle Analyse der 5'-flankierenden Region des *Xenopus*-Vitellogenin-A2-Gens ermöglichte die Identifizierung des aktivierenden DNA-Elements AABS, das zellspezifische Genexpression vermittelt (42). Die hier gezeigten "Bandshift"-Assays (Abb. 1b) zeichnen sich durch eine große Komplexität in der Bandenbildung aus (Komplex I-IV), was bei der Länge des DNA-Elements AABS zu erwarten ist. Dies deutet darauf hin, daß sich mehrere Proteine an die AABS binden. Durch Kompetitions-experimente (Abb. 1b) konnte der Bindungsbereich für die AAP innerhalb der AABS (Position -121 bis -87) auf die Sequenz von Position -121 bis -97 eingegrenzt werden. Daß auch das Oligonukleotid FP2 (von Position -105 bis -87) um Bindung kompetieren kann (Komplex I, Abb. 1b), ist erklärbar, da die Sequenzen der eingesetzten Kompetitor-Oligonukleotide überlappen (Abb. 1a). "Footprint"-Experimente mit einem Vitellogenin-A2-Genkonstrukt (von Position -278 bis -87) bestätigen, daß die AABS mit mehreren Proteinen in Wechselwirkung tritt. Innerhalb der AABS sind folgende Bereiche durch Protein vor DNase-I-Verdau geschützt: von Position -124 bis -117, -112 bis -106 und -102 bis -87 auf dem oberen DNA-Strang sowie von Position -122 bis -109, -107 bis -100 und -98 bis -89 auf dem unteren DNA-Strang (M. Kaling, pers. Mitteilung). Weitere Experimente sind notwendig, um die Frage zu beantworten, welche Proteine sich an welchen Bereich der AABS binden. Dazu gehören u.a. "Bandshift"-Kompetitions-experimente mit kürzeren, nicht überlappenden Oligonukleotiden, "Footprint"-Experimente mit gereinigtem Kernextrakt, "Methylation interference"-Analyse zur Bestimmung mit der Proteinbindung interferierender Purinnukleotide und die Einführung einzelner Punktmutationen, um für Bindung und Funktion wichtige Basen zu identifizieren.

Beim Vergleich der AABS mit anderen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, lassen sich bestimmte Sequenzhomologien feststellen. So besitzt das Element 1 Ähnlichkeit zu einer

Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor C/EBP (72). Um zu überprüfen, ob sich C/EBP an die AABS binden kann, wurde eine heterologe, hochaffine C/EBP-Bindungsstelle (83) als Oligonukleotid eingesetzt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Bindungsstudien beweisen, daß C/EBP aus Rattenleber in der Lage ist, sich an ein Oligonukleotid aus den Elementen 1 und 2 der AABS (A2 I/II) zu binden (Abb. 2b). C/EBP bindet sich also an zwei völlig verschiedene Sequenzen. Dies ist verständlich, da aus der Literatur für C/EBP bekannt ist, daß es sich, zumindest *in vitro*, an unterschiedlichste Sequenzen zu binden vermag, obwohl sie signifikant von seiner optimalen palindromischen Erkennungsstelle abweichen (71, 101). Ferner kann gereinigtes C/EBP-Fusionsprotein (erhalten von Dr. S. L. McKnight, USA) mit dem A2-I/II-Oligonukleotid einen Komplex bilden (Daten hier nicht gezeigt). Schließlich konnte auch durch "Footprint"-Experimente nachgewiesen werden, daß sich gereinigtes C/EBP-Fusionsprotein an ein Vitellogenin-A2-Genfragment (von Position -278 bis -87) im Bereich der AABS binden kann (M. Kaling, pers. Mitteilung). C/EBP erkennt also eindeutig die AABS.

Da ein Teil der AABS (von Position -115 bis -103, Abb. 1a) auch Ähnlichkeit zur HP1-Sequenz aufweist (Abb. 6), ist es möglich, daß der leberspezifische Faktor HPF1 mit der AABS interagiert. Für diese Annahme spricht die effiziente Konkurrenz der Bindung in Komplex IV durch das HP1-Oligonukleotid syn 0 (Abb. 8). Darüberhinaus handelt es sich bei dem Faktor, der an der Bildung von Komplex IV beteiligt ist, wie bei HPF1, um ein glykosyliertes Protein (Abb. 10). Gegen diese Hypothese sprechen funktionelle Analysen: Die HP1-ähnliche Sequenz aus dem Vitellogenin-A2-Gen ist nicht in der Lage, als positives Transkriptionselement zu wirken (42). Es ist aber denkbar, daß HPF1 die AABS erkennt, wobei andere Transkriptionsfaktoren seine Bindung erleichtern (kooperative Bindung) oder stabilisieren. HPF1-Bindung allein reicht aber für die Funktion nicht aus. Das HP1-Oligonukleotid vermag nicht die transkriptionelle Aktivität der AABS *in vitro* zu kompetieren (42). Das würde dafür sprechen, daß HPF1-Bindung für die transkriptionelle Aktivität der AABS nicht nötig ist. Aus diesen Daten ist zu schließen, daß die AABS

oder ein Teil davon kein HP1-Homologes repräsentiert, sondern ein anderes Regulationselement ist.

1.2 BAP, der Faktor, der die BABS erkennt

In der 5'-flankierenden Region des Xenopus-Vitellogenin-B1-Gens konnte ein Promotorsegment (von Position -55 bis -37), BABS, identifiziert werden, das für die transkriptionelle Aktivität verantwortlich ist, die in einem in-vitro-Transkriptionssystem gemessen werden kann (79). In dieser Arbeit gezeigte "Bandshift"-Assays beweisen, daß zwei Proteine aus Rattenleberkernextrakt, BAP und USF/MLTF, spezifisch mit der BABS interagieren. BABS gehört damit zu einer Reihe von DNA-Elementen, die von mehreren Regulationsproteinen erkannt werden (71). Die durchgeführte "Methylation interference"-Analyse erlaubt Aussagen über die Wechselwirkung von BAP mit seiner Bindungsstelle: Auf dem oberen und unteren Strang der BABS interferieren je drei Guaninreste mit der Proteinbindung. Diese Guaninnukleotide stehen in symmetrischem Zusammenhang innerhalb eines unvollständigen Palindroms, dessen Grenzen (Position -53 und -44) von diesen Basen gebildet werden (Abb. 4). Die Bedeutung dieses Ergebnisses wird unterstrichen durch in-vitro-Transkriptionsexperimente, die beweisen, daß von der ursprünglich identifizierten BABS (von Position -55 bis -37) der Bereich von Position -53 bis -44 ausreicht, um die Transkription zu stimulieren (79). Das für die Funktion wichtige Protein bindet also innerhalb dieses kurzen 10 bp DNA-Segments.

Ein Vergleich der BABS-Sequenz mit Erkennungsstellen bekannter Regulationsproteine zeigt eine gewisse Ähnlichkeit zwischen BABS und der USF/MLTF-Bindungsstelle im "adeno major late"-Promotor sowie zu einem DNA-Element im Hepatitis-B-Virus-Enhancer (Tab. 1).

Die Bindungsdaten (Abb. 5, Abb. 12b) weisen nach, daß die BABS mit der USF/MLTF-Bindungsstelle zwar verwandt, aber nicht mit ihr identisch ist (s. auch unten): Das Protein, welches das USF/MLTF-

Oligonukleotid erkennt, kann sich auch an die BABS binden, nicht jedoch BAP sich an das USF/MLTF-Oligonukleotid (Abb. 5). Dies wird bestätigt durch in-vitro-Transkriptionsexperimente, die zeigen, daß die eine Regulationssequenz (USF/MLTF-Bindungsstelle) nicht die transkriptionelle Aktivität der anderen (BABS) kompetieren kann (79).

