

KfK 4270

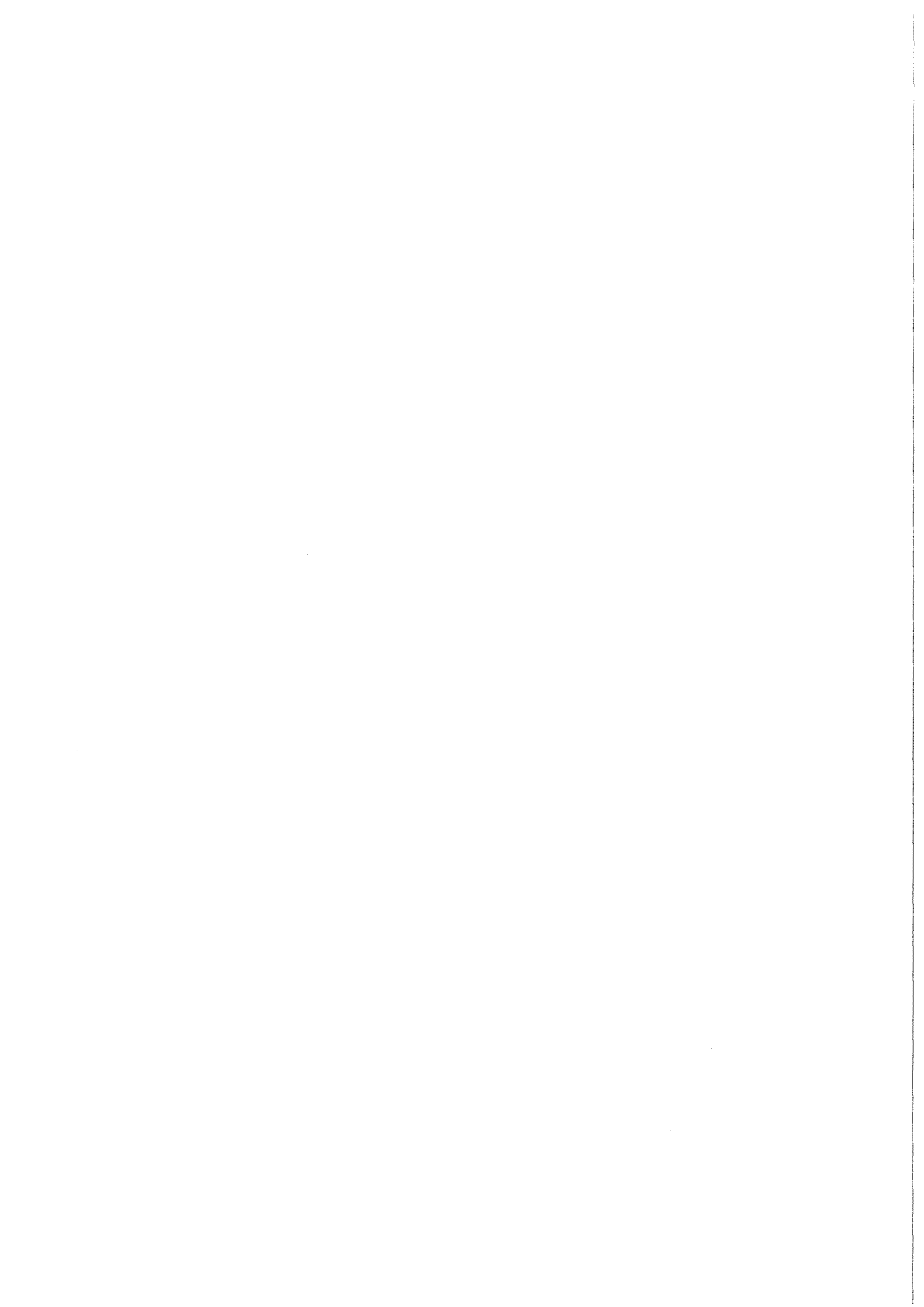
Mai 1987

**Funktionelle und strukturelle  
Analyse der DNA-Sequenz des  
Maus Mamma Tumor Virus Gens,  
die Glucocorticoid-Induzierbarkeit  
vermittelt**

P. Skroch

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie  
von Spaltstoffen

KfK 4270

FUNKTIONELLE UND STRUKTURELLE ANALYSE DER DNA-SEQUENZ  
DES MAUS MAMMA TUMOR VIRUS GENS,  
DIE GLUCOCORTICOID-INDUZIERBARKEIT VERMITTELT

Petra Skroch

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe G.m.b.H., Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

## ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil meiner Arbeit habe ich gezeigt, daß das DNA-Element, das dem Maus Mamma Tumor Virus Gen die Hormoninduzierbarkeit vermittelt, die Eigenschaften eines Enhancers besitzt. Es aktiviert einen fremden Promotor, den des  $\beta$ -Globingens, unabhängig von Distanz, Position und Orientierung. Man muß diese Eigenschaften jedoch in Relation zu den übrigen regulatorischen Elementen des aktivierten Gens betrachten, wie die Rekombinanten zwischen HRE und dem TK-Gen gezeigt haben.

Im zweiten Teil meiner Arbeit habe ich die biologische Signifikanz von Basenfolgen im HRE untersucht, die sich durch Interaktion mit trans-wirkenden Faktoren oder Sequenzhomologien zu anderen regulatorischen DNA-Elementen auszeichnen. Ich konnte die für Enhancer allgemein postulierte Modular-Struktur auch für das HRE bestätigen und die Bedeutung der einzelnen Subdomänen für die Funktion des Elements zueinander in Bezug setzen.

## ABSTRACT

### FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS OF THE DNA SEQUENCE CONFERRING GLUCOCORTICOID INDUCIBILITY TO THE MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS GENE

In the first part of my thesis I show that the DNA element conferring glucocorticoid inducibility to the Mouse Mammary Tumor Virus (HRE) has enhancer properties. It activates a heterologous promoter - that of the  $\beta$ -globin gene, independently of distance, position and orientation. These properties however have to be regarded in relation to the remaining regulatory elements of the activated gene as the recombinants between HRE and the TK gene have demonstrated.

In the second part of my thesis I investigated the biological significance of certain sequence motifs of the HRE, which are remarkable by their interaction with transacting factors or sequence homologies with other regulatory DNA elements. I could confirm the generally postulated modular structure of enhancers for the HRE and bring the relevance of the single subdomains for the function of the element into relationship.

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	5
EINLEITUNG	7
Kommunikationssysteme	7
Steroidhormone	7
Wirkmechanismus von Steroidhormonen	9
Cis-wirkende Elemente der Genregulation	9
Trans-wirkende Elemente der Genregulation	12
Ein System zum Studium des Wirkmechanismus von Glucocorticoiden	14
MMTV	15
Das "hormone response element" (HRE) von MMTV	17
Hormonrezeptoren	22
ZIELSETZUNG	24
MATERIALIEN	25
METHODEN	28
Allgemeine Arbeitsmethoden	28
Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	28
Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform	28
Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol	28
Klonierung von DNA	29
Restriktionsverdau	29
Dephosphorylierung	29
Entfernen von Einzelstrangüberhängen	29
Ligation von Linkern	30
Ligation	30
Auftrennen von DNA-Fragmenten	31
Isolation von DNA aus Gelmaterial	31
Transformation von Bakterien	32
Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	33

Kurzprotokoll zur Präparation kleiner Mengen DNA	33
Mutagenese von Plasmid-DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden	34
Transformation von Bakterien des Stamms E.coli K12 71/18	34
Präparation einzelsträngiger DNA	35
Kinasierung von Oligonukleotiden	35
Hybridisierung von Oligonukleotiden an einzel- strängige DNA (Annealing)	36
Kettenverlängerung (Extension) und Ligation	36
Zellkultur	36
Präparation von hochmolekularer Träger-DNA	36
Zellkulturmedien	36
Stabile Transfektion	37
Präparation von DNA und RNA aus eucaryontischen Zellen	38
Transiente Transfektion	38
Analytische Methoden	38
Präparation von niedermolekularer Träger-DNA	39
Markierung von DNA mit Radionukleotiden	39
Gelfiltration	40
Southern Transfer	41
Northern Transfer	41
Hybridisierung von nick translatierter DNA an auf Nitrozellulose fixierte Nukleinsäuren	42
Auftrennung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen	43
S1-Analyse	43
SP6-Analyse	44
Sequenzierung von DNA nach Maxam und Gilbert	45



Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-	
Aktivität	46
ERGEBNISSE	48
Analyse der Enhancer-Eigenschaft des HRE	48
Konstruktion der Rekombinanten	50
Analyse der Hormoninduzierbarkeit der Rekombinanten	57
Bestimmung der Menge korrekt initiiertes $\beta$ -Globin	
Transcripte	57
Bestimmung der Menge korrekt initiiertes TK-	
Transcripte	63
Strukturelle Analyse des HRE	72
Einführen von Mutationen in die Sequenz des HRE	73
Gezielte Mutagenese	74
Sequenzanalyse	79
Analyse der Hormoninduzierbarkeit der pLTR-	
Konstrukte	81
Bestimmung der Menge am korrekten MMTV-Start	
initiiertes Transcripte	83
Bestimmung der Menge korrekt initiiertes TK-	
Transcripte	87
Northern-Analyse der RNA stabil transfizierter	
Zellen	91
Southern-Analyse der genomischen DNA stabil	
transfizierter Zellen	93
Analyse der Hormoninduzierbarkeit im transienten	
System	97
DISKUSSION	100
Analyse der Enhancer-Eigenschaft des HRE	100
Enhancer-Wirkung des HRE auf das $\beta$ -Globin-Gen	101
Enhancer-Wirkung des HRE auf das TK-Gen	101

Zusammenfassung zur Analyse der Enhancer-Wirkung	
des HRE	104
Strukturelle Analyse des HRE	104
Absolut notwendige Sequenzen	105
Die Hexanukleotide der proximalen Bindungsdomäne	106
Die Homologie zum TO-Gen	108
Sequenzen außerhalb von bisher bekannten mit Proteinen interagierenden Bereichen	108
Modell zur Interaktion von HRE und Glucocorticoid- Rezeptor	110
Vergleich mit anderen Hormon-Regulationssystemen	111
Vergleich mit anderen Enhancern	113
Ausblick	116
LITERATURVERZEICHNIS	117

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
(d)ATP	(Desoxy-)Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
(d)CTP	(Desoxy-)Cytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
(d)GTP	(Desoxy-)Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfon- säure
HRE	Hormone Response Element
HSV	Herpes simplex Virus
kb	Kilobasenpaare
LTR	Long Terminal Repeat
MEL	Maus Erythroleukämie
MoMSV	Moloney Murine Sarcome Virus
NF1	Nuclear Factor I
PEG	Polyethylenglycol
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
(m)RNA	(messenger-)ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease

RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
Rss	Restriktionsschnittstelle
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethyldiamin
TK	Thymidin Kinase
TO	Tryptophan Oxigenase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
(d)TTP	(Desoxy-)Thymidintriphosphat
Übersichtsart.	Übersichtsartikel

## EINLEITUNG

### Kommunikationssysteme

Die Entwicklung höherer Lebewesen mit differenzierten Geweben erforderte den Aufbau eines Kommunikationssystems, um die Aktivitäten der einzelnen Teile zu koordinieren. Im Tierreich haben sich zwei Systeme ausgebildet, die sich teilweise ergänzen und überschneiden: Nerven und Hormonsystem. Während sich das nervöse System durch den direkten zellulären Kontakt zwischen den Kommunikanden auszeichnet, basiert das hormonelle System auf Botenstoffen, die ins allgemeine Transportsystem abgegeben werden. Nur Zellen, die einen spezifischen Rezeptor für diesen Botenstoff besitzen, können auf das Signal reagieren. Chemisch gehören die Hormone verschiedenen Stoffgruppen an, man unterscheidet Hormone, die sich von der Aminosäure Phenylalanin ableiten (zB. Adrenalin), Peptid- und Proteohormone (zB. Insulin) und Steroidhormone (zB. Corticoide).

### Steroidhormone

Steroidhormone kommen bereits bei Crustaceen und Insekten vor (Crustecdyson bzw. Ecdyson). Bei Vertebraten werden Steroidhormone in den meisten Fällen aus Cholesterol über Pregnenolon zu Progesteron synthetisiert, aus diesem leiten sich die anderen Steroide ab. Dies sind zum einen die Sexualhormone Testosteron und Östradiol sowie deren Derivate, zum anderen die Corticoide. Mineralcorticoide, wie z.B. Aldosteron, wirken hauptsächlich auf den Elektrolythaushalt, Glucocorticoide, wie z.B. Cortisol, regulieren den Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel. Beide werden in der Nebennierenrinde synthetisiert, deren Aktivität durch das Hypophysenhormon ACTH

(Adrenocorticotropes Hormon) stimuliert wird. Die Hypophyse selbst wird neurosekretorisch vom Hypothalamus kontrolliert. Die nach einer Stimulation der Nebennierenrinde ausgeschütteten Hormone hemmen selbst wieder die synthetisierenden Zellen und die ACTH-produzierenden Zellen der Hypophyse. Glucocorticoide liegen im Blut nicht frei, sondern an Transportproteine gebunden vor: ca. 60% spezifisch gebunden an das Corticosteroid Binding Globulin, der Rest unspezifisch assoziiert mit Albuminen. Der Abbau von Glucocorticoiden erfolgt hauptsächlich in der Leber, auch in Niere und Darm. Der Glucocorticoidspiegel im Blut folgt bei Mammalia einem diurnealen Rhythmus, abhängig vom Schlaf-Wach-Rhythmus. Allgemein sichern Glucocorticoide die Streßbereitschaft des Körpers. Sie beeinflussen Protein-, Fett-, Kohlehydrat- und Nukleinsäurestoffwechsel, dabei können sie stimulierend wie in der Leber oder inhibitorisch wie in Muskel-, Haut-, Fett-, Binde- und lymphoidem Gewebe wirken. Glucocorticoide verändern einerseits spezifisch die Enzymmuster von Zellen: sie heben den Spiegel an Pyruvat-Carboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxikinase, Fructosebisphosphatase und Glucose-6-Phosphatase in Leber und Niere, den Spiegel lipolytischer Enzyme im Fettgewebe, den Spiegel proteolytischer Enzyme im Muskel und den Spiegel eines Schlüsselenzyms der Adrenalinsynthese im Nebennierenmark. Glucocorticoide bewirken die spezifische Abschaltung der Synthese von  $\alpha$ -Fötoprotein in der Rattenleber während der Entwicklung. Andererseits üben Glucocorticoide eine permissive Wirkung aus, indem sie die Wirkung anderer Hormone wie zB. Glucagon, Catecholamin oder Insulin überhaupt erst ermöglichen (Penzlin 1977, Übersichtsart. Karlson 1983, Jungermann u. Möhler 1980).

### Wirkmechanismus von Steroidhormonen

1968 postulierte Jensen ein Zwei-Stufen Modell zum Wirkmechanismus von Steroidhormonen: Das Hormon reagiert mit einem hochaffinem cytoplasmatischen Protein (Rezeptor) und bewirkt eine Konformationsänderung, so daß die Komplexe in den Kern transloziert werden. Dort interagieren sie mit nukleären Komponenten, insbesondere mit dem Genom und beeinflussen die Expression spezifischer Gene. Jensen entwickelte sein Modell anhand der Beobachtung, daß sich radioaktiv markierte Östrogenderivate schnell im Kern von Zielzellen ansammeln (Jensen u. Jacobson 1962). Die Zellen besitzen Komponenten, die mit hoher Affinität spezifisch Hormon binden. Diese Komponenten wurden im Uterus als Proteinmoleküle identifiziert (Talwar 1964). Die Bindungsreaktion zwischen Rezeptor und Ligand findet im Cytoplasma statt, da Steroidmoleküle im Gegensatz zu Peptidhormonen die Zellwand zu durchdringen vermögen.

1980 erbrachten Gronemeyer und Pongs den Nachweis, daß das Steroidhormon Ecdyson bei *Drosophila* Puffbildung an den Speicheldrüsenriesenchromosomen auslöst: Direkt an den Ecdyson-induzierten Puffs sind Hormon-Protein-Komplexe lokalisiert, sonst nirgends auf dem Chromosom. Auf Grund des sich entwicklungsspezifisch und gewebespezifisch ändernden Puffmusters waren diese auffälligen Veränderungen am Chromosom schon früh mit der Veränderung der Aktivität bestimmter Gene oder Gengruppen in Verbindung gebracht worden.

### Cis-wirkende Elemente der Genregulation

Eine der Möglichkeiten, die Aktivität von Genen zu beeinflussen, ist die Veränderung ihrer Expression. Die Regulation der Transcription bei höheren Eucaryonten war erst durch die

Entwicklung der Techniken der reversen Genetik einer Untersuchung zugänglich. Sie ermöglichten die Isolierung einzelner Gene (Klonierung), die Veränderung ihrer Sequenz (Mutation) und die funktionelle Analyse daraus resultierender Veränderungen in ihrer Expression nach Rückführung in die Zelle. Zunächst wurden große Ähnlichkeiten zum bakteriellen System entdeckt. Auch die meisten eucaryontischen Gene besitzen eine konservierte AT-reiche Sequenz als essentielles Promotorelement vor der Transcriptionseinheit (Übersichtsart. Breathnach u. Chambon 1981). Rund 50 Basenpaare vor dieser sogenannten TATA-Box wurden in allen Globingenen (Dierks et al. 1983) und einer Reihe weiterer Gene eine konservierte Sequenz mit dem Konsensus GG<sup>T</sup>/cCAATCT kurz CAAT-Box gefunden (Efstradiatis et al. 1980, Corden et al. 1980). Im Promotorbereich des Affenvirus SV40 (Myers et al. 1981) und in vielen zellulären Promotoren z.B. dem Metallothionein IIA Gen (Karin et al. 1984) wurden als weitere konservierte DNA-Sequenzen GC-reiche Abschnitte gefunden. Ihre Kernsequenz lautet GGGCGG, wobei weitere Basen der direkten Umgebung für die Funktion wichtig sind (Kadonaga et al. 1986). Beide Motive, die CAAT-Box und die GC-Box sind keine absolut notwendigen Promotorelemente, sie können aber durchaus gemeinsam auftreten, wie dies im Thymidinkinasegen des Herpes simplex Virus der Fall ist, wo zwei GC-Boxen eine CAAT-Box umschließen (McKnight et al. 1984).

Weiter stromaufwärts befindliche Sequenzen erwiesen sich aber als sehr heterogen, so daß keine weiteren konservierten Motive durch einfachen Sequenzvergleich gefunden werden konnten. Eine entscheidende Erweiterung des Verständnisses von regulatorischen Elementen brachte die Entdeckung von DNA-Fragmenten, die unabhängig von ihrer Orientierung die Transcription nachfolgender Promotoren stimulieren können - sogenannte Enhancer. Das erste Element dieser Art wurde im Genom von SV40 entdeckt (Benoist u.



Chambon 1981, Banerji et al. 1981, Moreau et al. 1981), weitere in anderen Papovaviren, Adenovirus, Herpesviren und in vielen Retroviren (de Villiers u. Schaffner 1981, Rosenthal et al. 1983, Hearing u. Shenk 1983, Gorman et al. 1982). Virale Enhancer zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus:

- ein gekoppeltes Gen wird ausgehend von der korrekten Startstelle stark aktiviert,
- die Aktivierung erfolgt unabhängig von der Orientierung Enhancer zu Promotor,
- die Fähigkeit über Distanzen von mehr als einer Kilobase zu wirken, sowohl von 5' als auch von 3' relativ zur cap site der RNA,
- preferentielle Stimulation des nähergelegenen von zwei hintereinanderfolgenden Promotoren

(Übersichtsart. Serfling 1985).

Die genauere Charakterisierung der Eigenschaften viraler Enhancer und die Entdeckung zellulärer Sequenzen mit Enhancer-Funktion z.B. im Immunglobulin schwere Kette Gen (Gillies et al. 1983, Banerji et al. 1983), im Insulingen von Ratte und Mensch (Walker et al. 1983), im Trypsin-, Chymotrypsin- und Amylasegen der Ratte (Boulet et al. 1986) führte zu einer modifizierten Betrachtungsweise dieser regulatorischen DNA-Elemente

- Enhancer können zelltypspezifisch wirken, das heißt sie können Gewebespezifität vermitteln
- sie können sich innerhalb von Genen befinden
- ihr Wirkungsgrad kann abhängig von Orientierung und Position schwanken.

Mittlerweile verschwimmt die strenge Abgrenzung zwischen Promotor und Enhancer-Sequenzen, die Elemente können strukturell und funktionell überlappen. Auch die exakten Grenzen des als Enhancer bezeichneten Fragments sind schwer eindeutig definierbar, sie

sind abhängig von Zelltyp und spezifischem Gen. Der Begriff Enhancer wird derzeit aufgefaßt als Arrangement kurzer Sequenzmotive, die spezifische Aufgaben haben, wie zB. das Vermitteln von Induzierbarkeit oder von Gewebespezifität, oder die generelle Stimulation der Transcriptionsrate (Herbomel et al. 1984). Man spricht von einer Modularstruktur der Enhancer (Dorsch-Häsler et al. 1985). Die Fähigkeit einer Sequenz als Enhancer zu wirken, sollte eher als quantitative denn als qualitative Eigenschaft aufgefaßt werden (Übersichtsart. Serfling et al. 1985).

#### Trans-wirkende Faktoren der Genregulation

Alle genannten cis-wirkenden Regulationssequenzen haben gemeinsam, das Ziel spezifischer DNA-bindender Proteine zu sein. Erst seit kurzer Zeit werden diese trans-wirkenden Faktoren isoliert und charakterisiert. Einer der ersten war das Protein, das an die GC-Boxen des SV40 Promotors bindet, der Faktor SP I (Dyran u. Tjian 1983). Faktoren, die spezifisch an die TATA-Box und die CAAT-Box binden, wurden in Drosophila- und Säugerzellextrakten nachgewiesen und isoliert (Davidson et al. 1983, Parker u. Topol 1984, Jones et al. 1985, Cohen et al. 1986). Auch die vielfältigen Eigenschaften von Enhancer-Elementen werden durch die Bindung spezifischer Proteine vermittelt (Schöler u. Gruss 1984, Wildeman et al. 1984, Sequin et al. 1984). Es gelang, einen Faktor aus menschlichen HeLa-Zellen zu isolieren, der sowohl mit den Enhancer-Sequenzen von SV40 und des Adenovirus 2 Ela-Gens, als auch mit denen des Immunglobulin schwere Kette (IgH) Gens interagiert. Trotzdem gibt es keinen generellen Enhancer-bindenden Faktor: der Enhancer des dem SV40 nahe verwandten Polyomavirus kompetitiert nicht um den selben

zellulären Faktor (Sassone-Corsi et al. 1985).

Auch die Enhancer-vermittelte Gewebespezifität beruht auf der Bindung zellulärer Faktoren: der SV40-Enhancer funktioniert sowohl in HeLa- als auch in lymphoiden Zellen, während der Enhancer des Immunglobulin schwere Kette Gens und der Enhancer des Lymphotropen Papovavirus in HeLa-Zellen nicht arbeiten. Der Grund hierfür ist, daß HeLa-Zellen ein B- und T-Zell spezifischer Faktor fehlt, der zusätzlich zu einem auch in HeLa-Zellen vorkommenden Faktor an IgH- bzw. LPV-Enhancer binden muß (Schöler u. Gruss 1985).

Bei Eucaryonten findet man, wie bei Procaryonten, auch negative Regulationsmechanismen. Prominentestes Beispiel eines trans-wirkenden Repressors ist das SV40 T-Antigen, das die Expression der frühen Virusgene und damit seine eigene reprimiert (Rio et al. 1980, Myers et al. 1981). IgH- Insulin- und B-Interferongene (Dougherty et al. 1986, Nir et al. 1986, Goodbourn et al. 1986) besitzen Sequenzen, die ihre Expression in nicht spezifischen Zellen verhindern. Es liegt nahe anzunehmen, daß auch dies durch das Binden zellulärer Proteine vermittelt wird.

Das eigentliche Effektormolekül, auf das alle diese Sequenz-spezifischen Wirkungen übertragen werden müssen, ist die RNA-Polymerase II. Anders als bei Bakterien ist das hochgereinigte Enzym nicht in der Lage spezifisch an DNA zu binden, es ist angewiesen auf die Hilfe weiterer zellulärer Proteine, der Transcriptionsfaktoren, die mit ihr zusammen an der Initiationsstelle einen Komplex bilden (Matsui et al. 1980, Dynan u. Tjian 1983). Über den Wirkmechanismus DNA-bindender Faktoren gibt es noch keine klaren Vorstellungen. Zur Diskussion stehen ein "Zugänglich-machen" der DNA für die Polymerase und ihre Co-Faktoren oder die direkte Interaktion von Proteinmolekülen mit

dem Ziel die Bindung der Polymerase auf der DNA zu stabilisieren. Noch schwieriger wird die Erklärung des Wirkmechanismus von weit vom Promotor entfernten regulatorischen DNA-Elementen - man müßte ein "Rutschen" der Faktoren auf der DNA oder eine Schleifenbildung großer DNA-Bereiche postulieren, um eine direkte Bindung zwischen trans-wirkenden Faktoren und der RNA-Polymerase zu ermöglichen (Übersichtsart. Dynan u. Tjian 1985, Sassone-Corsi u. Borelli 1986).

#### Ein System zum Studium des Wirkmechanismus von Glucocorticoiden

Die Voraussetzungen zur Definition von Sequenzen, die spezifisch die Wirkung von Glucocorticoiden vermitteln und der an sie bindenden Proteine waren erfolgversprechend: Es gab starke Hinweise, daß Steroidhormone allgemein und Glucocorticoide speziell auf Transcriptionsebene in die Proteinsynthese von Zellen eingreifen und es war bekannt, daß eines der involvierten Proteine ein spezifischer Rezeptor für das Effektormolekül Hormon ist. Ein geeignetes System zur Lösung dieser Aufgabe stellten Ringold, Yamamoto, Tomkins Bishop und Varmus in einem 1975 (a) veröffentlichten Artikel vor: "Dexamethasone mediated Induction of MMTV-RNA: A System for Studying Glucocorticoid Action". Die Autoren benutzten für ihre Experimente eine Maus-Mammatumor-Zelllinie (GR), die auf Behandlung mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason mit einer 10- bis 20-fachen Steigerung der Expression MMTV-spezifischer mRNA und nachfolgender Synthese reifer Viruspartikel reagiert.