Das Hepatitis-B-Virus, charakterisiert durch seinen begrenzten Wirtsbereich und strikte Leberspezifität, ist ein DNA-Virus, das akute und chronische Leberkrankheiten verursacht und mit der Entwicklung von Leberkrebs in Verbindung gebracht wird (8, 52). Obwohl vieles über die Struktur, Replikation und den Lebenszyklus des Virus bekannt ist (24, 96), steht die Klärung der genauen Rolle des Hepatitis-B-Virus bei der Entstehung von Leberkrebs noch aus. Daher ist es von besonderem Interesse, Aufschluß über regulatorische Elemente zu gewinnen, die eventuell den Lebenszyklus des Virus kontrollieren und seine Genexpression regulieren. Ben-Levy et al. (6) konnten bereits zeigen, daß eine Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren mit dem HBV-Enhancer interagiert. Interessanterweise befindet sich ein BABS-Element im HBV-Enhancer in unmittelbarer Nähe zu einer NF-I-Bindungsstelle (6), eine vergleichbare Situation, wie sie für das Vitellogenin-B1-Gen berichtet wird (31). Die hier gezeigten "Bandshift"-Kompetitions-experimente (Abb. 5) und in-vitro-Transkriptionsdaten (79) beweisen, daß ein Hepatitis-B-Virus-Oligonukleotid (HBV, Tab. 1) sehr ähnliche, wenn nicht sogar die gleichen Transkriptionsfaktoren wie die äquivalente BABS im Vitellogenin-B1-Gen bindet.

Viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren sind Phospho- oder Glykoproteine (64, 104, Tab. 3). Ihre Funktion kann daher z.B. durch Phosphorylierung-Dephosphorylierung reguliert werden. Phosphatasebehandlung beweist, daß Phosphorylierung von BAP absolut notwendig ist, um an seine Erkennungssequenz binden zu können (Abb. 11). Damit vereinbar ist das Modell, bei dem die Phosphorylierung dazu führt, daß BAP aktiviert wird (Abb. 20).

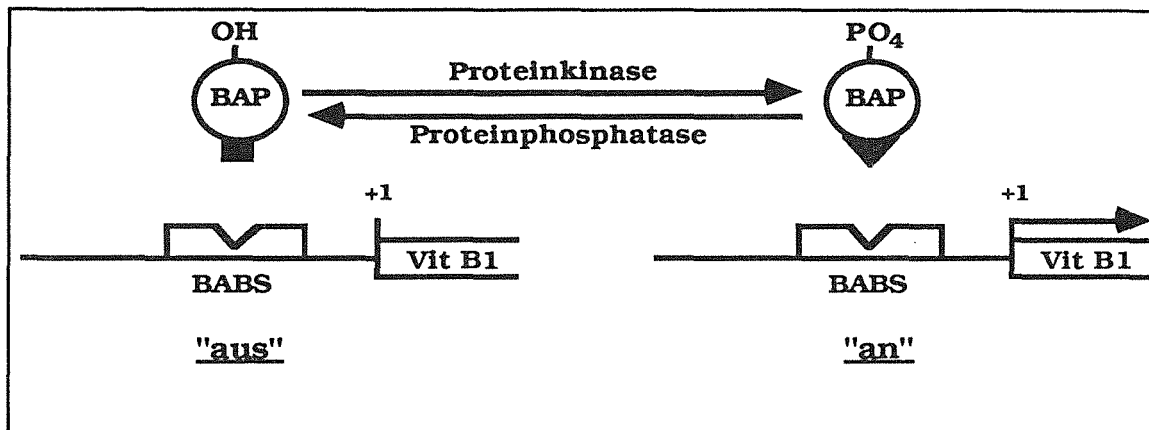


Abb. 20: Modell zur Kontrolle der BAP-Aktivität durch Phosphorylierungs-Dephosphorylierungsvorgänge am Beispiel des Xenopus-Vitellogenin-B1-Gens (Vit B1); in Anlehnung an (112).

Diese Aktivierung versetzt BAP in die Lage, sich an die BABS zu binden. Es kontrolliert damit quasi als "an/aus"-Schalter Gene, die die BABS in ihrem Promotor aufweisen. Diese Vorstellung (wie in Abb. 20 dargestellt) impliziert aber auch das Vorhandensein einer Proteinkinase und einer Proteinphosphatase, die beide BAP-Formen ineinander überführen. Einschränkend muß erwähnt werden, daß es sich bei den hier gezeigten Ergebnissen (Abb. 11) um Bindungsstudien handelt, Bindung aber noch nicht transkriptionell aktiver Faktor bedeutet. Neben BAP wird die DNA-Bindungsaktivität durch Dephosphorylierung auch bei den beiden Transkriptionsfaktoren SRF (11, 121) und CREB (170) zerstört. Ferner sind z.B. auch die beiden Hefepoteine HSF (144) und GAL4 (112) phosphoryliert, aber es ist nicht geklärt, ob DNA-Bindung oder Aktivierung durch diese Modifikation beeinflusst werden.

Ein wesentlicher Schritt für das Verständnis der Regulation der Vitellogeningene ist die Reinigung der Transkriptionsfaktoren, die mit den Promotorelementen dieser Gene interagieren. In dieser Arbeit werden die Eigenschaften des Faktors BAP beschrieben, die seine Reinigung und eindeutige Identifizierung ermöglichen. Rattenleberkernextrakt ist über Q-Sepharose-, Heparin-Sepharose- und sequenzspezifische-DNA-Affinitätssäulenchromatographie fraktioniert worden. Dabei läßt sich zeigen, daß BAP effizient von USF/MLTF abgetrennt werden kann, hauptsächlich durch

Verwendung mehrerer Reinigungsschritte über eine DNA-Affinitätssäule mit der BABS-Sequenz als Ligand (Abb. 18). Mehr als 90% der USF-Bindungsaktivität (Komplex 1 in Abb. 5 und 18) befindet sich nach der 1. DNA-Affinitätssäule in der Durchflußfraktion (Daten hier nicht gezeigt).

Die Evidenz, daß BAP nicht identisch ist mit USF/MLTF, beruht auf den Reinigungsdaten und auf verschiedenen Charakteristika, die BAP von USF/MLTF unterscheiden. Diese Unterschiede umfassen das für BAP bestimmte Molekulargewicht von 58 kDa (Abb. 12b) gegenüber dem in der Literatur für USF/MLTF publizierten Wert von 46 kDa (27). Ferner zeichnet sich BAP durch Hitzelabilität aus (Daten hier nicht gezeigt), während USF/MLTF als äußerst hitzestabil beschrieben wird (133). BAP und USF/MLTF differieren auch in der Notwendigkeit der Phosphorylierung: BAP muß phosphoryliert sein, um sich an DNA binden zu können (Abb. 11), nicht aber USF/MLTF (79). Schließlich zeigt eine "Footprint"-Analyse des Vitellogenin-B1-Promotors, daß Proteinbindung an Element A, das die BABS enthält, nicht durch ein die USF/MLTF-Bindungsstelle enthaltendes Oligonukleotid kompetiert werden kann (31).

1.3 HPF1, ein leberspezifischer Faktor, der das HP1 erkennt

Die Analyse von Deletionsmutanten des Xenopus-Albumingens identifizierte im promotornahen Bereich ein DNA-Element, HP1, das spezifisch in einem in-vitro-Transkriptionssystem mit Rattenleberkernextrakt hohe transkriptionelle Aktivität vermittelt (124, 137). "Bandshift"-Experimente belegen, daß das HP1-Element von einem leberspezifischen Transkriptionsfaktor, HPF1, erkannt wird (Abb. 9b, Tab.3).

Die Resultate dieser Arbeit (Tab. 2, Abb. 7) sowie in-vitro-Transkriptionsexperimente (80) bestätigen zum ersten Mal, daß verschiedene Gene, nämlich das Albumin von Xenopus, das α -Fötoprotein der Maus, das β -Fibrinogen der Ratte und das menschliche α_1 -Antitrypsin, die spezifisch im gleichen Gewebe exprimiert werden, ein gemeinsames, gewebespezifisch wirkendes

Promotorelement enthalten, das vom selben leberspezifischen Transkriptionsfaktor erkannt wird. Beweise, daß der gleiche Faktor an zwei oder mehrere Gene bindet, sind außer der Sequenzhomologie in erster Linie das gleiche Laufverhalten der Komplexe im "Bandshift"-Assay sowie Konkurrenz um Bindung durch synthetische Oligonukleotide, welche die verwandte Bindungssequenz der anderen Gene tragen (Abb. 7). Diese Experimente sprechen für die Annahme, daß verschiedene Gene, die im gleichen Gewebe aktiv sind, gemeinsame DNA-Elemente enthalten, welche den gleichen Transkriptionsfaktor benutzen.