### MMTV

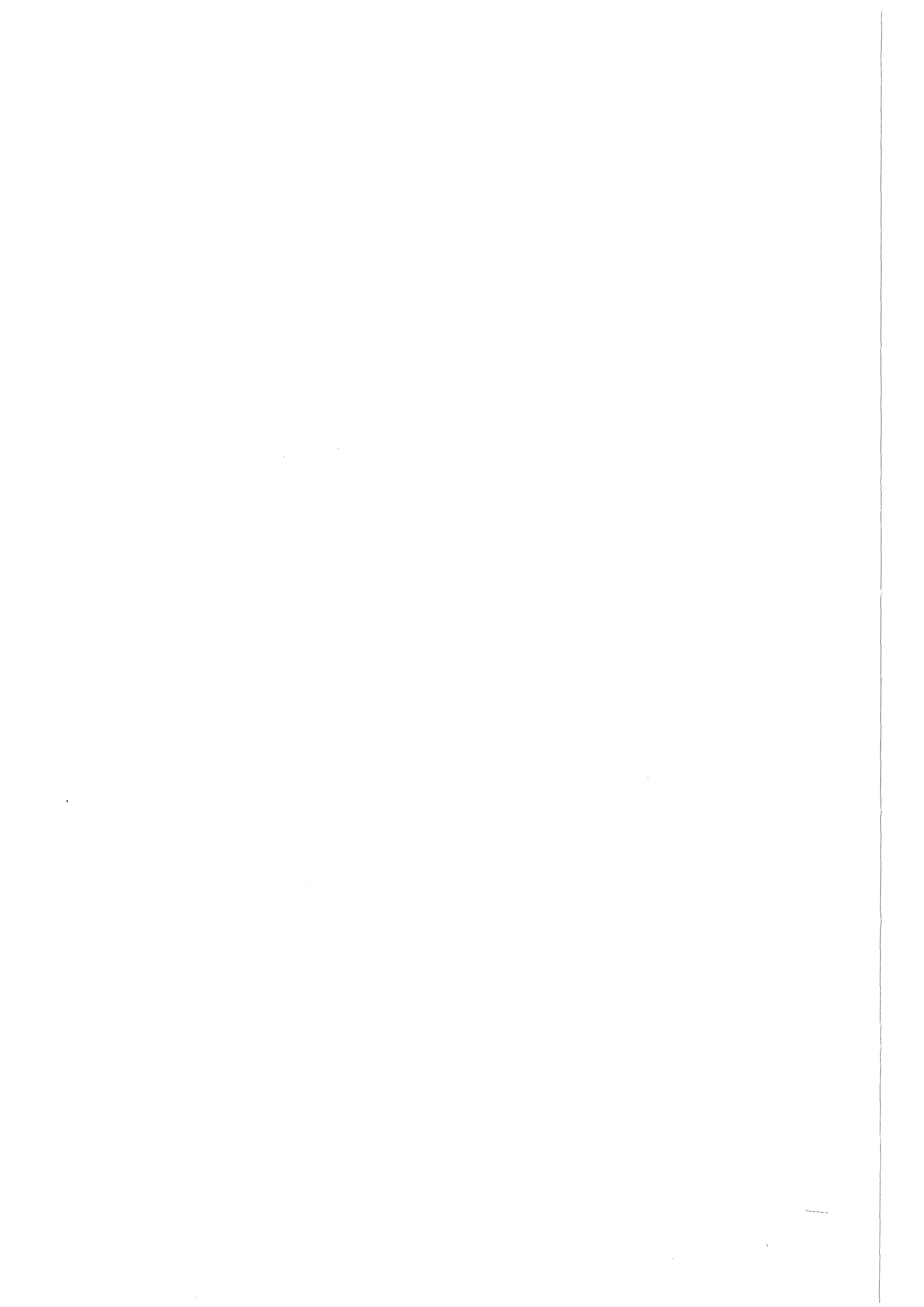
Das Maus Mammatumor Virus (MMTV) gehört zur Gruppe der Retroviren (Übersichtsart. Varmus 1983). Infektiöse Viruspartikel tragen die genetische Information des Virus in Form von RNA-Molekülen. Die RNA wird nach Eindringen in die Wirtszelle mit Hilfe des Virus-kodierten Proteins reverse Transcriptase, von dem einige Moleküle zusammen mit der RNA in die Zelle geschleust werden, in ein doppelsträngiges DNA-Molekül überschrieben. Durch einen allen Retroviren eigentümlichen Mechanismus hat das fertige DNA-Molekül an beiden Enden repetitierte Sequenzen, die sogenannten long terminal repeats (LTR). Das DNA-Molekül integriert unspezifisch ins Genom der Wirtszelle und wird dann als Provirus bezeichnet. Die Transcription des proviralen Genoms erfolgt ausgehend vom viralen Promotor im linken LTR. Das Genom der Retroviren umfaßt nur die drei Gene gag, pol und env, sie kodieren für Hüllproteine und für Proteine, die an der reversen Transcription beteiligt sind. Reife Viruspartikel verlassen die Zelle ohne sie zu zerstören (Übersichtsart. Coffin 1982, Varmus u. Swanstrom 1982).

Bereits 1936 konnte Bittner nachweisen, daß ein Virus in die Ausbildung von Mammatumoren bei Mäusen involviert ist und über die Milch an die Säuglinge weitergegeben wird. In den 50er Jahren wurden Viruspartikel in Maus-Mammatumoren nachgewiesen (Übersichtsart. Blair 1968). Isolierte Mammatumorzellen in Kultur produzieren ebenfalls Viruspartikel (Parks et al. 1974, Ringold et al. 1975b, Young et al. 1975). Das Auftreten MMTV-induzierter Tumoren ist eindeutig geschlechtsgebunden - nur weibliche Tiere sind betroffen - und abhängig von hormonellen Faktoren - die Wahrscheinlichkeit Tumore zu bekommen steigt mit der Anzahl der Schwangerschaften (Lathrop u. Loeb 1913, Übersichtsart. Boot 1970). Der Einfluß verschiedener Hormone wurde durch

Explantationsexperimente untersucht. Weibliche Mäuse, denen die Ovarien bereits im Jugendalter entfernt worden waren, wiesen eine den unbehandelten Kontrollen gegenüber deutlich reduzierte Tumorzinzidenz auf (Shimkin u. Wyman 1945). Der Effekt ließ sich durch Progesteron- und Östrogen-Gaben rückgängig machen (Van Nie u. Dux 1971, Sluyser et al. 1976). Entfernen der Nebennieren verminderte ebenfalls signifikant das Auftreten von Mammatumoren (Shimkin u. Wyman 1949). Cortisol-Behandlung MMTV-infizierter C3H Mäuse erhöhte die Anzahl der Viruspartikel in Tumoren (Smoller et al. 1961). In Serie transplantierte Tumoren enthielten in Dexamethason-behandelten Tieren viermal mehr MMTV-spezifische RNA als in unbehandelten Kontrollen (Pauley et al. 1979). Neben den Steroiden Progesteron, Östrogen und Cortisol hatte auch das Proteinormon Prolaktin fördernden Einfluß auf die Ausbildung MMTV-induzierter Mammatumoren (Bern u. Nandi 1961, Übersichtsart. Nandi u. McGrath 1973, Übersichtsart. Boot 1981). Alle diese Behandlungen stellen schwere Eingriffe in den physiologischen Haushalt der Tiere dar und verursachen komplexe Störungen, was eine eindeutige Zuordnung von Behandlung und Effekt erschwert. Man versuchte daher die Wirkung einzelner Hormone auf einer weniger komplexen Ebene, d.h. in Zellkultur nachzuvollziehen. Der erwartete stimulierende Einfluß von Sexualhormonen auf die Virusproduktion konnte in Zellkultur nicht erzielt werden (Dickson et al. 1974). Das synthetische Glucocorticoid Dexamethason erwies sich dagegen als äußerst effizienter Induktor der Synthese reifer Viruspartikel in Zellen, die aus MMTV-induzierten Tumoren isoliert worden waren (Young et al. 1975, Ringold et al. 1975).

Das "hormone response element" (HRE) von MMTV

Die Klonierung proviraler DNA und ihr Transfer in heterologe Rezipientenzellen bewiesen, daß die Induzierbarkeit eine Eigenschaft des Virusgenoms selbst ist (Hynes et al. 1981, Buetti u. Diggelmann 1981). Durch Subklonierung von Fragmenten des MMTV-Genoms und Rekombination mit Indikatorgenen wie dem Dehydrofolatreduktasegen, dem viralen ras-Gen oder dem Thymidinkinasegen wurde der dafür verantwortliche Bereich den LTR-Sequenzen zugeordnet (Lee et al. 1981, Huang et al. 1981, Groner et al. 1981). Die 202 Basenpaare, die der Initiationsstelle der Transcription des retroviralen Genoms vorausgehen, sind ausreichend, um sowohl dem authentischen MMTV-Promoter, als auch dem gekoppelten Thymidinkinasegen Hormoninduzierbarkeit zu vermitteln (Hynes et al. 1983). Die Induktion erfolgt auf der Ebene der Transcription, vermittelt durch einen spezifischen Rezeptor (Groner 1983). Die Induzierbarkeit des Thymidinkinasegens bleibt auch dann noch vorhanden, wenn man die authentische MMTV RNA cap site, die TATA-Box und alle weiteren Basen bis zur Position -59 vor der MMTV-Initiationsstelle entfernt (Skroch 1983, Groner et al. 1984). Das bedeutet, die Sequenz, die dem proviralen Genom Glucocorticoid-Induzierbarkeit vermittelt, ist ein selbständiges Regulationselement von 143 Basenpaaren, das distanzunabhängig eucaryontische Promotoren aktivieren kann.





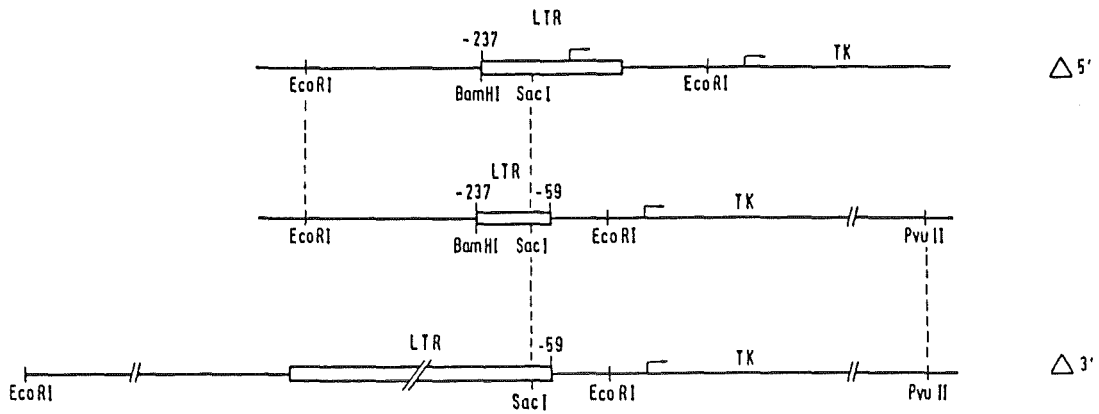


Abb.1a: Schematische Darstellung der Definition von 5' und 3'Grenze des HREs. Aus technischen Gründen ist das für die weiteren Experimente verwendete LTR-Subfragment geringfügig größer als die Minimalsequenz des HREs.

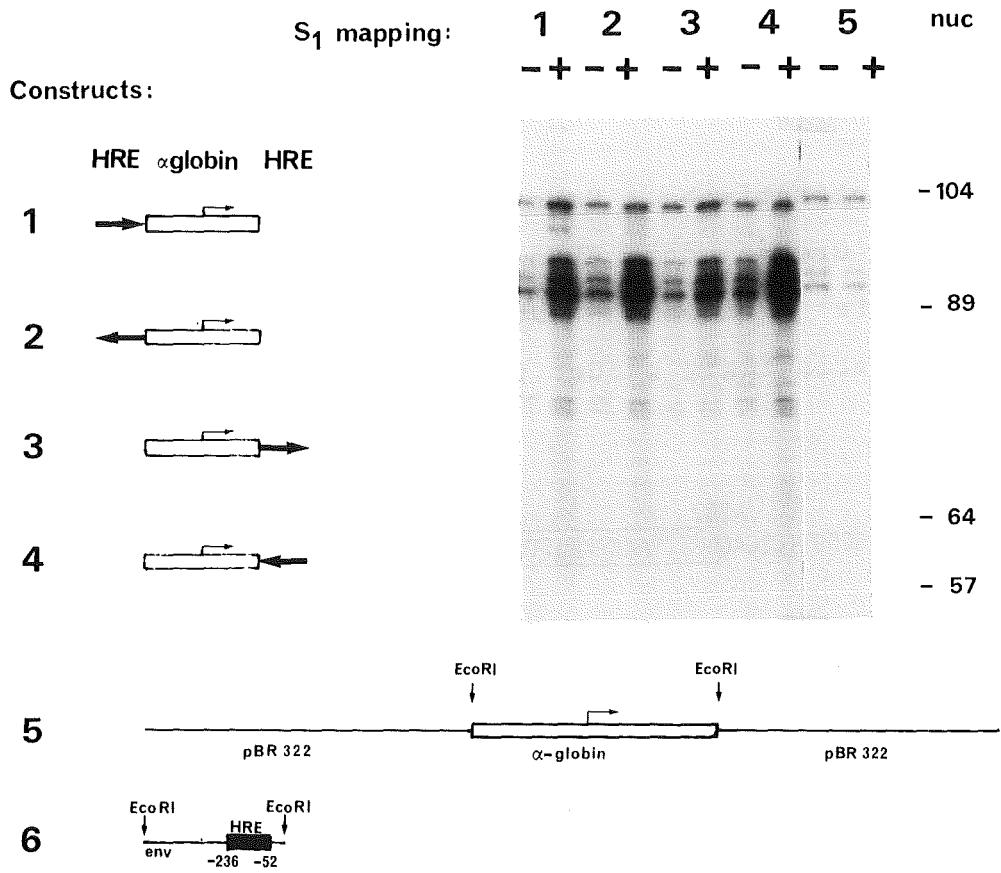
-202  
 CAACCTTGGCGTTCCCAAGGTTTAAATAAGTTTATGGTTACAAACTGTTCTTAAAACGAGGATGTGAGACAAGTGGTTTCCTGAC

TTGGTTTGGTATCAAATGTTCTGATCTGAGCTCTTAGTGTCTATTTTCTATGTTCTTTTGAATCTATCCAAGTCTTATGTAA

ATGCTTATGTAACCATAAATATAAAAGAGTGCTGATTTTTGAGTAAACTTGAACAGTCCTAACATTCTTCTCTCGTGTGTTTG

1b: Sequenz aus dem Promotorbereich von MMTV. Die als HRE definierte Region ist umrahmt, der Pfeil markiert den Transcriptionsstart.

Abb. 2



Die Fähigkeit zur distanzunabhängigen Aktivierung fremder Promotoren ist eine Eigenschaft, die Enhancer auszeichnet. Das HRE besitzt noch weitere Fähigkeiten, die diese Gruppe regulatorischer DNA-Elemente auszeichnen: Es vermittelt dem  $\alpha$ -Globingen der Maus Hormoninduzierbarkeit auch aus einer Position hinter dem Gen und jeweils in beiden Orientierungen (Ponta et al. 1985).

Abb.2: S1-Analyse der Menge spezifischer  $\alpha$ -Globin-Transcripte (Länge des indikativen Fragments 90 Nukleotide) in unbehandelten (-) und Dexamethason-behandelten (+) Zellen. Das HRE (6) vermittelt dem  $\alpha$ -Globingen der Maus (5) unabhängig von Position und Orientierung (1-4) Hormoninduzierbarkeit.

Diese Experimente wiesen dem HRE eindeutig die Eigenschaften eines Enhancers zu, der seine Wirkung erst unter dem Einfluß von Hormonen entfaltet. Somit kann man das HRE von MMTV als Repräsentant einer neuen Gruppe der Enhancer bezeichnen: das HRE hat die Eigenschaft eines konditionalen Enhancers.