Da man HP1 in diesen verschiedenen leberspezifisch exprimierten Genen findet (Tab. 2, Abb. 7), ist es sehr wahrscheinlich, daß HPF1 identisch ist mit dem zuerst als HNF1 beschriebenen Transkriptionsfaktor, der sich an die HP1-ähnliche Sequenz aus dem β -Fibrinogen-Gen bindet (35). Ebenso dürfte es sich bei den Regulationsproteinen APF und LF-B1, die die entsprechenden homologen Sequenzen aus dem Albuminogen der Ratte (22) und dem menschlichen α_1 -Antitrypsinogen (50) erkennen, um den gleichen Faktor wie HPF1 handeln. Folgende Daten sprechen für diese Identität:

a) Die gezeigte Größe von HPF1, 105 kDa (Abb. 12a), ist in Übereinstimmung mit den Werten, die von anderen Gruppen ebenfalls auf der Basis von "UV cross-link"-Analysen für HNF1, 110 kDa (35), und APF, 100 kDa (22), bestimmt worden sind.

b) Die Reinigung von HNF1, APF und LF-B1 aus Rattenleber ergab auf einem SDS-Polyacrylamidgel für HNF1 ein Molekulargewicht von ≈ 88 kDa (35), für APF 95 kDa (10) und für LF-B1 eine Größe von 45 kDa (50). Die 45 kDa-Form von LF-B1 ist wahrscheinlich das proteolytische, immer noch DNA-Bindungsaktivität enthaltende, Abbauprodukt eines größeren Polypeptids, da eine Gelfiltrationsanalyse zeigt, daß ein 90 kDa Protein für die LF-B1 Bindungsaktivität verantwortlich ist (50). Außerdem liefert die Größenbestimmung, ausgehend von cDNA-Klonen, die für LF-B1 kodieren, nach in vitro Translation, für LF-B1 ein Molekulargewicht von 80 kDa (50). Auch mit HPF1 tritt nach mehreren Reinigungsschritten auf einem

silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel ein Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Abb. 19) auf, das noch Bindungsaktivität zeigt.

c) Wenn HPF1, HNF1, APF und LF-B1 identische Faktoren sind, sollten sie auch gleich modifiziert sein. Die gezeigten Daten beweisen, daß HPF1 ein glykosyliertes Protein ist (Abb. 10), was auch für HNF1 bestätigt werden konnte (88).

Aus diesen Resultaten ist zu schließen, daß die Regulationsproteine HPF1, HNF1, APF und LF-B1 identisch sind. Neueste Experimente, die Isolierung von HNF1-cDNA-Klonen und ein Vergleich der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der von APF und LF-B1 beweisen, daß es sich bei HNF1/APF/LF-B1 um ein und dasselbe Protein handelt (4). Damit ist es gelungen einen Faktor zu charakterisieren, der für die Ausbildung des Leberphänotyps eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

2. Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der gewebespezifischen Genexpression

Viele der spezialisierten Leberfunktionen werden hervorgerufen durch Produkte von Genen, die nur in der Leber aktiv sind. Experimente der letzten Jahre haben gezeigt, daß diese transkriptionelle Selektivität auf der Anwesenheit von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren beruht (38). Einige dieser Proteine konnten in in-vitro-Transkriptionssystemen identifiziert, gereinigt und die für sie kodierenden Gene kloniert werden (38).

Die Vitellogeningene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden gewebespezifisch in der Leber durch Östrogen induziert (159). Das schließt die Möglichkeit ein, daß die identifizierten Regulations-elemente AABS (42) und BABS (79) die Erkennungssequenz für einen leberspezifischen Transkriptionsfaktor tragen.

So konnte gezeigt werden, daß mit Ausnahme der Nichtleberzelllinie MCF7 die Funktion der AABS auf Leberzellen

beschränkt ist (42). "Bandshift"-Experimente bestätigen ferner, daß sich die Transkriptionsfaktoren C/EBP und HPF1 an die AABS binden (Abb. 2b, Abb. 8). Da die HP1-ähnliche Sequenz innerhalb der AABS für sich alleine nicht funktionell ist (42), liegt es auf der Hand, daß andere, noch nicht identifizierte Faktoren oder das Zusammenspiel mehrerer Proteine, z.B. C/EBP und HPF1, für die leberspezifische Expression des Vitellogenin-A2-Gens verantwortlich sind.

Bei der BABS deuten die Versuchsergebnisse nicht auf eine gewebespezifische Verteilung des bindenden Faktors BAP hin: BAP-Bindungsaktivität läßt sich in allen getesteten Kernextrakten aus Leber- und Nichtleberzellen nachweisen (Abb. 9a). Auch in in-vitro-Transkriptionsexperimenten vermittelt BAP in allen eingesetzten Extrakten die transkriptionelle Aktivität (M. Kaling, pers. Mitteilung). BAP könnte aber auch die leberspezifische, modifizierte Form von USF/MLTF sein, unterschiedlich z.B. im Phosphorylierungsstatus (79). Die gemessene transkriptionelle Aktivität in Nichtleberzellen könnte daher von USF/MLTF hervorgerufen worden sein. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, daß USF/MLTF mit Genen interagiert, die stark gewebespezifisch oder entwicklungspezifisch reguliert sind, obwohl die Verteilung von USF/MLTF ubiquitär zu sein scheint (20, 28, 62). Bekannt sind Fälle, in denen gewebespezifische und ubiquitäre Faktoren identische Sequenzen erkennen, z.B. NF-I und Ψ NF-I im Albumingen (89, 38) und die Oktamerproteine in den Immunglobulingenen (138). Alternativ können natürlich auch zwei verschiedene Proteine, BAP und USF, existieren, die die gleiche Sequenz erkennen. Da im 5'-flankierenden Bereich des Xenopus-Vitellogenin-B1-Gens mehrere positiv und negativ wirkende DNA-Elemente identifiziert werden konnten (31), ist es wahrscheinlich, daß die offensichtliche Leberspezifität des B1-Gens durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren erzielt wird, die allerdings für sich alleine betrachtet in ihrem Vorkommen nicht auf die Leber beschränkt sind. Daher ist es unabdingbar, den Faktor BAP aus der Leber zu reinigen und die entsprechende cDNA zu klonieren. Erst dann wird es möglich sein

zu entscheiden, ob es sich bei BAP um einen ubiquitären oder leberspezifischen Transkriptionsfaktor handelt. Mit dem gleichen experimentellen Ansatz konnte nachgewiesen werden, daß sich an das Oktamerelement in den Immunglobulinen ein ubiquitärer (Oct-1) und ein primär in lymphoiden Zellen existierender Transkriptionsfaktor (Oct-2) bindet (110, 149, 29, 135, 18).

Die leberspezifische Expression des Xenopus-Albumin-Gens kann in einem in-vitro-Transkriptionssystem mit Rattenleberkernextrakt nachvollzogen werden. Dafür sind nur zwei Regulationselemente notwendig: Die TATA-Box und HP1 (124). Dies steht in krassem Gegensatz zu den komplexen Promotoren der Albumingene aus Maus und Ratte, die eine Vielzahl von DNA-Elementen und Bindungsproteinen aufweisen, die untereinander interagieren müssen, um höchste Transkriptionsaktivität zu zeigen (89, 92, 22, 66, 67). Bei Xenopus dagegen sind Sequenzen oberhalb von HP1 entbehrlich für die Transkription des Albumingens (124). Für diese offensichtliche Diskrepanz ist in erster Linie ein methodisches Artefakt verantwortlich. Das Xenopus-HP1 weist im Gegensatz zum proximalen Element (PE) der Ratte (22, 152) und zum Element B der Maus (88, 89), die beide zu HP1 ähnliche Elemente enthalten, keine dam-Methylierungsstelle, GATC auf. Diese führt, wenn methyliert, beim Albumingen der Ratte und Maus zu einer verminderten Affinität des Transkriptionsfaktors an dieses Element (88, 92, 152). Deshalb sind kooperative Interaktionen mit den Proteinen, die an die anderen cis-Elemente binden notwendig, um die Bindung des Faktors zu stabilisieren und maximale Promotoraktivität zu erzielen. Die Methylierung dieses DNA-Elements hatte in früheren Experimenten zur Folge, daß in Konstrukten mit der proximalen, HP1 enthaltenden Promotorregion des Maus-Albumingens die HP1 vermittelte Aktivität nur äußerst schwach ausgeprägt war (56). Inzwischen konnte gezeigt werden, daß in dam⁻-E.-coli-Stämmen (hier ist GATC nicht methyliert) eine einzelne APF-Bindungsstelle, die HP1 entspricht, oberhalb einer TATA-Box effiziente und gewebespezifische Transkription in einem transienten Expressionsassay vermittelt (152). Diese Ergebnisse

bestätigen also die Daten mit dem HP1-Element aus dem Xenopus-Albuminpromotor und der TATA-Box in einem heterologen Zellsystem (124). Offen ist noch die Frage, ob es oberhalb des Xenopus-HP1 noch zusätzliche Regulationselemente gibt und wenn ja, ob sie in Säugerzellen funktionell sind. Für eine solche Existenz spricht eine hohe Sequenzhomologie im 5'-flankierenden Bereich der beiden Xenopus-Albumingene (136). Sie könnten eine untergeordnete Rolle bei der leberspezifischen Genexpression spielen, d.h. diese Elemente hätten eher modulatorische Aufgaben zu erfüllen. Sie könnten z.B. die HPF1-Bindung verstärken unter Bedingungen, wo dessen verfügbare Konzentration zu gering ist.

Obwohl HPF1 transkriptionelle Aktivität ausschließlich in Leberzellen vermittelt (124, 137), ist es trotzdem möglich, daß HPF1 in inaktiver Form auch in anderen Geweben vorliegt. Für die Blockierung seiner Aktivität könnte eine fehlende posttranslationale Modifikation (z.B. Glykosylierung, was auch für den Faktor Sp 1 vorgeschlagen wurde, 69) oder die Assoziation mit einem Inhibitormolekül (wie z.B. bei NF- κ B, 87) verantwortlich sein. Schließlich bestünde auch die Möglichkeit einer negativen Kontrolle, d.h. die Bindung eines Repressors an ein negativ regulierendes Element ist verantwortlich für die Inaktivität in bestimmten Zelltypen oder auf bestimmten Entwicklungsstufen. Negative Elemente sind bisher in einer Reihe von Genen entdeckt worden, z.B. im Gen für das Retinol-Bindungsprotein, RBP, (30), im Albumingen des Menschen (49) und im α -Fötoproteingen (108). Bekannt ist, daß im adulten Tier keine α -Fötoprotein-Synthese stattfindet (116, 150), obwohl das dafür kodierende Gen ein HP1-Element enthält (Tab. 2, Abb. 7). Es muß also noch etwas anderes daran beteiligt sein, was verhindert, daß das α -Fötoproteingen aktiv ist. Inzwischen konnte auch nachgewiesen werden, daß, im Gegensatz zu früheren Bindungs-, und mRNA-Studien (36, 50), das HNF1-Gen in weitaus mehr Geweben als nur in der Leber exprimiert wird. Man findet ähnliche HNF1-mRNA-Mengen in Leber und Niere, wesentlich weniger auch im Darm, der Milz und im Thymus (4). Die Niere enthält nicht nur HNF1-mRNA, sondern synthetisiert wie die

Leber auch das HNF1-Protein (4). Dieses ist zwar in beiden Geweben transkriptionell aktiv (4), allerdings in der Niere zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz (ca. 10%) als in der Leber.

3. Regulationselemente und Transkriptionsfaktoren, die im Verlauf der Evolution erhalten geblieben sind

Experimente unterschiedlichster Art machen immer deutlicher, daß der Mechanismus der Transkription und damit auch der beteiligten cis-Elemente und trans-Faktoren innerhalb der Eukaryonten bemerkenswert konserviert worden ist (148). Das gilt auch für die aus Froschgenen stammenden Regulationselemente AABS, BABS und HP1, da sie in verschiedenen Säugerzellen funktionell sind (42, 79, 137).

Für die BABS zeigen die Experimente, daß sie außer von BAP auch von dem Transkriptionsfaktor USF/MLTF erkannt wird (Abb. 5, Abb. 18). Da Erkennungssequenzen für USF/MLTF auch in zellulären Genen entdeckt wurden, z.B. im Metallothionein-I-Gen der Maus (20), im γ -Fibrinogen-Gen der Ratte (28, 107), im Xenopus-Gen, das für TFIIA kodiert (62, 139), in Genen der Hefe (12,26), ja sogar in pflanzlichen Genen (145), ist es möglich, daß einige dieser Elemente auch von BAP erkannt werden können. Die Tatsache, daß eine Sequenz und die korrespondierende Faktorfamilie in Zellen von der Hefe über Pflanzen bis zu den Säugern vorkommt, deutet darauf hin, daß das cis-Element und die entsprechenden Transkriptionsfaktoren über einen sehr langen Zeitraum hinweg konserviert

Tab. 4: Ein mehreren leberspezifisch exprimierten Genen gemeinsames DNA-Motiv wird von HPF1 erkannt

Gezeigt wird die 13bp-Sequenz aus verschiedenen Promotoren und Enhancern, die maximale Homologie zum funktionellen HP1-Element aus dem Xenopus-68kDa-Albumin-Gen aufweist. Funktionelle Daten für die Sequenz aus dem Huhn sind bis jetzt noch nicht publiziert. N bezeichnet eines der vier möglichen Nukleotide A, G, C oder T. Die Zahlen in der möglichen Konsensussequenz geben an, wie oft das entsprechende Nukleotid in den aufgelisteten 22 Sequenzen an dieser Position steht. Die Pfeile markieren das Palindrom. Die Positionen der einzelnen Elemente stammen aus den angegebenen Referenzen.

ALBUMIN				
Mensch	-356	GTTAGTAATTACT	-344	(49)
Mensch	-64	GTTAATAATCTAC	-52	(130)
Ratte	-59	GTTAATGATCTAC	-47	(22)
Maus	-64	GTTAATGATCTAC	-52	(56)
Huhn	-63	GGTAATGTTTTAC	-51	(59)
Xenopus	-65	GTTAATAATTTTC	-53	(137)
α-Fötoprotein				
Mensch	-58	GTTACTAGTTAAC	-46	(127)
Ratte	-127	GTTAATTATTGGC	-115	(35)
Ratte	-61	GTTACTAGTTAAC	-49	(74)
Maus	-62	GTTACTAGTTAAC	-50	(48)
α₁-Antitrypsin				
Mensch	-75	GTTAATATTCACC	-63	(63)
Maus	-75	GTTAATATTCACT	-63	(57)
β-Fibrinogen				
Mensch	-77	GTTAATATTTAAT	-89	(35)
Ratte	-84	GTTAATATTTGAC	-96	(36)
α-Fibrinogen				
Ratte	-47	GTTAATCATCACC	-59	(36)
Transthyretin				
Mensch	-128	GTTACTTATTCTC	-116	(35)
Ratte	-128	GTTACTTATTCTC	-116	(35)
Maus	-130	GTTACTTATTCTC	-118	(33)
Pyruvatkinase L-Typ				
Ratte	-89	GTTATACTTTAAC	-77	(155)
Aldolase B				
Ratte	-118	GTTATTGAATAAA	-106	(153)
Haptoglobin				
Mensch	-143	GTTAAGAGTTGAG	-155	(115)
Hepatitis B Virus				
	-86	GTTAATCATTACT	-74	(23)
Konsensus		G₂₂T₂₁T₂₂A₂₂A₁₃T₂₀N A₁₂T₂₁T₁₆A₁₁A₁₂C₁₆		

worden sind. Neben BAP und USF/MLTF gibt es weitere konservierte Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls identische Sequenzen erkennen: Das Hefeprotein GCN4 und das jun-Onkoprotein aus Vertebraten (147, 157) sowie das Hefeprotein PHO2 und das engrailed-Protein aus *Drosophila* (16).