DNA-Rezeptor-Bindungsstudien mit gereinigtem Glucocorticoid-Rezeptor bestätigten die Ergebnisse der in vivo Studien: eine preferentielle Bindung an den Rezeptor zeigten fast ausschließlich LTR-Sequenzen (Pfahl 1982, Payvar et al. 1981 u. 1983). DNaseI Footprint Analysen dieses Bereichs mit dem gereinigten Glucocorticoid-Rezeptor demonstrieren innerhalb des in vivo definierten Elements zwei geschützte Domänen: Die Basenpaare -71 bis -124 und -164 bis -191 werden vom Rezeptormolekül überdeckt (Scheidereit et al. 1983).

### Hormon-Rezeptoren

Die Faktoren, die die Wirkung hormonresponsiver DNA-Sequenzen vermitteln, waren als Proteine schon vor mehreren Jahren aus Zellextrakten gereinigt worden (Wrange et al. 1979, Westphal et al. 1981). Kürzlich wurden den mRNAs komplementäre DNAs (cDNAs) für den Glucocorticoidrezeptor von Maus und Mensch, den Östrogenrezeptor von Huhn und Mensch und den Progesteronrezeptor von Huhn und Kaninchen isoliert und charakterisiert (Danielsen et al. 1986, Hollenberg et al. 1985, Krust et al. 1986, Walter et al. 1985, Jeltsch et al. 1986, Loosfelt et al. 1986). Alle weisen bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung große Homologien auf, sie ähneln sich stark in Größe und Domänenstruktur. Wie bereits von Carlstedt-Duke et al. 1982 auf Grund immunchemischer Untersuchungen postuliert, kann man Steroidrezeptormoleküle strukturell in drei Abschnitte einteilen. Die Hormon-bindende Domäne hat einen hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, sie ist innerhalb einer bestimmte Rezeptorklasse zwischen den einzelnen Spezies stark homolog. Die DNA-bindende Domäne, die sowohl zwischen den einzelnen Rezeptorklassen einer Spezies, als auch innerhalb einer bestimmten Rezeptorklasse mehrerer Spezies eine sehr starke Homologie aufweist, hat einen hydrophilen Charakter und ist reich an basischen Aminosäuren. Die dritte Domäne weist sowohl innerhalb der Rezeptorklassen, als auch zwischen den Spezies nur kleine Homologieblöcke auf, ihr wird Effektorfunktion zugeschrieben (Green et al. 1986, Krust et al. 1986, Kumar et al. 1986). Das Hormonmolekül soll durch Interaktion mit der hydrophoben Region des Rezeptors eine Umlagerung bewirken (Yamamoto et al. 1984), durch die die vorher nicht zugängliche DNA-bindende Domäne exponiert wird (Godowski et al. 1987). Zwischen den DNA-bindenden Domänen verschiedenster mit Nukleinsäuren interagierender Proteine wie dem Xenopus

Transkriptionsfaktor IIIA, dem Drosophila Krüppel-Protein und den Steroidhormonrezeptoren wurden große strukturelle Ähnlichkeiten gefunden. Sie zeichnen sich durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren und durch Gruppen repetitierter Sequenzen von etwa 30 Aminosäuren, die dem Konsensus Cys-X(2-5)-Cys-X(12)-His-X(2-3)-His folgen, aus. Die allen diesen Proteinen assoziierten Metallionen könnten mit den Cystein- und Histidin-Resten Kontakte ausbilden und die dazwischenliegenden Aminosäuren eine kurze Finger-ähnliche Struktur bilden. Die Interaktion positiv geladener Aminosäuren innerhalb des "Fingers" mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA könnte zumindest eine Anlagerung von Proteinen an DNA bewerkstelligen (Miller et al 1985, Berg 1986, Jeltsch et al. 1986, Kumar et al. 1986, Vincent 1986). Aber auch dieses Modell liefert keine Aussage darüber, wie die Spezifität der Bindung erzielt wird.

## ZIELSETZUNG

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich strukturelle und funktionelle Eigenschaften eines DNA-Elements, das Glucocorticoid-Induzierbarkeit vermittelt, untersucht. Als Untersuchungsobjekt habe ich das "hormone response element" (HRE) des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) gewählt. Dieses Element vereint die Fähigkeit Hormoninduzierbarkeit zu vermitteln mit Eigenschaften, die Enhancern zugeschrieben werden. Meine Fragen lauteten: Vermittelt das HRE einem beliebigen Transcriptionsstart Hormoninduzierbarkeit, oder sind weitere Promotor-Elemente notwendig für seine Funktion als konditionaler Enhancer? Kann man innerhalb des HREs Bereiche mit besonderer funktioneller Bedeutung definieren?

## MATERIALIEN

### Bakterienkultur

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit
Trypton	Difco Lab., Detroit

### Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht extra aufgeführt, von der Firma Merck, Darmstadt p.a. bezogen.

DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DTT	BRL Inc., Neu-Isenburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff für Gelelektrophorese	Schwarz und Mann, New York
Hexamin $\text{CoCl}_2$	Fluka, Neu-Ulm
K-Morpholinethan- sulfonsäure	Fluka, Neu-Ulm
PEG	Sigma, Deisenhofen
PIPES	Sigma, Deisenhofen
PVP	Fluka, Neu-Ulm
$\text{RbCl}_2$	Fluka, Neu-Ulm
SDS	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, Deisenhofen

### Enzyme

Alkal. Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
DNA-Ligase (T4)	BRL Inc., Neu-Isenburg

DNA-Polymerase (E.coli)	BRL Inc., Neu-Isenburg
DNase für SP6-Analyse	Genofit, Heidelberg
Klenow Fragment der DNA-Polymerase I	Anglian Biotechnol. Lim., Basel
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Polynukleotid-Kinase (T4)	Biolabs, Schwalbach
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim BRL Inc., Neu-Isenburg Promega Biotec, Heidelberg
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase T	Sigma, Deisenhofen
RNasin	Promega Biotec, Heidelberg
S1 Nuklease	Pharmacia, Freiburg
SP6 RNA-Polymerase	Biolabs, Schwalbach
<b>Gelelektrophorese</b>	
Acridinorange	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Haftsilan	Wacker Chemie, München
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio-Rad, München
Plastik-Material für Abstandshalter	Teflon
TEMED	Bio-Rad, München
Radioaktiv markierte Substanzen	Amersham Buchler, Braunschweig



### Sonstiges

Acetyl CoEnzym A	Pharmacia, Freiburg
Biogel P60	Bio-Rad, München
Kieselgel-DC-Platten	Macherey und Nagel, Düren
Lachs Spermien DNA	Sigma, Deisenhofen
Linker-DNA	Biolabs, Schwalbach
	BRL Inc., Neu-Isenburg
NACS Prepac Säulen	BRL Inc., Neu-Isenburg
Nick Translation Kit	Amersham Buchler, Braunschweig
Nukleotidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Sequencing Kit	New England Nuclear, Dreieich
Sequenzierprimer	Biolabs, Schwalbach

### Zellkultur

Aminopterin	Serva, Heidelberg
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
G418	Gibco, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hypoxanthin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Thymidin	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturartikel	Nunc, Roskilde, Dänemark

## METHODEN

Die beschriebenen Methoden wurden größtenteils direkt oder mit leichten Modifikationen aus "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (Maniatis et al. 1982) übernommen.

### ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

#### Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA in einer Lösung wurde deren optische Dichte bei 260 und 280nm gemessen.  $OD_{260}=1$  entspricht 50mg/ml doppelsträngiger DNA, 40mg/ml RNA oder 20mg/ml Oligonukleotid-DNA. Ein Maß für Verunreinigung der Lösung durch Protein gibt die  $OD_{280}$  an, sie sollte höchstens 70% der  $OD_{260}$  betragen.

#### Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform

Das Extraktionsvolumen betrug mindestens 100 $\mu$ l. Es wurde ein gleiches Volumen Phenol/TNE (10mM Tris; 100mM NaCl; 5mM EDTA; pH7,5) und ein gleiches Volumen Chloroform:Isoamylalkohol=25:1 zugegeben, kräftig durchmischt und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die Nukleinsäurehaltige Oberphase wurde noch 2x mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

#### Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol

Die Lösung wurde mit NaAc pH4,8 auf eine Endkonzentration von 0,2M und 2,5fachem Volumen Ethanol versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die ausgefallenen Nukleinsäuren 10min mit 8800xg abzentrifugiert, in 80%igem Ethanol aufgenommen, nochmals 5min mit 8800xg abzentrifugiert und unter Wasserstrahlvakuum getrocknet.

## KLONIERUNG VON DNA

### Restriktionsverdau

Pro  $\mu\text{g}$  zu verdauender DNA wurden 2-4 Einheiten Enzym in  $10\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen.

### Dephosphorylierung

#### a) an 5'Überhängen

Pro  $100\text{pmol}$  5'Enden wurde 1 Einheit alkalische Phosphatase aus Kälberdarm eingesetzt. Die Inkubation erfolgte  $2 \times 30\text{min}$  in  $50\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen bei  $37^\circ\text{C}$  in  $50\text{mM}$  Tris-HCl pH9.0;  $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $0,1\text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ ;  $1\text{mM}$  Spermidin. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde ein weiteres Aliquot Enzym zugegeben

#### b) an 3'Überhängen

Die Dephosphorylierung an 3'Überhängen erfolgte unter sonst gleichen Bedingungen bei  $2 \times$  je  $15\text{min}$   $37^\circ\text{C}$ ,  $15\text{min}$   $56^\circ\text{C}$ .

Nach der Reaktion wurde das Enzym durch  $10\text{minütiges}$  Erhitzen auf  $68^\circ\text{C}$  inaktiviert und durch anschließende Phenol/Chloroform Extraktion entfernt.

### Entfernen von Einzelstrangüberhängen

#### a) 5'Überhänge

Pro  $100\text{pmol}$  5'Enden wurde 1 Einheit Klenow-Fragment der E.coli DNA Polymerase I eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in  $25\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen  $30\text{min}$  bei  $22^\circ\text{C}$  in  $50\text{mM}$  Tris-HCl pH7,2;  $10\text{mM}$   $\text{MgSO}_4$ ;  $0,1\text{mM}$  DTT;  $100\mu\text{g/ml}$  BSA; je  $2\text{mM}$  dGTP, dATP, dCTP, dTTP. Nach der Reaktion wurde das Enzym durch  $5\text{minütiges}$  Erhitzen auf  $70^\circ\text{C}$  inaktiviert.

#### b) 3'Überhänge

Pro  $100\text{pmol}$  3'Enden wurde 1 Einheit T4 DNA Polymerase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in  $20\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen  $5\text{min}$  bei  $37^\circ\text{C}$  in

33mM Tris-HCl pH7,9; 66mM KAc; 10mM MgAc; 0,5mM DTT; 100µg/ml BSA; je 2mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP.

#### Ligation von Linkern

1-2µg Linker-DNA wurden mit 2 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Die Inkubation erfolgte in 10µl Reaktionsvolumen 60min bei 37°C in 66mM Tris-HCl pH7,6; 1mM ATP; 1mM Spermidin; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 15mM DTT; 200µg/ml BSA.

Zur Linkerphosphorylierungs-Reaktionslösung wurden 400ng DNA nach Entfernen von Einzelstrangüberhängen in 10µl des selben Puffers gegeben und 6h bei 22°C mit 1 Einheit T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Reaktionslösung wurde Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA Ethanol gefällt. Die Linkerketten an der DNA wurden durch Restriktionsverdau mit 20 Enzym-Einheiten über Nacht getrimmt. Die DNA wurde durch Auftrennung auf einem Agarosegel von der überschüssigen Linker-DNA abgetrennt.

#### Ligation

##### a) in wäBriger Lösung

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis 1:1 eingesetzt. Pro pmol Enden mit Überhängen wurde 0,1 Einheit T4 DNA Ligase verwendet, pro pmol Enden ohne Überhänge 1 Einheit. Die Inkubation erfolgte über Nacht in 20-50µl Reaktionsvolumen bei 15°C in 50mM Tris-HCl pH7,4; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM DTT; 1mM Spermidin; 1mM ATP; 100µg/ml BSA.

##### b) im Agarosegel

Für Ligationen von DNAs im Gel wurden die Gelstücke 10min bei 65°C geschmolzen, gemischt und auf 42°C abgekühlt. Die Reaktion erfolgte unter obigen Bedingungen in 100µl Volumen.

### Auftrennen von DNA-Fragmenten

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarose- oder Acrylamidgele verwendet.

#### a) Agarosegel

0,8-2% Agarose TypII oder TypVII (low gelling temperature) wurden mit 0,3µg/ml Ethidiumbromid in 50ml Laufpuffer TAE (40mM Tris; 5mM NaAc; 1mM EDTA; pH7,7) gelöst. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 50-100 V.

#### b) Acrylamidgel

6-8% Acrylamid 30:1 (29 Teile Acrylamid und 1 Teil N,N'-Methylenbisacrylamid) in Laufpuffer TBE (90mM Tris; 90mM Borsäure; 2,5mM EDTA; pH8,3) wurde durch Zugabe von 0,02% TEMED und 0,025% Ammoniumpersulfat polymerisiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100-300 V.

Die DNA wurde in 5% Glycerol; 5mM EDTA; 0,05% SDS; 0,02% Bromphenolblau aufgetragen.

### Isolation von DNA aus Gelmaterial

#### a) aus Agarosegel

Die DNA wurde in einem low gelling type Agarosegel aufgetrennt. Das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wurde 10min bei 65°C geschmolzen und mit 4fachem Volumen 0,25M NaCl in TE (10mM Tris-HCl pH7,2; 1mM EDTA) verdünnt. Nach weiteren 10min Inkubation bei 65°C wurde die Lösung auf 42°C abgekühlt und über eine NACS Prepac Säule gereinigt.

Eine NACS Prepac Säule wurde mit 3x 1ml 2M NaCl in TE hydratisiert und mit 5x 1ml Bindungspuffer (0,2M NaCl in TE für doppelsträngige DNA-Fragmente von weniger als 1kb Länge, 0,5M NaCl in TE für doppelsträngige DNA-Fragmente von mehr als 1kb Länge) equilibriert. Die DNA-Lösung wurde aufgetragen, mit 5x 1ml 42°C warmem Bindungspuffer gewaschen und mit 400µl Ablösepuffer (1M

NaCl in TE bzw. 2M NaCl in TE) eluiert.

b) aus Acrylamidgel

Die DNA wurde über Nacht bei 50°C in 0,2M NaCl in TE bzw. 0,5M NaCl in TE eluiert und bei Raumtemperatur wie oben beschrieben über eine NACS Prepac Säule gereinigt.