Das Faktum, daß das Regulationselement HP1 aus einem Froschgen stammt und in Säugerzellen unterschiedlichen Ursprungs (Maus, Ratte, Mensch) aktiv ist (137), beweist, daß es ebenfalls im Verlauf der Evolution, mindestens innerhalb der Vertebraten, erhalten geblieben ist und damit eine bestimmte physiologische Relevanz besitzt. Diese Aussage wird gestützt durch den Befund, daß HP1-ähnliche Sequenzen in den Promotorregionen einer ganzen Reihe von leberspezifisch exprimierten Genen existieren. Dabei handelt es sich um Bereiche, die für die gewebespezifische Expression dieser Gene von Bedeutung sind (Tab. 4, mit Ref.). Die in Tab. 4 aufgelisteten Sequenzen führen zu folgender möglicher Konsensussequenz (aus 22 Sequenzen) für HPF1/HNF1/APF/LF-B1: GTTAATNATTAAC. Die palindromische Struktur dieser Sequenz impliziert, daß sich HPF1 als Dimer bindet, wie es u.a. auch für die Steroidhormonrezeptoren gezeigt ist (46). Diese Hypothese ist kompatibel mit publizierten Daten, die nachweisen, daß sich LF-B1 als Dimer an seine Erkennungsstelle bindet (50). Das bei *Xenopus* identifizierte System (HP1/HPF1) weist darauf hin, daß es eine Schlüsselfunktion bei der Leberdifferenzierung ausübt: Vergleicht man die diversen Regulationssequenzen des Albumingens von Mensch, Ratte, Maus und *Xenopus*, ist das HP1-Element zusammen mit der TATA-Box das einzige Albumin-Promotorelement, das vom Frosch bis zum Menschen hin erhalten geblieben ist (137). Beide Elemente reichen aus, um leberspezifische Transkription beim Albumingen aus *Xenopus* (124), Maus (92, 124) und Ratte (152) zu vermitteln, während den anderen cis-Elementen modulatorische Funktionen zukommen. Mutationsanalysen haben nachgewiesen, daß Mutationen innerhalb des HP1-Elements die Affinität des bindenden Faktors herabsetzen und die transkriptionelle Aktivität fast auf Null

reduzieren (22, 67, 92, 124). Schließlich ist HPF1/HNF1/APF/LF-B1 das Regulationsprotein mit der größten Leberspezifität (22, 36, 80).

Neben den hier beschriebenen Regulationssystemen für leberspezifische Genregulation kennt man weitere Systeme, deren Konservierung ihre zentrale Rolle unterstreicht: Die Antwort auf Hitzeschock (117, 118), die Östrogenregulation (77) und die Reaktion auf Serum (105). Auch Hefe-Aktivatorproteine sind in vielen eukaryontischen Organismen funktionell, umgekehrt vermitteln Faktoren aus Vertebraten transkriptionelle Aktivität in Hefezellen (58). Das gleiche gilt für die TATA-Box-bindenden Faktoren (15, 21).

All diese Befunde deuten darauf hin, daß die grundlegenden Mechanismen der Transkription, insbesondere die der Initiation, schon früh in der Entwicklung der Eukaryonten vorhanden waren.

Literaturverzeichnis

1. **Atchison, M.L. (1988)**
Enhancers: Mechanisms of action and cell specificity *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 127-153
2. **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
3. **Barberis, A., Superti-Furga, G., and Busslinger, M. (1987)**
Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter *Cell* 50, 347-359
4. **Baumhueter, S., Mendel, D.B., Conley, P.B., Kuo, C.J., Turk, C., Graves, M.K., Edwards, C.A., Courtois, G., and Crabtree, G.R. (1990)**
HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF *Genes & Development* 4, 372-379
5. **Beckmann, H., Su, L.K., and Kadesch, T. (1990)**
TFE3: A helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer μ E3 motif *Genes & Development* 4, 167-179
6. **Ben-Levy, R., Faktor, O., Berger, I., and Shaul, Y. (1989)**
Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer *Mol. Cell. Biol.* 9, 1804-1809
7. **Berg, J.M. (1986)**
Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins *Science* 232, 485-487
8. **Blum, H.E., Gerok, W., and Vyas, G.N. (1989)**
The molecular biology of hepatitis B virus *TIG* 5, 154-158
9. **Blume, J.E., Nielsen, D.A., and Shapiro, D.J. (1987)**
Estrogen regulation of vitellogenin mRNA stability in: *UCLA Symposia on molecular and cellular biology New Series, Vol. 52, Granner, D., Rosenfeld, M.G., and Chang, S. (eds.) "Transcriptional control mechanisms", pp. 259-274, Alan R. Liss Inc., New York*
10. **Blumenfeld, M., Tronche, F., Chouard, T., Bach, I., Rollier, A., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1989)**
Transcriptional control of hepatic albumin synthesis in: *Proteins in the regulation of hepatic genes (abstracts of invited lectures), Falk Symposium No. 55, Basel, October 15-17*
11. **Boxer, L.M., Prywes, R., Roeder, R.G., and Kedes, L. (1989)**
The sarcomeric actin CARG-binding factor is indistinguishable from the c-fos serum response factor *Mol. Cell. Biol.* 9, 515-522

12. **Bram, R.J., and Kornberg, R.D. (1987)**
Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* centromere DNA-binding protein, its human homolog, and its possible role as a transcription factor *Mol. Cell. Biol.* 7, 403-409
13. **Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P., and Tjian, R. (1986)**
Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1 *Science* 234, 47-52
14. **Brock, M.L., and Shapiro, D.J. (1983)**
Estrogen regulates the absolute rate of transcription of the *Xenopus laevis* vitellogenin genes *J. Biol. Chem.* 258, 5449-5455
15. **Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A., and Guarente, L. (1988)**
Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system *Nature* 334, 37-42
16. **Bürglin, T.R. (1988)**
The yeast regulatory gene PHO2 encodes a homeo box *Cell* 53, 339-340
17. **Busch, S.J., Sassone-Corsi, P. (1990)**
Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains *TIG* 6, 36-40
18. **Calame, K.L. (1989)**
Immunoglobulin gene transcription: molecular mechanisms *TIG* 5, 395-399
19. **Carthew, R.W., Chodosh, L.A., and Sharp, P.A. (1985)**
An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter *Cell* 43, 439-448
20. **Carthew, R.W., Chodosh, L.A., and Sharp, P.A. (1987)**
The major late transcription factor binds to and activates the mouse metallothionein I promoter *Genes & Development* 1, 973-980
21. **Cavallini, B., Huet, J., Plassat, J.L., Sentenac, A., Egly, J.M., and Chambon, P. (1988)**
A yeast activity can substitute for the HeLa TATA box factor *Nature* 334, 77-80
22. **Cereghini, S., Blumenfeld, M., and Yaniv, M. (1988)**
A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells *Genes & Development* 2, 957-974
23. **Chang, H.K., Wang, B.Y., Yuh, C.H., Wei, C.L., and Ting, L.P. (1989)**
A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus *Mol. Cell. Biol.* 9, 5189-5197
24. **Chisari, F.V., Ferrari, C., and Mondelli, M.U. (1989)**
Hepatitis B virus structure and biology *Microbial Pathology* 6, 311-325

25. **Chodosh, L.A., Baldwin, A.S., Carthew, R.W., and Sharp, P.A. (1988)**
Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits
Cell 53, 11-24
26. **Chodosh, L.A., Buratowski, S., and Sharp, P.A. (1989)**
A yeast protein possesses the DNA-binding properties of the adenovirus major late transcription factor
Mol. Cell. Biol. 9, 820-822
27. **Chodosh, L.A., Carthew, R.W., and Sharp, P.A. (1986)**
A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor
Mol. Cell. Biol. 6, 4723-4733
28. **Chodosh, L.A., Carthew, R.W., Morgan, J.G., Crabtree, G.R., and Sharp, P.A. (1987)**
The adenovirus major late transcription factor activates the rat gamma-fibrinogen promoter
Science 238, 684-688
29. **Clerc, R.G., Corcoran, L.M., LeBowitz, J.H., Baltimore, D., and Sharp, P.A. (1988)**
The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains
Genes & Development 2, 1570-1581
30. **Colantuoni, V., Pirozzi, A., Blance, C., and Cortese, R. (1987)**
Negative control of liver-specific gene expression: cloned human retinol-binding protein gene is repressed in HeLa cells
EMBO J. 6, 631-636
31. **Corthésy, B., Cardinaux, J.R., Claret, F.X., and Wahli, W. (1989)**
A nuclear factor I-like activity and a liver-specific repressor govern estrogen-regulated in vitro transcription from the *Xenopus laevis* vitellogenin B1 promoter
Mol. Cell. Biol. 9, 5548-5562
32. **Costa, R.H., Grayson, D.R., Xanthopoulos, K.G., and Darnell, J.E., Jr. (1988)**
A liver-specific DNA-binding protein recognizes multiple nucleotide sites in regulatory regions of transthyretin, alpha-1-antitrypsin, albumin, and simian virus 40 genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3840-3844
33. **Costa, R.H., Lai, E., and Darnell, J.E., Jr. (1986)**
Transcriptional control of the mouse prealbumin (Transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific
Mol. Cell. Biol. 6, 4697-4708
34. **Courey, A.J., and Tjian, R. (1988)**
Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif
Cell 55, 887-898
35. **Courtois, G., Baumhueter, S., and Crabtree, G.R. (1988)**
Purified hepatocyte nuclear factor I interacts with a family of hepatocyte-specific promoters
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7937-7941

36. **Courtois, G., Morgan, J.G., Campbell, L.A., Fourel, G., and Crabtree, G.R. (1987)**
Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha-1-antitrypsin promoters *Science* 238, 688-692
37. **Curran, T., and Franza, B.R., Jr. (1989)**
Fos and Jun: The AP-1 connection *Cell* 55, 395-397
38. **De Simone, V., and Cortese, R. (1989)**
The transcriptional regulation of liver-specific gene expression in: *Oxford Surv. Eukar. Genes, Vol. 6* (Macleay, N., ed.), pp. 51-90, Oxford University Press, Oxford, U.K.
39. **De Simone, V., Ciliberto, G., Hardon, E., Paonessa, G., Palla, F., Lundberg, L., and Cortese, R. (1987)**
Cis- and trans-acting elements responsible for the cell-specific expression of the human alpha-1-antitrypsin gene *EMBO J.* 6, 2759-2766
40. **Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. (1983)**
Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei *Nucleic Acids Res.* 11, 1475-1489
41. **Distel, R.J., Ro, H.S., Rosen, B.S., Groves, D.L., and Spiegelman, B.M. (1987)**
Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos *Cell* 49, 835-844
42. **Döbbeling, U., Roß, K., Klein-Hitpaß, L., Morley, C., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1988)**
A cell-specific activator in the Xenopus A2 vitellogenin gene: promoter elements functioning with rat liver nuclear extract *EMBO J.* 7, 2495-2501
43. **Dorn, A., Bollekens, J., Staub, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1987)**
A multiplicity of CCAAT box-binding proteins *Cell* 50, 863-872
44. **Dynan, W.S. (1989)**
Modularity in promoters and enhancers *Cell* 58, 1-4
45. **Engels, J.W. und Uhlmann, E. (1989)**
Gensynthese *Angew. Chem.* 101, 733-752
46. **Evans, R.M. (1988)**
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily *Science* 240, 889-895
47. **Evans, R.M., and Hollenberg, S.M. (1988)**
Zinc fingers: gilt by association *Cell* 52, 1-3
48. **Feuerman, M.H., Godbout, R., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1989)**
Tissue-specific transcription of the mouse alpha-fetoprotein gene promoter is dependent on HNF-1 *Mol. Cell. Biol.* 9, 4204-4212

49. **Frain, M., Hardon, E., Ciliberto, G., and Sala-Trepat, J.M. (1990)**
Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer *Mol. Cell. Biol.* 10, 991-999
50. **Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stämpfli, S., Frank, R., and Cortese, R. (1989)**
The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain *Cell* 59, 145-157
51. **Galas, D.J., and Schmitz, A. (1978)**
DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity *Nucleic Acids Res.* 5, 3157-3170
52. **Ganem, D., and Varmus, H.E. (1987)**
The molecular biology of the hepatitis B viruses *Ann. Rev. Biochem.* 56, 651-693
53. **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 *Nucleic Acids Res.* 9, 3047-3060
54. **Gerber-Huber, S., May, F.E.B., Westley, B.R., Felber, B.K., Hosbach, H.A., Andres, A.C., and Ryffel, G.U. (1983)**
In contrast to other Xenopus genes the estrogen-inducible vitellogenin genes are expressed when totally methylated *Cell* 33, 43-51
55. **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
56. **Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986)**
Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter *Cell* 47, 767-776
57. **Grayson, D.R., Costa, R.H., Xanthopoulos, K.G., and Darnell, J.E., Jr. (1988)**
A cell-specific enhancer of the mouse alpha-1-antitrypsin gene has multiple functional regions and corresponding protein-binding sites *Mol. Cell. Biol.* 8, 1055-1066
58. **Guarente, L. (1988)**
UASs and enhancers: common mechanisms of transcriptional activation in yeast and mammals *Cell* 52, 303-305
59. **Haché, R.J.G., Wiskocil, R., Vasa, M., Roy, R.N., Lau, P.C.K., and Deeley, R.G. (1983)**
The 5' noncoding and flanking regions of the avian very low density apolipoprotein II and serum albumin genes *J. Biol. Chem.* 258, 4556-4564

60. **Hager, D.A., and Burgess, R.R. (1980)**
Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes *Anal. Biochem.* 109, 76-86
61. **Hahn, S., and Guarente, L. (1988)**
Yeast HAP2 and HAP3: transcriptional activators in a heteromeric complex *Science* 240, 317-321
62. **Hall, R.K., and Taylor, W.L. (1989)**
Transcription factor IIIA gene expression in *Xenopus* oocytes utilizes a transcription factor similar to the major late transcription factor *Mol. Cell. Biol.* 9, 5003-5011
63. **Hardon, E.M., Frain, M., Paonessa, G., and Cortese, R. (1988)**
Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes *EMBO J.* 7, 1711-1719
64. **Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., and Kelly, W.G. (1989)**
Glycosylation in the nucleus and cytoplasm *Ann. Rev. Biochem.* 58, 841-874
65. **Hatamochi, A., Golumbek, P.T., Van Schaftingen, E., and de Crombrughe, B. (1988)**
A CCAAT DNA binding factor consisting of two different components that are both required for DNA binding *J. Biol. Chem.* 263, 5940-5947
66. **Herbomel, P., and Yaniv, M. (1989)**
The regulation of albumin gene expression in mammals in: *Tissue Specific Gene Expression*, Renkawitz, R. (ed.), pp. 165-184, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, F.R.G.
67. **Herbomel, P., Rollier, A., Tronche, F., Ott, M.O., Yaniv, M., and Weiss, M.C. (1989)**
The rat albumin promoter is composed of six distinct positive elements within 130 nucleotides *Mol. Cell. Biol.* 9, 4750-4758
68. **Huber, S., Ryffel, G.U., and Weber, R. (1979)**
Thyroid hormone induces competence for estrogen-dependent vitellogenin synthesis in developing *Xenopus laevis* liver *Nature* 278, 65-67
69. **Jackson, S.P., and Tjian, R. (1988)**
O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation *Cell* 55, 125-133
70. **Jackson, S.P., and Tjian, R. (1989)**
Purification and analysis of RNA polymerase II transcription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1781-1785
71. **Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1989)**
Eukaryotic transcriptional regulatory proteins *Ann. Rev. Biochem.* 58, 799-839