#### Transformation von Bakterien

Bakterien des Stamms E.coli K12 RR1 Delta M15 wurden nach der Methode von Hanahan (1983) transformiert.

a) Herstellung transformationskompetenter Zellen

0,1ml einer 10ml 37°C über Nacht Kultur Bakterien in SOB (2% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub>) wurden in 50ml SOB auf eine  $OD_{550}=0,45-0,55$  wachsen gelassen und in Portionen von 10ml 10min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert. Der Zelniederschlag wurde in je 3,3ml TFB (10mM K-Morpholinethansulfonsäure pH6,2; 100mM RbCl; 45mM MnCl<sub>2</sub>; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 3mM HexaminCoCl<sub>3</sub>) resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut 10min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert, in je 800µl TFB resuspendiert, auf Eis weiterinkubiert und in 5minütigen Abständen mit je 28µl DMSO, 28µl 2,25M DTT, 28µl DMSO versetzt.

b) Transformation

210µl kompetente Bakterien wurden 30min auf Eis mit der zu transfizierenden DNA (nicht mehr als 100ng in höchstens 5µl Volumen) inkubiert, für 90sec auf 42°C erwärmt, 1-2min auf Eis weiterinkubiert und mit 0,8ml SOC (SOB mit 20mM Glucose) versetzt. Der Transformationsansatz wurde 60 min bei 37°C geschüttelt und mit weiteren 2ml SOC versetzt. Die Bakterien wurden 5min bei Raumtemperatur mit 670xg abzentrifugiert, in 0,2ml SOB resuspendiert und auf Selektivagarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

200ml Bakteriensuspension wurden 10min bei 4°C mit 6000xg abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 10ml Lysozylösung (50mM Glucose; 10mM EDTA; 25mM Tris-HCl pH8,0; 2mg/ml Lysozym) aufgenommen, 30min auf Eis inkubiert, mit 20ml alkalischer SDS-Lösung (0,2N NaOH; 1% SDS) versetzt, 5min weiterinkubiert und mit 15ml 3M NaAc pH4,8 versetzt. Nach weiteren 60min Inkubation auf Eis wurden Zellfragmente und hochmolekulare DNA 10min bei 4°C mit 16800xg abzentrifugiert. der Überstand wurde mit 100ml Ethanol versetzt und 30min bei -80°C inkubiert. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde 10min bei 4°C mit 10800xg abzentrifugiert, in 10ml 50mM Tris-HCl pH8,0; 100mM NaAc resuspendiert, erneut durch Zugabe von 25ml Ethanol und 30minütige Inkubation bei -80°C ausgefällt und nochmals abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde unter Wasserstrahlvakuum im Exsikkator getrocknet, in 5ml 50mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA aufgenommen, mit CsCl auf eine Endkonzentration von 4,2M versetzt und nach Zugabe von 0,5ml 10mg/ml Ethidiumbromid-Lösung in einer Beckman Ultrazentrifuge in einem Vertikalrotor Typ 65 16h mit 55000rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA haltige Bande(n) wurde(n) mit einer Spritze abgezogen und unter den selben Bedingungen erneut für 6h zentrifugiert. Die Plasmid-DNA haltige(n) Bande(n) wurden wiederum abgezogen, mit 2fachem Volumen H<sub>2</sub>O versetzt und 3x mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem Butanol extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 2,5x Volumen Ethanol und 30minütige Inkubation bei -80°C ausgefällt, abzentrifugiert, unter Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 1ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Kurzprotokoll zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA

1,5ml Bakteriensuspension wurden 5min mit 8800xg abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 10µl Lysozylösung resuspendiert,

30min auf Eis inkubiert, mit 20µl alkalischer SDS-Lösung versetzt, 5min weiterinkubiert, mit 15µl 3M NaAc pH4,8 versetzt und 60min weiterinkubiert. Nach 5minütiger Zentrifugation mit 8800xg wurde der Überstand mit 1ml Ethanol versetzt, die Plasmid-DNA durch 30minütige Inkubation bei -80°C ausgefällt und 10min mit 8800xg abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100µl 50mM Tris-HCl pH8,0; 1mM NaAc aufgenommen und durch Zugabe von 250µl Ethanol und 10minütige Inkubation bei -80°C erneut gefällt, wiederum abzentrifugiert, unter Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 50µl 10mM Tris-HCl pH7,5; 0,1mM EDTA aufgenommen.

MUTAGENESE VON PLASMID-DNA UNTER VERWENDUNG VON OLIGO-  
NUKLEOTIDEN (Zoller u. Smith 1984)

Transformation von Bakterien des Stamms E.coli K12 71/18

a) Herstellung transformationskompetenter Zellen

100ml LB (1% Baktotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; 0,1% Glucose) wurden mit 1ml einer über Nacht Kultur Bakterien beimpft, bei 37°C im Schüttelwasserbad auf eine  $OD_{600}=0.2$  wachsen gelassen und 10min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in 40ml 100mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, 20min auf Eis inkubiert, erneut 10min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert und in 1ml 100mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen.

b) Transformation

100µl kompetente Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA (ca. 100ng) 30min auf Eis inkubiert, für 2min auf 37°C erwärmt, mit 0,5ml LB versetzt und 60min bei 37°C im Schüttelwasserbad weiterinkubiert. Aliquots von 0,2ml wurden auf Selektiv-agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert.



### Präparation von einzelsträngiger DNA

5ml LB mit Selektionsantibiotikum wurden mit 100µl einer über Nacht Kultur transformierter Bakterien beimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad auf eine  $OD_{600}=0,2-0,4$  wachsen gelassen, anschließend mit IRI Phagen zur MOI=10 angeimpft (ca.  $10^{12}$  Phagen pro 0,2 $OD$ ) und 5,5h weiterinkubiert. Portionen von je 1,5ml wurden 10min mit 8800xg abzentrifugiert, der Überstand wurde nochmals 10min mit 8800xg abzentrifugiert, wiederum 1,2ml des Überstands wurden mit 150µl 20% PEG; 2,5M NaCl versetzt, gemischt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagenpartikel wurden 10min mit 8800xg abzentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt, die Phagenpartikel nochmals 2min mit 8800xg zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Der Phagenniederschlag wurde in 200µl 10mM Tris-HCl pH8,0; 0,1mM EDTA resuspendiert, 30min bei Raumtemperatur lösen gelassen und anschließend mit 100µl Phenol gesättigt mit 100mM Tris-HCl pH9,0; 10mM EDTA 30sec kräftig geschüttelt. Die Oberphase wurde 2x mit je 200µl Chloroform extrahiert und die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 20µl 4M LiCl und 500µl Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die einzelsträngige DNA wurde 10min mit 8800xg abzentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen, unter Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 30µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Kinasierung von Oligonukleotiden

200pmol Oligonukleotid-DNA wurden in 20µl Reaktionsvolumen mit 4 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase in 50mM Tris-HCl pH8,0; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM DTT; 0,1mM Spermidin; 0,1mM EDTA; 0,5mM ATP für 60min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C beendet.

### Hybridisierung von Oligonukleotiden an einzelsträngige DNA (Annealing)

0,5-lpmol einzelsträngige DNA wurde zusammen mit 20pmol phosphorylierter Oligonukleotid-DNA und 20pmol Sequenzierprimer-DNA in 10µl 20mM Tris-HCl pH7,5; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM NaCl; 1mM DTT für 5min auf 55°C erhitzt, 5min bei Raumtemperatur und 5min auf Eis weiterinkubiert.

### Kettenverlängerung (Extension) und Ligation

10µl 20mM Tris-HCl pH7,5; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM DTT; je 0,8mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 1mM ATP; 3 Einheiten T4 DNA-Ligase; 2 Einheiten Klenow-Fragment der DNA Polymerase I wurden auf Eis mit 10µl DNA der Annealing-Reaktion gemischt und 6-12h bei 15°C inkubiert.

## ZELLKULTUR

### Präparation von hochmolekularer Träger-DNA (carrier DNA)

Lyophilisierte Lachs Spermien DNA wurde durch vorsichtiges Schütteln über Nacht in H<sub>2</sub>O aufgenommen, bis zur Entfernung anhaftenden Proteins Phenol/Chloroform extrahiert, Ethanol gefällt und in sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Zellkulturmedien

#### a) Normalmedium

Untransfizierte Ltk<sup>-</sup>-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### b) HAT-Medium

Zur Selektion für die Expression des transfizierten TK-Gens wurde Normalmedium mit 30µg/ml Hypoxanthin, 2µg/ml Aminopterin und 10µg/ml Thymidin versetzt.

c) G418-Medium

Zur Selektion für die Expression des transfizierten Neomycin Resistenzgens wurde Normalmedium mit 700µg/ml G418 versetzt. Zur Aufrechterhaltung des transfizierten Zustands genügte eine G418-Konzentration von 400µg/ml.

d) Dexamethason

Dexamethason wurde als  $10^{-3}M$  Stammlösung in 70% Ethanol hergestellt und auf eine Endkonzentration von  $10^{-3}M$  direkt ins Kulturmedium gegeben.

Stabile Transfektion

a) TK<sup>+</sup>-Phänotyp (Wigler et al. 1977 u. 1978)

Pro zu transfizierender DNA wurden 3 10cm-Petrischalen mit je  $5 \times 10^5$  Zellen angesetzt. Nach 24h wurde das Medium durch frisches ersetzt, 4-6h später wurde zu jeder Petrischale 1ml Transfektionslösung zugegeben, 18h weiterinkubiert, erneut das Medium durch frisches ersetzt und nach weiteren 24h auf HAT-Medium gewechselt. Weitere Medienwechsel erfolgten durchschnittlich alle 3 Tage bis zur Etablierung stabiler Klone. Transfektionslösung: 500ng Plasmid-DNA und 10µg carrier DNA in 500µl 125mM CaCl<sub>2</sub> wurden tropfenweise zu 500µl 280mM NaCl; 50mM HEPES; 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH7,05 gegeben und 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

b) G418-Resistenz (Southern u. Berg 1982)

Pro zu transfizierender DNA wurde 1 Petrischale mit  $1 \times 10^6$  Zellen angesetzt. Die Transfektion erfolgte nach dem unter a) dargestellten Schema. Bei der Applikation des Selektionsmediums wurden die Zellen gleichzeitig 1:3 verdünnt.

Die Transfektionslösung enthielt 1,5µg DNA des Plasmids pSV2NEO, 15µg DNA des nicht selektionierbaren Plasmids und 20µg carrier DNA.

### Präparation von DNA und RNA aus eucaryontischen Zellen

Die Zellen von jeweils 5 Petrischalen wurden für eine Präparation zusammengefaßt. Jede Petrischale wurde mit 10ml eiskaltem PBS (0,14M NaCl; 2,7mM KCl; 0,7mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6mM MgCl<sub>2</sub>; 6,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Die Zellen der ersten Schale wurden mit Hilfe eines Gummispatels in 8ml Lysis-Puffer (7M Harnstoff; 2% SDS; 0,35M NaCl; 1mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH8,0) aufgenommen, in die nächste Schale transferiert, deren Zellen in der selben Lösung aufgenommen usw. Das Lysat wurde 2x mit Phenol/Chloroform, 1x mit Chloroform extrahiert und mit CsCl auf eine Endkonzentration von 2,4M versetzt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman Ultracentrifuge, Swing Out Rotor SW40 16h bei 20°C mit 32000rpm über 2ml CsCl-Kissenlösung (5,7M CsCl; 0,1M EDTA). Die über dem Kissen befindliche genomische DNA wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, 16-24h gegen TNE (10mM Tris; 100mM NaCl; 5mM EDTA; pH7,5) dialysiert und durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol gefällt, 10min mit 10700xg abzentrifugiert, unter Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 1ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die pelletierte RNA wurde in 2ml 10mM Tris-HCl pH7,5 aufgenommen, Ethanol gefällt, unter Wasserstrahlvakuum getrocknet und ebenfalls in 1ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Transiente Transfektion (Gorman et al. 1982)

#### a) Transfektion

Pro zu transfizierender DNA wurden 2 Petrischalen mit je 1x10<sup>6</sup> Zellen angesetzt. Nach 24h wurden die Schalen mit 2x 10ml TBS (25mM Tris; 135mM NaCl; 5mM KCl; 0,7mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen und mit je 1ml Transfektionslösung 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Transfektionslösung: 10µg Plasmid-DNA wurden mit H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt und mit 0,5ml 1xTBS und 0,5ml 1mg/ml DEAE-Dextran in 1xTBS versetzt. Die Transfektionslösung

wurde mit 10ml TBS wieder abgewaschen und die Zellen wurden für 6h in Normalmedium mit 0,1mM Chloroquindiphosphat im Brutschrank inkubiert. Die Schalen wurden erneut mit je 10ml TBS gewaschen und für 40h mit Normalmedium weiterinkubiert, wobei 16h vor der Protein-Präparation das Medium mit  $10^{-3}$ M Dexamethason auf eine Endkonzentration von  $10^{-6}$  versetzt wurde.

#### b) Protein-Präparation

Die Schalen wurden mit je 10ml TBS gewaschen und die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummispatels in 1,2ml TBS aufgenommen. Die Zellen wurden 5min mit 8800xg abzentrifugiert und in 100 $\mu$ l 250mM Tris-HCl pH7,8 resuspendiert. Die Lösung wurde 10min in einem Trockeneis/Ethanol-Bad, dann 5min in einem 37°C Wasserbad inkubiert und anschließend kräftig durchmischt. Der Vorgang wurde noch 2x wiederholt. Die Zelltrümmer wurden 10min mit 8800xg abzentrifugiert und der Protein-haltige Überstand bei -20°C aufbewahrt.

#### ANALYTISCHE METHODEN

Alle Autoradiographien wurden auf Kodak X-AR Filmen unter Verwendung von Verstärkerfolie durchgeführt.