72. **Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J., and McKnight, S.L. (1987)**
Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses *Genes & Development* 1, 133-146
73. **Jones, N.C., Rigby, P.W.J., and Ziff, E.B. (1988)**
Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses *Genes & Development* 2, 267-281
74. **Jose-Estanyol, M., and Danan, J.L. (1988)**
A liver-specific factor and nuclear factor I bind to the rat alpha-fetoprotein promoter *J. Biol. Chem.* 263, 10865-10871
75. **Kadonaga, J.T., and Tjian, R. (1986)**
Affinity purification of sequence specific DNA binding proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5889-5893
76. **Kazmaier, M., Brüning, E., and Ryffel, G.U. (1985)**
Post-transcriptional regulation of albumin gene expression in *Xenopus* liver *EMBO J.* 4, 1261-1266
77. **Klein-Hitpaß, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1986)**
An estrogen-responsive element derived from the 5'-flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells *Cell* 46, 1053-1061
78. **Klug, A., and Rhodes, D. (1987)**
'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition *TIBS* 12, 464-469
79. **Kugler, W., Kaling, M., Roß, K., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1990)**
BAP, a rat liver protein that activates transcription through a promoter element with similarity to the USF/MLTF binding site *Mol. Cell. Biol.*, submitted
80. **Kugler, W., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1988)**
Tissue-specificity of liver gene expression: a common liver-specific promoter element *Nucleic Acids Res.* 16, 3165-3174
81. **Kuwabara, M.D., and Sigman, D.S. (1987)**
Footprinting DNA-protein complexes in situ following gel retardation assays using 1,10-phenanthroline-copper ion: *Escherichia coli* RNA polymerase-lac promoter complexes *Biochemistry* 26, 7234-7238
82. **Laemmli, U.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685
83. **Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J., and McKnight, S.L. (1988)**
Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP *Genes & Development* 2, 786-800
84. **Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988)**
The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins *Science* 240, 1759-1764

85. **Laughon, A., and Scott, M.P. (1984)**
Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins *Nature* 310, 25-31
86. **Leblond-Francillard, M., Dreyfus, M., and Rougeon, F. (1987)**
Isolation of DNA-Protein complexes based on streptavidin and biotin interaction *Eur. J. Biochem.* 166, 351-355
87. **Lenardo, M.J., and Baltimore, D. (1989)**
NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control *Cell* 58, 227-229
88. **Lichtsteiner, S., and Schibler, U. (1989)**
A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene *Cell* 57, 1179-1187
89. **Lichtsteiner, S., Wuarin, J., and Schibler, U. (1987)**
The interplay of DNA-binding proteins on the promoter of the mouse albumin gene *Cell* 51, 963-973
90. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951)**
Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
91. **Lucero, M.A., Schaeffer, E., Cohen, G.N., and Zakin, M.M. (1986)**
The 5'-region of the human transferrin gene: structure and potential regulatory sites *Nucleic Acids Res.* 14, 8692
92. **Maire, P., Wuarin, J., and Schibler, U. (1989)**
The role of cis-acting promoter elements in tissue-specific albumin gene expression *Science* 244, 343-346
93. **Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982)**
Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory
94. **Maniatis, T., Goodbourn, S., and Fisher, J.A. (1987)**
Regulation of inducible and tissue-specific expression *Science* 236, 1237-1245
95. **Marriott, S.J., and Brady, J.N. (1989)**
Enhancer function in viral and cellular gene regulation *Biochim. Biophys. Acta* 989, 97-110
96. **Mason, W.S., and Taylor, J.M. (1989)**
Experimental systems for the study of hepadnavirus and hepatitis delta virus infections *Hepatology* 9, 635-645
97. **Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980)**
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages in: *Methods Enzymol.* Vol. 65 (Grossman, L., Moldave, K., eds.), pp. 499-560, Academic Press, London, New York
98. **May, F.E.B., Ryffel, G.U., Weber, R., and Westley, B.R. (1982)**
Estrogen dramatically decreases albumin mRNA levels and albumin synthesis in *Xenopus laevis* liver *J. Biol. Chem.* 257, 13919-13923

99. **May, F.E.B., Westley, B.R., Wyler, T., and Weber, R. (1983)**
Structure and evolution of the *Xenopus laevis* albumin genes *J. Mol. Biol.* 168, 229-249
100. **McCormack, K., Campanelli, J.T., Ramaswami, M., Mathew, M.K., Tanouye, M.A., White, M.K., and Weber, M.J. (1989)**
Leucine-zipper motif update *Nature* 340, 103-104
101. **McKnight, S.L., Lane, M.D., and Gluecksohn-Waelsch, S. (1989)**
Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism? *Genes & Development* 3, 2021-2024
102. **Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J., and Tjian, R. (1989)**
The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain *Cell* 58, 741-753
103. **Miller, J., McLachlan, A.D., and Klug, A. (1985)**
Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes *EMBO J.* 4, 1609-1614
104. **Mitchell, P.J., and Tjian, R. (1989)**
Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific binding proteins *Science* 245, 371-378
105. **Mohun, T., Garrett, N., and Treisman, R. (1987)**
Xenopus cytoskeletal actin and human c-fos gene promoters share a conserved protein binding site *EMBO J.* 6, 667-673
106. **Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.I., Kapler, G., Payvar, F., and Goodman, H. M. (1985)**
The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 699-702
107. **Morgan, J.G., Courtois, G., Fourel, G., Chodosh, L.A., Campbell, L., Evans, E., and Crabtree, G.R. (1988)**
Sp1, a CAAT-binding factor, and the adenovirus major late promoter transcription factor interact with functional regions of the gamma-fibrinogen promoter *Mol. Cell. Biol.* 8, 2628-2637
108. **Muglia, L., and Rothman-Denes, L.B. (1986)**
Cell type-specific negative regulatory element in the control region of the rat alpha-fetoprotein gene *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7653-7657
109. **Müller, M.M., Gerster, T., and Schaffner, W. (1988)**
Enhancer sequences and the regulation of gene transcription *Eur. J. Biochem.* 176, 485-495
110. **Müller, M.M., Ruppert, S., Schaffner, W., and Matthias, P. (1988)**
A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells *Nature* 336, 544-551

111. **Murre, C., Schonleber McCaw, P., and Baltimore, D. (1989)**
A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, Myo D, and myc proteins *Cell* 56, 777-783
112. **Mylin, L.M., Bhat, J.P., and Hopper, J.E. (1989)**
Regulated phosphorylation and dephosphorylation of GAL4, a transcriptional activator *Genes & Development* 3, 1157-1165
113. **Nagata, Y., and Burger, M.M. (1974)**
Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding *J. Biol. Chem.* 249, 3116-3122
114. **O'Shea, E.K., Rutkowski, R., and Kim, P.S. (1989)**
Evidence that the leucine zipper is a coiled coil *Science* 234, 538-542
115. **Oliviero, S., Morrone, G., and Cortese, R. (1987)**
The human haptoglobin gene: transcriptional regulation during development and acute phase induction *EMBO J.* 6, 1905-1912
116. **Panduro, A., Shalaby, F., and Shafritz, D.A. (1987)**
Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of liver-specific gene expression during rat development *Genes & Development* 1, 1172-1182
117. **Pelham, H.R.B. (1985)**
Activation of heat-shock genes in eukaryotes *TIG* 1, 31-35
118. **Pelham, H.R.B. (1989)**
Heat shock and the sorting of luminal ER proteins *EMBO J.* 8, 3171-3176
119. **Pfeifer, K., Prezant, T., and Guarente, L. (1987)**
Yeast HAP1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence *Cell* 49, 19-27
120. **Pinkert, C.A., Ornitz, D.M., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1987)**
An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice *Genes & Development* 1, 268-276
121. **Prywes, R., Dutta, A., Cromlish, J.A., and Roeder, R.G. (1988)**
Phosphorylation of serum response factor, a factor that binds to the serum response element of the c-FOS enhancer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7206-7210
122. **Ptashne, M. (1988)**
How eukaryotic transcriptional activators work *Nature* 335, 683-689
123. **Ryan, W.A., Jr., Franza, B.R., Jr., and Gilman, M.Z. (1989)**
Two distinct cellular phosphoproteins bind to the c-fos serum response element *EMBO J.* 8, 1785-1792
124. **Ryffel, G.U., Kugler, W., Wagner, U., and Kaling, M. (1989)**
Liver cell specific gene transcription in vitro: the promoter elements HP1 and TATA box are necessary and sufficient to generate a liver-specific promoter *Nucleic Acids Res.* 17, 939-953