#### Präparation von niedermolekularer Träger-DNA (sd carrier DNA)

0,5g Lachs Spermien DNA wurden in 50ml 0,3M NaOH gelöst, 15min gekocht und mit 0,3M HCl neutralisiert. Nach Zugabe von 5ml 1M Tris-HCl pH7,5 wurde die Lösung Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 100ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, bis zur Entfernung anhaftenden Proteins Phenol/Chloroform extrahiert, nochmals Ethanol gefällt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Markierung von DNA mit Radionukleotiden

#### a) Endmarkierung

Zur Markierung von 1pmol dephosphorylierten 5'Enden wurden 10 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase und  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (ca 5000 Ci/mmol, 10mCi/ml) in einer Konzentration von 0,8-1 $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 25 $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen 30min bei 37°C in 50mM Tris-HCl pH7,6; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM DTT; 0,1mM Spermidin; 0,1mM EDTA.

#### b) Nick Translation

Es wurde der "Nick Translation Kit" der Firma Amersham benutzt. 500ng DNA wurden 3h bei 15°C in einem Reaktionsvolumen von 50 $\mu\text{l}$  mit 2,5 Einheiten DNA PolymeraseI; 100pg DNaseI; je 20 $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dTTP; 3,33 $\mu\text{M}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (ca 400 Ci/mmol, 10mCi/ml) in Tris-HCl pH7,5; MgCl<sub>2</sub>; Glycerol;  $\beta$ -Mercaptoethanol; BSA inkubiert.

Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 50 $\mu\text{l}$  10mM Tris-HCl pH7,5; 100mM NaCl; 10mM EDTA; 0,8% SDS; 20 $\mu\text{g}$  sd carrier DNA.

Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Gelfiltration.

### Gelfiltration

Biogel P60 (Fraktionierbereich 3000-60000 Dalton) wurde in 50mM NaCl; 0,5mM EDTA über Nacht gequollen. Eine Pasteurpipette wurde mit Glaswolle gestopft und mit Säulenmaterial gefüllt. Die DNA wurde in einem Volumen von 100 $\mu\text{l}$  aufgetragen und unter ständigem Nachfüllen von Puffer in 100 $\mu\text{l}$  Fraktionen eluiert. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden durch Cerenkow-Zählung identifiziert.

### Southern Transfer (Southern 1975)

#### a) Auftrennung

Je 10µg genomische DNA wurde mit den gewählten Restriktionsenzymen vollständig verdaut, die Fragmente wurden in einem Agarosegel (0,8% Agarose; 40mM Tris; 5mM NaAc; 1mM EDTA; pH7,7) bei einer Spannung von 40V elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in einer 1µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Das Gel wurde 40min in 250ml 1M NaOH inkubiert, die Lösung wurde durch Zugabe von 250ml 1M HCl; 1M Tris neutralisiert, das Gel 60min weiterinkubiert und anschließend für 20min in 20x SSC (3M NaCl; 0,3M tri-NaCitrat; pH6,5) transferiert.

#### b) Blot

Nitrocellulosefilter wurden durch je 5minütiges Baden in 6x SSC und 20x SSC vorbereitet. In eine Plastikwanne wurden ein Schwamm, 3 mit 20x SSC getränkte Blatt 3MM Papier, das Agarosegel, der Nitrocellulosefilter, 2 mit 20x SSC getränkte Blatt 3MM Papier, 2 Blatt trockenes 3MM Papier und ein Pack Papierhandtücher gestapelt. Als Laufmittel wurde 10x SSC verwendet. Nach dem Transfer wurde der Nitrocellulosefilter 10min in 6x SSC; 0,05% SDS gewaschen, an der Luft getrocknet und 2h bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

### Northern Transfer (McMaster u. Carmichael 1977)

#### a) Auftrennung

Je 10µg RNA wurde Ethanol gefällt und aufgenommen in 24µl PB-Denaturierungspuffer (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6,85; 50% DMSO; 6% Glyoxal), 3min auf 50°C erwärmt, auf Eis gestellt und mit 6µl 50% Glycerol; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6,85; 0,1% Bromphenolblau versetzt. Die RNA wurde bei 100V in einem Agarosegel (1% Agarose in Laufpuffer PB: 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6,85) aufgetrennt. Die RNA wurde 15min mit 0,03mg/ml Acridinorange in PB gefärbt und das

Gel durch 3x 15min Baden in PB wieder entfärbt.

b) Blot

Der Transfer der RNA auf Nitrocellulosefilter wurde wie für den Southern Transfer beschrieben durchgeführt. Als Laufmittel wurde 20xSSC verwendet, der Filter wurde vor dem Backen in 20x SSC gewaschen.

Hybridisierung von nick translatierter DNA an auf Nitrocellulosefilter fixierte Nukleinsäuren

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nitrocellulosefilter 1h bei 65°C in 4x SSC; je 0,02% BSA, PVP, Ficoll; 3,3% PiPPi (0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7,3; 1,5% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>); 0,1% SDS inkubiert und nach Zugabe von 20µg/ml sd carrier DNA für 1h weiterinkubiert.

Die Hybridisierung erfolgte über 20h bei 65°C in 4x SSC; 10mM EDTA; 0,1% SDS; 20µg/ml sd carrier DNA; 20-50ng/ml nick translatierter DNA (spez. Aktivität 0,5-4x10<sup>8</sup>cpm/µg). Das Volumen der Hybridisierungslösung errechnet sich aus der Größe des Filters in cm<sup>2</sup> x 13µl (das Volumen, um 1cm<sup>2</sup> Filterfläche zu benetzen) + 30% Überschuß. Wasser, sd carrier DNA und nick translatierte DNA wurden 10min gekocht, auf Eis abgekühlt und mit den restlichen Lösungen versetzt.

Unspezifisch gebundene DNA wurde entfernt durch 4maliges Waschen der Filter für je 30min bei 65°C in SSC; 0,1% SDS; 3% PiPPi, wobei die SSC Konzentration von 2x über 1x auf 0,5x abgesenkt wurde.

Die Filter wurden naß in Folie eingeschweißt und autoradiographiert.



### Auftrennung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen

#### a) Aufarbeitung der Probe

Die Nukleinsäuren wurden in Sanger Sequenzierungs Probenpuffer (100ml deionisiertes Formamid; 20mM EDTA; 0,03g Xylencyanol; 0,03g Bromphenolblau) aufgenommen, 3min gekocht, sofort auf Eis gestellt und möglichst rasch auf das Gel aufgetragen.

#### b) Gel

30ml einer Lösung aus 6% Acrylamid (19 Teile Acrylamid und 1 Teil N,N'-Methylenbisacrylamid) mit 8M Harnstoff in TBE (90mM Tris; 90mM Borsäure; 2,5mM EDTA; pH8,3) wurde nach Zugabe von 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,05% TEMED mit Hilfe von 2 Glasplatten und 2 Abstandshaltern zu einem Gel des Formats 40x20x0,015cm verarbeitet. Eine der Glasplatten wurde mit 0,3% Haftsilan in Ethanol beschichtet, die andere mit 5% Dimethyldichlorsilan in CCl<sub>4</sub>. Die Gele wurden 30min bei 30W vorlaufen gelassen, die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 30W. Nach der Elektrophorese wurde die silikonisierte Glasplatte abgehoben und das auf der anderen Glasplatte haftende Gel 10min in 10%iger HAC gewaschen, unter fließendem Wasser gespült, bei 80°C getrocknet und autoradiographiert.

### S1-Analyse

50µg RNA wurden zusammen mit 0,01-0,05pmol endmarkierter DNA Ethanol gefällt und in 10µl Hybridisierungspuffer (80% deionisiertes Formamid; 40mM PIPES pH6,4; 1mM EDTA; 400mM NaCl) aufgenommen. Nach 10minütiger Denaturierung bei 85°C wurden die Proben ohne zwischenzeitliche Abkühlung bei der entsprechenden Temperatur über Nacht hybridisiert. Anschließend wurden die Proben 40min bei 30°C mit 60 Einheiten S1 Nuklease in 100µl 0,3M NaCl; 30mM NaAc pH4,6; 3mM ZnSO<sub>4</sub>; 2µg sd carrier DNA behandelt.

Die Lösung wurde Phenol/Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 8µg Hefe RNA ohne zusätzliches Salz Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 2µl Probenpuffer aufgenommen und unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

#### SP6-Analyse (Melton et al. 1984)

##### a) Präparation der Probe

1.  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP: 1µg linearisierte Plasmid-DNA wurde 1h bei 40°C mit 1 Einheit SP6 Polymerase und 30 Einheiten RNasin in 20 µl 40mM Tris-HCl pH7,5; 6mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM Spermidin; 10mM DTT; 10µg/ml BSA; je 10mM ATP, CTP, GTP; 45µM UTP; 5µM  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (20mCi/ml, 400Ci/mmol) inkubiert.

2.  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP: 1µg linearisierte Plasmid-DNA wurde unter sonst identischen Bedingungen mit je 10mM ATP, CTP, UTP; 12,5µM GTP und 12,5µM  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (10mCi/ml, 400Ci/mmol) inkubiert.

Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe von 1µl RNasin (20 Einheiten/µl) und 1µl DNase (400ng/µl) 10min bei 37°C weiterinkubiert, Phenol/Chloroform extrahiert, und unter Verwendung von 2M NH<sub>4</sub>Ac Ethanol gefällt. Die Probe wurde in 2M NH<sub>4</sub>Ac/Ethanol bei -20°C aufbewahrt.

##### b) Analyse

20-40µg RNA wurden mit 0,5% der präparierten Probe in 2M NH<sub>4</sub>Ac Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde aufgenommen in 30µl 80% deionisiertes Formamid; 40mM PIPES pH6,4; 400mM NaCl; 1mM EDTA und 5min bei 85°C denaturiert, anschließend ohne Zwischenabkühlung über Nacht bei 45°C hybridisiert. Die Proben wurden 1h bei 30°C mit 12µg RNase A und 25 Einheiten RNaseT in 300µl 10mM Tris-HCl pH7,5; 300mM NaCl; 5mM EDTA behandelt. Die RNasen wurden durch 15minütige Inkubation mit 0,5% SDS; 1µg Proteinase K bei 37°C inaktiviert. Die Proben wurden

Phenol/Chloroform extrahiert, nach Zugabe von 5µg tRNA ohne zusätzliches Salz Ethanol gefällt, in 2µl Probenpuffer aufgenommen und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

#### Sequenzierung von DNA nach Maxam und Gilbert (1980)

Es wurde der "Sequencing Kit" der Firma New England Nuclear verwendet. 1µg an einem Ende radioaktiv markierte DNA wurde in 42µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die folgenden Reaktionen aufgeteilt:

Guaninspezifische Reaktion (G-Rkt.): 5µl DNA wurden zusammen mit 1µl sd carrier DNA (8µg/µl), 200µl G-Rkt.-Puffer und 1µl DMS 6min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl G-Stop-Lösung, 750µl Ethanol und Transfer in ein Trockeneis/Ethanol-Bad beendet.

Guanin- und Adeninspezifische Reaktion (G+A-Rkt.): 10µl DNA wurden mit 1µl sd carrier DNA, 9µl H<sub>2</sub>O und 2µl Piperidinformat pH2,0 30min bei 37°C inkubiert, gefriergetrocknet, in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und nochmals gefriergetrocknet.

Adenin- und Cytosinspezifische Reaktion (A+C-Rkt.): 10µl DNA wurden mit 1µl sd carrier DNA und 100µl 1,2N NaOH; 1mM EDTA für 10min auf 90°C erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150µl 1N HAc; 4µg tRNA; 750µl Ethanol und Transfer in ein Trockeneis/Ethanol-Bad beendet.

Cytosinspezifische Reaktion (C-Rkt.): 5µl DNA wurden mit 1µl sd carrier DNA, 15µl 5M NaCl und 30µl Hydrazin 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200µl Hydrazin-Stop-Lösung, 750µl Ethanol und Transfer in ein Trockeneis/Ethanol-Bad beendet.

Thymin- und Cytosinspezifische Reaktion (T+C-Rkt.): 10µl DNA wurden mit 1µl sd carrier DNA, 12µl H<sub>2</sub>O und 30µl Hydrazin 10min

bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde wie die C-Rkt. beendet.

Die ausgefallenen Nukleinsäuren der G-, A+C-, C- und T+C-Reaktionen wurden 10min mit 8800xg abzentrifugiert, in 250µl 0,3M NaAc aufgenommen, mit 750µl Ethanol versetzt, für 10min bei -80°C weiterinkubiert, erneut abzentrifugiert, 2x mit je 1ml 80% Ethanol gewaschen und unter Wasserstrahlvakuum getrocknet. Alle Reaktionen wurden in 100µl 1M Piperidin aufgenommen, für 30min auf 90°C erhitzt, über Nacht in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, in 40µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, nochmal eingedampft und in Probenpuffer aufgenommen. Durch die Menge zugegebenen Probenpuffers wurde die Aktivität der einzelnen Proben auf das selbe Niveau eingestellt. 2-Nukleotid-Reaktionen erhielten die doppelte Anzahl cpm/µl wie 1-Nukleotid-Reaktionen. Von jeder Reaktion wurden 2µl unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

#### Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase Aktivität (CAT-Assay)

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden nach der Methode von Lowry et al. 1951 bestimmt.

2µl <sup>14</sup>C-Chloramphenicol (53mCi/mmol, 200µCi/ml) wurden in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und mit 80µl Proteinextrakt in TBS (25mM Tris-HCl pH7,4; 137mM NaCl; 5mM KCl; 0,7mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und 20µl Acetyl-CoEnzymA (3,52mg/mlTBS) für 2h oder 5h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1ml Ethylacetat extrahiert. Bei 5stündiger Inkubation wurde nach 2h ein weiteres Aliquot Acetyl-CoEnzymA zugegeben. Der Extrakt wurde in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, in 20µl Ethylacetat aufgenommen und mit Chloroform:Methanol=9:1 als Laufmittel auf einer Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetrennt.

Die Platten wurden an der Luft getrocknet und autoradiographiert.

## ERGEBNISSE

Die provirale Sequenz des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) Genoms wurde erfolgreich als Modellsystem zum Studium Glucocorticoid-regulierbarer Gene verwendet. Es gelang, ein DNA-Fragment von 143bp einzugrenzen, das die Expression des Virusgenoms hormoninduzierbar macht. Dieses "hormone response element" HRE ist zwischen den Nukleotiden -202 und -59 vor der Initiationsstelle der Transcription im LTR lokalisiert. Es besitzt Eigenschaften, die es als Enhancer auszeichnen: Das HRE ist in der Lage in einer Chimärenkonstruktion das  $\alpha$ -Globingen der Maus unabhängig von Orientierung, Position und Abstand zu aktivieren. Diese Eigenschaft entfaltet das HRE erst unter dem Einfluß von Glucocorticoidhormonen, das HRE von MMTV ist ein konditionaler Enhancer.