125. **Ryffel, G.U., Muellener, D.B., Gerber-Huber, S., Wyler, T., and Wahli, W. (1983)**
Scattering of repetitive DNA sequences in the albumin and vitellogenin gene loci of *Xenopus laevis* *Nucleic Acids Res.* 11, 7701-7716
126. **Ryffel, G.U., Wyler, T., Muellener, D.B., and Weber, R. (1980)**
Identification, organization and processing intermediates of the putative precursors of *Xenopus* vitellogenin messenger RNA *Cell* 19, 53-61
127. **Sakai, M., Morinaga, T., Urano, Y., Watanabe, K., Wegmann, T.G., and Tamaoki, T. (1985)**
The human alpha-fetoprotein gene *J. Biol. Chem.* 260, 5055-5060
128. **Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P.C., and Tjian, R. (1988)**
A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs *Nature* 334, 218-224
129. **Sassone-Corsi, P., and Borrelli, E. (1986)**
Transcriptional regulation by trans-acting factors *TIG* 2, 215-219
130. **Sawadaishi, K., Morinaga, T., and Tamaoki, T. (1988)**
Interaction of a hepatoma-specific nuclear factor with transcription-regulatory sequences of the human alpha-fetoprotein and albumin genes *Mol. Cell. Biol.* 8, 5179-5187
131. **Sawadogo, M. (1988)**
Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF: II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF *J. Biol. Chem.* 263, 11994-12001
132. **Sawadogo, M., and Roeder, R.G. (1985)**
Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region *Cell* 43, 165-175
133. **Sawadogo, M., Van Dike, M.W., Gregor, P.D., and Roeder, R.G. (1988)**
Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF: I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei *J. Biol. Chem.* 263, 11985-11993
134. **Schaffner, W. (1989)**
How do different transcription factors binding the same DNA sequence sort out their jobs? *TIG* 5, 37-39
135. **Scheidereit, C., Cromlish, J.A., Gerster, T., Kawakami, K., Balmaceda, C.G., Currie, R.A., and Roeder, R.G. (1988)**
A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homeobox protein *Nature* 336, 551-557

136. **Schorpp, M., Döbbeling, U., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1988)**
5'-flanking and 5'-proximal exon regions of the two *Xenopus* albumin genes. Deletion analysis of constitutive promoter function *J. Mol. Biol.* 199, 83-93
137. **Schorpp, M., Kugler, W., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1988)**
Hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes *J. Mol. Biol.* 202, 307-320
138. **Schreiber, E., Müller, M.M., Schaffner, W., and Matthias, P. (1989)**
Octamer transcription factors mediate B-cell specific expression of immunoglobulin heavy chain genes *in: Tissue Specific Gene Expression, Renkawitz, R. (ed.), pp. 33-54, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, F.R.G.*
139. **Scotto, K.W., Kaulen, H., and Roeder, R.G. (1989)**
Positive and negative regulation of the gene for transcription factor IIIA in *Xenopus laevis* oocytes *Genes & Development* 3, 651-662
140. **Serfling, E., Jasin, M., and Schaffner, W. (1985)**
Enhancers and eukaryotic gene transcription *TIG* 1, 224-230
141. **Shaul, Y., Rutter, W.J., and Laub, O. (1985)**
A human hepatitis B viral enhancer element *EMBO J.* 4, 427-430
142. **Shepherd, J.C.W., McGinnis, W., Carrasco, A.E., De Robertis, E.M., and Gehring, W. J. (1984)**
Fly and frog homeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins *Nature* 310, 70-71
143. **Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., and Sharp, P.A. (1986)**
A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes *Nature* 319, 154-158
144. **Sorger, P.K., and Pelham, H.R.B. (1988)**
Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation *Cell* 54, 855-864
145. **Staiger, D., Kaulen, H., and Schell, J. (1989)**
A CACGTG motif of the *Antirrhinum majus* chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionarily conserved nuclear protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6930-6934
146. **Steitz, T.A., Ohlendorf, D.H., McKay, D.B., Anderson, W.F., and Matthews, B.W. (1982)**
Structural similarity in the DNA-binding domains of catabolite gene activator and *cro* repressor proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3097-3100
147. **Struhl, K. (1987)**
The DNA-binding domains of the *jun* oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous *Cell* 50, 841-846

148. **Struhl, K. (1989)**
Helix-turn-helix, zinc-finger and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins *TIBS* 14, 137-140
149. **Sturm, R.A., Das, G., and Herr, W. (1988)**
The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain *Genes & Development* 2, 1582-1599
150. **Tilghman, S.M. (1985)**
The structure and regulation of the alpha-fetoprotein and albumin genes in: *Oxford Surv. Eukar. Genes, Vol. 2* (Maclean, N., ed.), pp. 160-206, Oxford University Press, Oxford, U.K.
151. **Tognoni, A., Cattaneo, R., Serfling, E., and Schaffner, W. (1985)**
A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer *Nucleic Acids Res.* 13, 7457-7472
152. **Tronche, F., Rollier, A., Bach, I., Weiss, M.C., and Yaniv, M. (1989)**
The rat albumin promoter: cooperation with upstream elements is required when binding of APF/HNF1 to the proximal element is partially impaired by mutation or bacterial methylation *Mol. Cell. Biol.* 9, 4759-4766
153. **Tsutsumi, K.I., Ito, K., and Ishikawa, K. (1989)**
Developmental appearance of transcription factors that regulate liver-specific expression of the aldolase B gene *Mol. Cell. Biol.* 9, 4923-4931
154. **Tullius, T.D., and Dombroski, B.A. (1986)**
Hydroxy radical "footprinting": High-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and cro protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5469-5473
155. **Vaulont, S., Puzenat, N., Kahn, A., and Raymondjean, M. (1989)**
Analysis by cell-free transcription of the liver-specific pyruvate kinase gene promoter *Mol. Cell. Biol.* 9, 4409-4415
156. **Vogt, P.K., and Bos, T.J. (1990)**
Jun: oncogene and transcription factor *Adv. Cancer Res.* 55, in press
157. **Vogt, P.K., Bos, T.J., and Doolittle, R.F. (1987)**
Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxy-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3316-3319
158. **Wahli, W. (1988)**
Evolution and expression of vitellogenin genes *TIG* 4, 227-232

159. **Wahli, W., and Ryffel, G.U. (1985)**
Xenopus vitellogenin genes in: *Oxford Sur. Eukar. Genes, Vol. 2 (Maclean, N. ed.), pp. 96-120, Oxford University Press, Oxford, U.K.*
160. **Wahli, W., Dawid, I.B., Ryffel, G.U., and Weber, R. (1981)**
Vitellogenesis and the vitellogenin gene family *Science* 212, 298-304
161. **Walker, P., Germond, J.E., Brown-Luedi, M., Givel, F., and Wahli, W. (1984)**
Sequence homologies in the region preceeding the transcription initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and apo-VLDLII genes *Nucleic Acids Res.* 12, 8611-8626
162. **Wallace, R.A. (1985)**
Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates in: *Developmental Biology, Vol. 1 (Browder, L.W., ed.), pp. 127-177, Plenum Publishing Corpor.*
163. **Wasylyk, B. (1988)**
Enhancers and transcription factors in the control of gene expression *Biochim. Biophys. Acta* 951, 17-35
164. **Westley, B.R., Wyler, T., Ryffel, G.U., and Weber, R. (1981)**
Xenopus laevis serum albumins are encoded in two closely related genes *Nucleic Acids Res.* 9, 3557-3574
165. **Williams, J.L., and Tata, J.R. (1983)**
Simultaneous analysis of conformation and transcription of A and B groups of vitellogenin genes in male and female Xenopus during primary and secondary activation by estrogen *Nucleic Acids Res.* 11, 1151-1166
166. **Wingender, E. (1988)**
Compilation of transcription regulating proteins *Nucleic Acids Res.* 16, 1879-1902
167. **Wolffe, A.P., Glover, J.F., Martin, S.C., Tenniswood, M.P.R., Williams, J.L., and Tata, J.R. (1985)**
Deinduction of transcription of Xenopus 74-kDa albumin genes and destabilization of mRNA by estrogen in vivo and in hepatocyte cultures *Eur. J. Biochem.* 146, 489-496
168. **Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., and Hancock, R. (1981)**
Silver staining of proteins in polyacrylamide gels *Anal. Biochem.* 18, 197-203
169. **Wu, C., Tsai, C., and Wilson, S. (1988)**
Affinity chromatography of sequence-specific DNA-binding proteins in: *Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 10, Setlow, J.K. (ed.), Plenum Press, New York, London*
170. **Yamamoto, K.K., Gonzales, G.A., Biggs, W.H., and Montminy, M.R. (1988)**
Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB *Nature* 334, 494-498