### ANALYSE DER ENHANCER - EIGENSCHAFT DES HRE

Im ersten Teil meiner Doktorarbeit habe ich funktionelle Eigenschaften des HREs mit Hilfe weiterer Indikatorgene untersucht.

Als erstes Testgen habe ich ein  $\beta$ -Globingen verwendet. Die Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globingen wird durch Rekombination mit Enhancer-Sequenzen unterschiedlich beeinflusst: Beide Gene wurden mit dem SV40 Enhancer gekoppelt und transient in HeLa-Zellen transfiziert. Während das  $\alpha$ -Globingen auch in Abwesenheit der Enhancer-Sequenzen exprimiert wurde und die Gegenwart der SV40 Sequenzen nur eine 5-10fache Steigerung der Transcriptionsrate bewirkte, war die Expression des  $\beta$ -Globingens ohne

Enhancer-Sequenzen nicht mehr nachweisbar, wurde aber durch die SV40 Sequenzen stark erhöht: deduziert aus der Nichtnachweisbarkeit der Transcription in Abwesenheit des Enhancers mindestens 100fach (Treisman et al. 1983).

Als zweites Testgen habe ich das Thymidinkinasegen (TK) des Herpes simplex Virus (HSV) verwendet. An Hand von Chimärenkonstruktionen mit diesem Gen waren die Grenzen des HREs definiert worden (Ponta et al. 1985). Das HSV TK-Gen unterscheidet sich in seiner Sequenz stark vom endogenen TK-Gen höherer Zellen. Dennoch kann das virale Protein ein fehlendes eucaryontisches ersetzen. Das HSV TK-Gen wird bei Gentransfer-Experimenten zur Selektion stabil transfizierter Zellen eingesetzt (Wigler et al 1977).

### KONSTRUKTION DER REKOMBINANTEN

Die letzte Zahl der Bezeichnungen der Konstrukte bezieht sich auf die räumliche Zuordnung von HRE zum Indikatorgen:

- 1 : HRE in 5'Position syn Orientierung
- 2 : HRE in 5'Position anti Orientierung
- 3 : HRE in 3'Position syn Orientierung
- 4 : HRE in 3'Position anti Orientierung

Für die funktionelle Analyse des HREs wurden folgende Subfragmente des MMTV-Genoms verwendet:

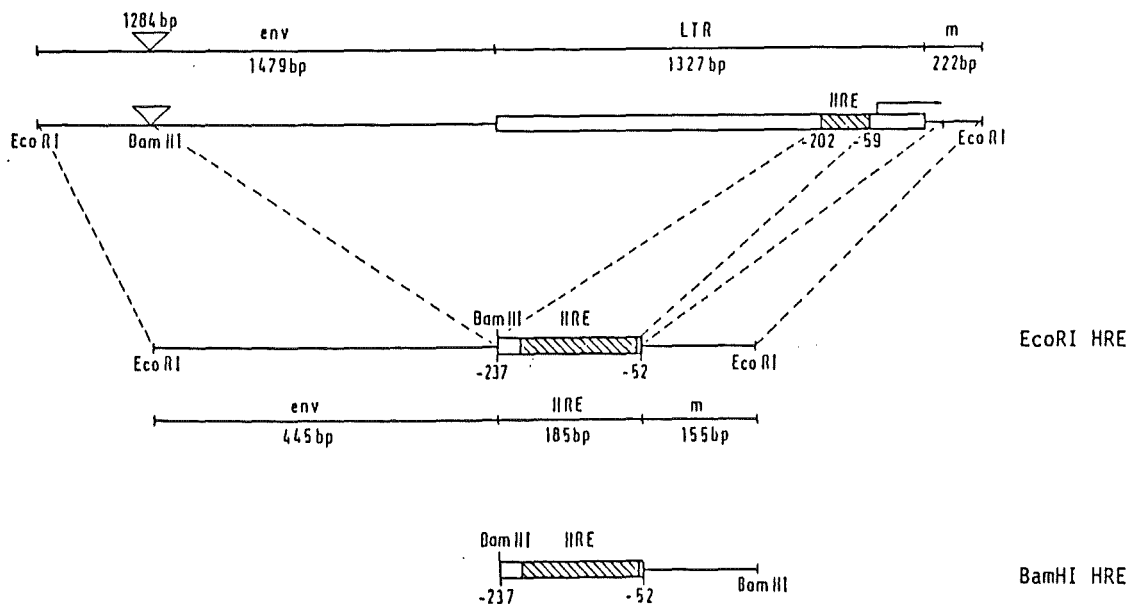


Abb.3: Herkunft der DNA-Sequenzen der getesteten HRE-Fragmente.

m = flankierende Maus-Sequenzen. Sie stammen von der ursprünglichen Klonierung proviraler DNA her. Der Pfeil markiert den MMTV Transkriptionsstart, das Dreieck symbolisiert deletierte env-Sequenzen.



pBglob

Aus DNA des Plasmids pMHB (Chao et al. 1983) wurde ein PstI Subfragment isoliert. Es enthält 1.2kb 5'flankierende Sequenzen, das 1.Exon, das 1.Intron und das 2.Exon bis zur BamHI Rss des Maus  $\beta$ -Globingens, das 2.Exon ab der BamHI Rss, das 2.Intron, das 3.Exon und 450bp 3'flankierende Sequenzen des menschlichen  $\beta$ -Globingens. Plasmid DNA des Vektors pUC9 wurde an ihrer singulären BamHI Rss linearisiert und DNA des BamHI HREs in beiden Orientierungen inseriert. DNA beider Konstrukte wurde an ihren singulären PstI Rss linearisiert und das PstI  $\beta$ -Globin-Subfragment jeweils in beiden Orientierungen inseriert.

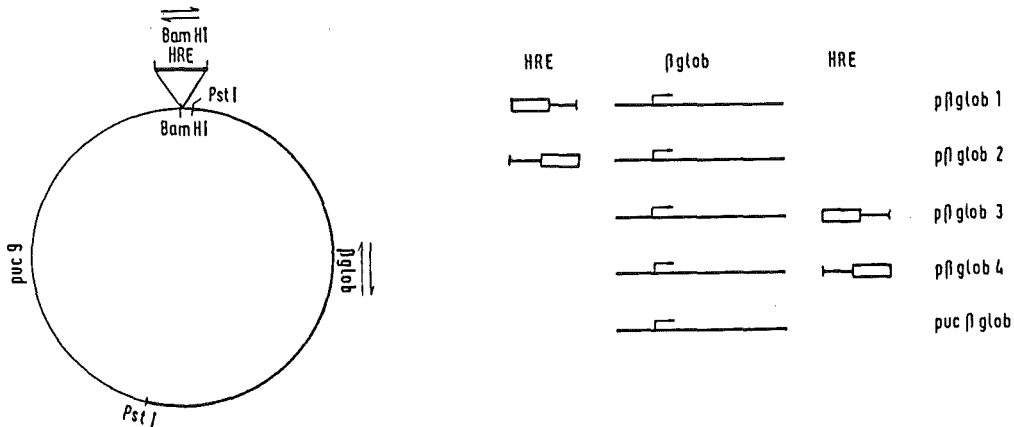


Abb.4: Schematische Darstellung der pBglob Plasmide. Die Abstände zwischen HRE und Transcriptionsstart betragen 1,35kb (1), 1,2kb (2), 1,9kb (3) und 2,05kb (4).

Für alle weiteren Rekombinanten wurde das TK-Gen verwendet.

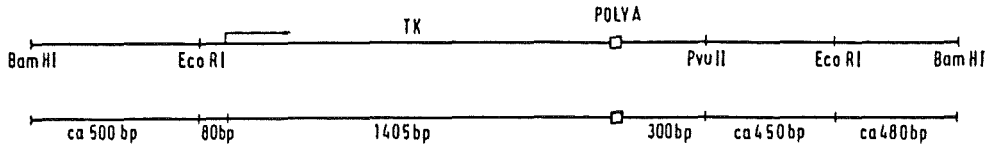


Abb.5: Restriktionskarte des TK-Gens (McKnight 1980). Der Pfeil markiert Transcriptionsstart und -richtung. Poly A = Polyadenylierungs-Signal.

pSP1

Das Plasmid pGRAL wurde konstruiert durch Insertion eines EcoRI MMTV-Subfragments in DNA eines an ihrer singulären EcoRI Rss linearisierten pBR322 Vektors. Das MMTV-Subfragment beinhaltet 2,7kb env-Sequenzen, den gesamten LTR von 1,3kb und 222bp 3'flankierende Maus-Sequenzen des ursprünglichen Integrationsorts. DNA des Plasmids pGRAL wurde partiell EcoRI restriktionsverdaut, linearisierte Moleküle wurden isoliert und in jeweils beiden Orientierungen mit dem EcoRI TK-Subfragment rekombiniert.

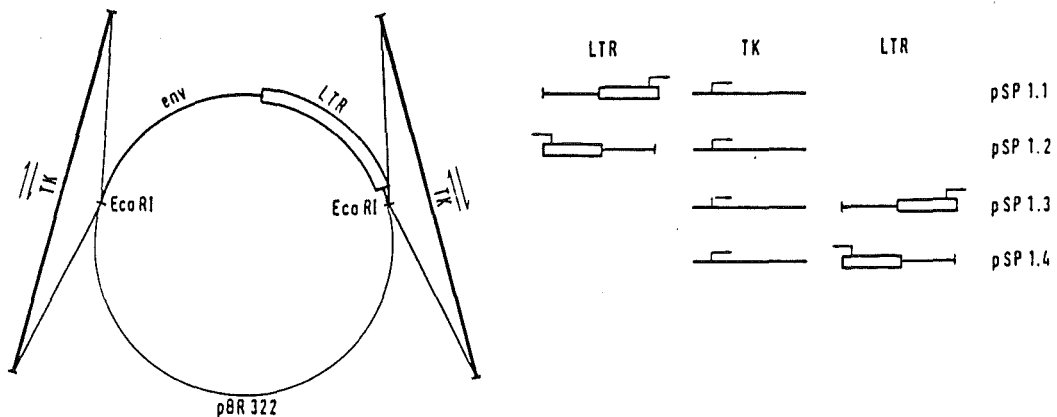


Abb.6: Schematische Darstellung der pSP1 Plasmide. Die Abstände zwischen HRE und Transcriptionsstart betragen 0,49kb (1), 2,5kb (2), 4,6kb (3) und 2,5kb (4).

pSP2

Aus DNA des Plasmids M2 (Wilkie et al. 1979) wurde ein BamHI TK-Subfragment isoliert. Es enthält 600bp 5'flankierende Sequenzen, 1,6kb TK kodierende Sequenzen und 1,2kb 3'flankierende Sequenzen. Das TK-Subfragment wurde in DNA eines an ihrer singulären BamHI Rss linearisierten pUC9 Vektors inseriert. DNA einer der beiden möglichen Orientierungen wurde isoliert und partiell BamHI restriktionsverdaut. Linearisierte Moleküle wurden isoliert und mit DNA des BamHI HREs in jeweils beiden Orientierungen rekombiniert.

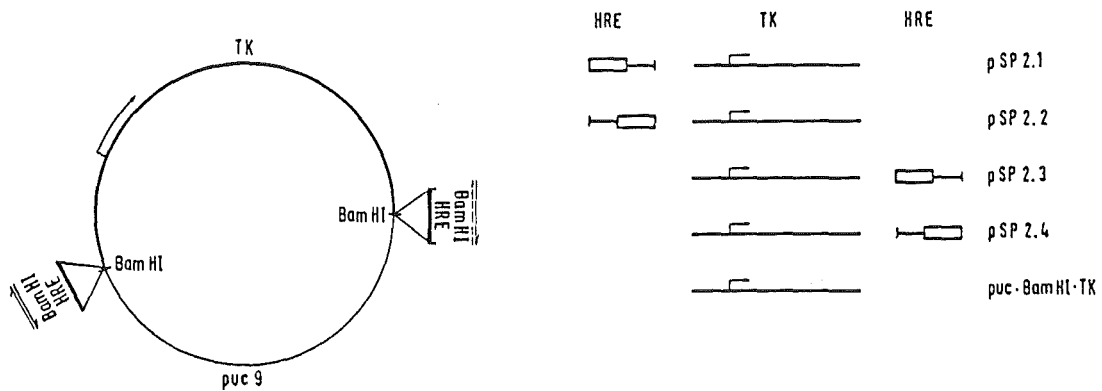


Abb.7: Schematische Darstellung der pSP2 Plasmide. Die Abstände zwischen HRE und Transcriptionsstart betragen 0,75kb (1), 0,6kb (2), 2,6kb (3) und 2,75kb (4).

pSP3

Aus DNA des Plasmids M2 wurde ein EcoRI TK-Subfragment isoliert. Es enthält 80bp 5'flankierende Sequenzen, 1.6kb TK kodierende Sequenzen und 750bp 3'flankierende Sequenzen. Das TK-Subfragment wurde in DNA eines an ihrer singulären EcoRI Rss linearisierten pUC9 Vektors inseriert. DNA beider möglicher Orientierungen wurde isoliert, an ihrer singulären BamHI Rss linearisiert und mit DNA des BamHI HREs in jeweils beiden Orientierungen rekombiniert.

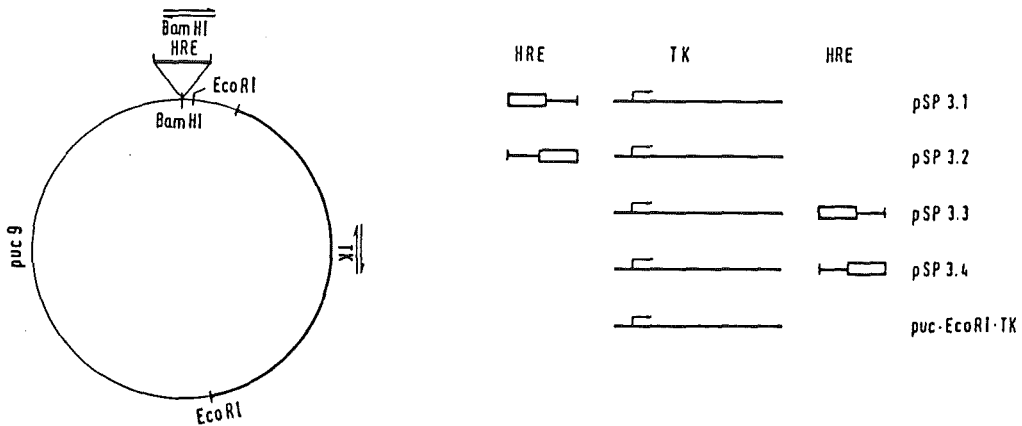


Abb.8: Schematische Darstellung der pSP3 Plasmide. Die Abstände zwischen HRE und Transcriptionsstart betragen 0,23kb (1), 80bp (2), 2,15kb (3) und 2,3kb (4).

### pHRE.TK

Das Plasmid M105 wurde konstruiert durch Rekombination eines EcoRI-PvuII TK-Subfragments mit 80bp 5'flankierenden Sequenzen, 1.6kb kodierender Region und 300bp 3'flankierenden Sequenzen mit einem EcoRI-PvuII Subfragment des Vektors pBR322. DNA des Plasmids M105 wurde an ihrer singulären EcoRI Rss linearisiert und in beiden Orientierungen mit DNA des EcoRI HREs rekombiniert

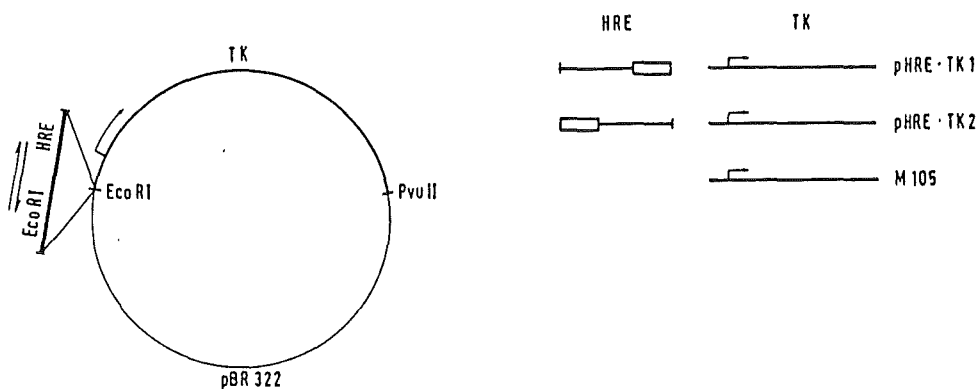


Abb.9: Schematische Darstellung der pHRE.TK Plasmide. Die Abstände zwischen HRE und Transcriptionsstart betragen 0,23kb (1) und 0,53kb (2).

pM105.HRE

DNA des Plasmids M105 wurde an ihrer singulären PvuII Rss oder ihrer singulären NdeI Rss linearisiert. Die linearisierten Moleküle wurden mit BamHI Linkern versehen und in jeweils beiden Orientierungen mit DNA des BamHI HREs rekombiniert.

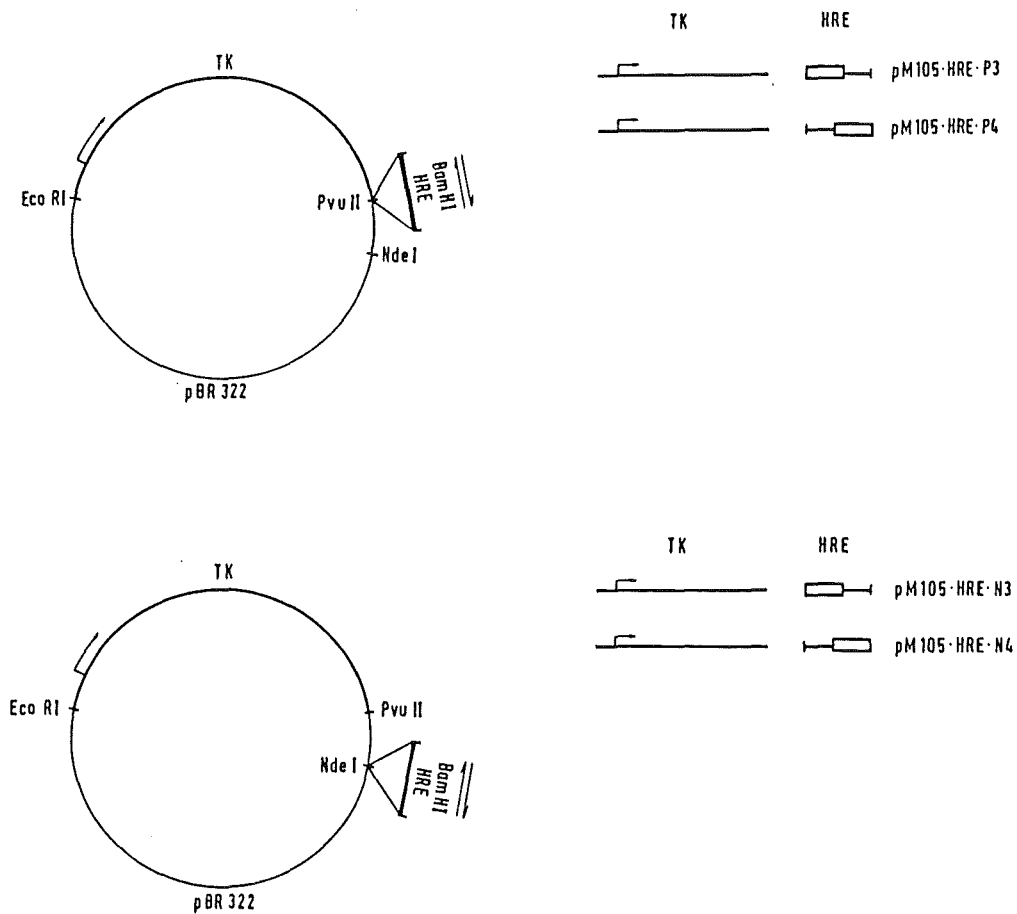


Abb.10: Schematische Darstellung der pM105.HRE Plasmide. Die Abstände zwischen HRE und Transcriptionsstart betragen 1,95kb (N3), 2,1kb (N4), 1,7kb (P3) und 1,85kb (P4).

#### ANALYSE DER HORMONINDUZIERBARKEIT DER REKOMBINANTEN

DNA der einzelnen Plasmide wurde stabil in LTK<sup>-</sup>-Zellen transfiziert. Die  $\beta$ -Globin-Rekombinanten und ein Teil der TK-Rekombinanten wurden mit DNA des Plasmids pSV2NEO, das Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 vermittelt (Southern u. Berg 1982), kotransfiziert. Auf die Aufnahme der übrigen TK-Rekombinanten wurde direkt selektioniert. Jeweils 20 bis 100 stabile Einzelklone wurden zu einer Massenkultur zusammengefaßt. Ansätze von je 10 vollgewachsenen Petrischalen wurden geteilt und die Hälfte wurde für 16 Stunden mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason behandelt. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und auf die Menge korrekt initiiertes TK- bzw.  $\beta$ -Globin-Transcripte untersucht.

#### Bestimmung der Menge korrekt initiiertes $\beta$ -Globin-Transcripte

Die Menge korrekt initiiertes  $\beta$ -Globin-Transcripte wurde durch eine SP6-Analyse bestimmt (Melton et al. 1984). Mit Hilfe des Promotors des Phagen SP6 wird in vitro eine der zu untersuchenden mRNA komplementäre radioaktiv markierte RNA synthetisiert. Sie umfaßt nicht nur kodierende Sequenzen, sondern auch solche aus dem 5'flankierenden Bereich. Der den kodierenden Sequenzen komplementäre Bereich dieser "antisense RNA" wird durch Hybridisierung mit der spezifischen mRNA doppelsträngig. Anschließende Behandlung mit Einzelstrang-spezifischen RNasen verkürzen die "antisense RNA" auf den von der mRNA geschützten Bereich. Die Länge dieses Fragments wird durch Auftrennung der RNA-Moleküle auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel bestimmt. Die Schwärzung der spezifischen Bande auf der anschließenden Autoradiographie ist ein direktes Maß für die Menge spezifischer mRNA.





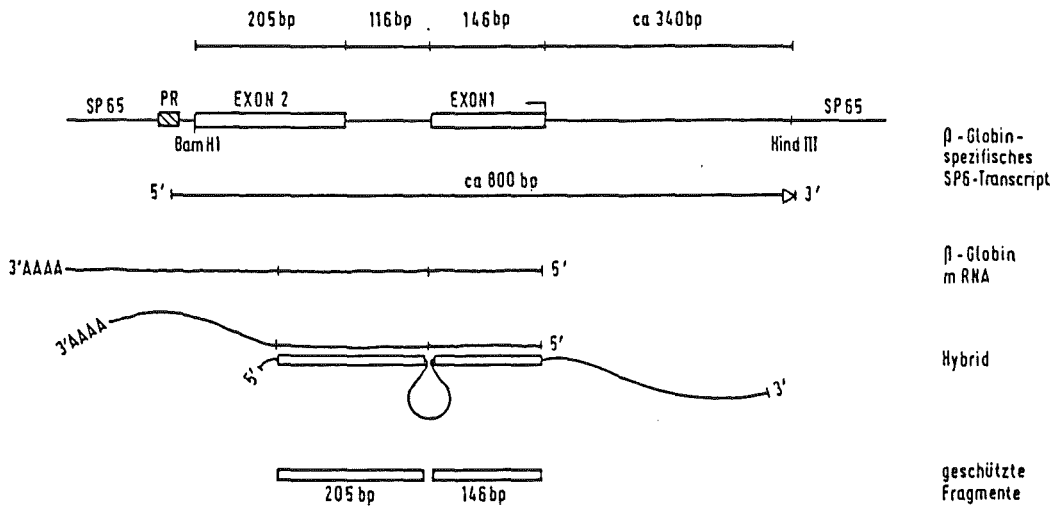


Abb.11:  $\beta$ -Globin spezifische SP6-Probe

Um eine  $\beta$ -Globin spezifische SP6-Probe zu erhalten, wurde ein HindIII-BamHI Subfragment des Plasmids pMHB in DNA eines HindIII-BamHI restriktionsverdauten Vektors SP65 inseriert. Das  $\beta$ -Globin-Subfragment enthält 340bp 5'flankierender Sequenzen, das 1.Exon, das 1.Intron und das 2.Exon bis zur BamHI Rss. Für die Synthese  $\beta$ -Globin spezifischer antisense RNA wurde DNA dieses Plasmids an ihrer singulären HindIII Rss linearisiert. Die Länge des Transcripts beträgt 800 Basen. Durch Hybridisierung mit spezifischer  $\beta$ -Globin mRNA werden die Bereiche des 1.Exons und des 2.Exons bis zur BamHI Rss vor dem anschließenden RNase-Verdau geschützt. Die indikativen Fragmente haben somit eine Länge von 205 und 146 Basen.

PR = SP6-Promotor.

Abb. 12

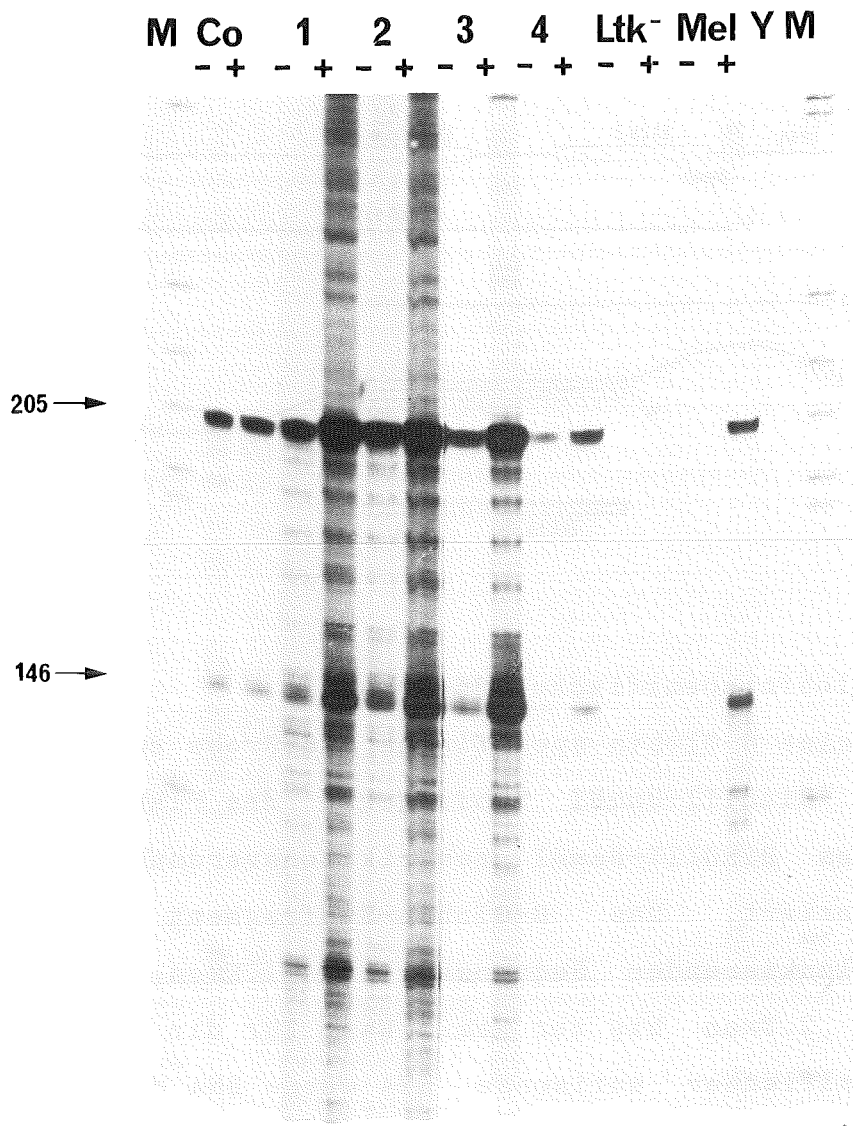
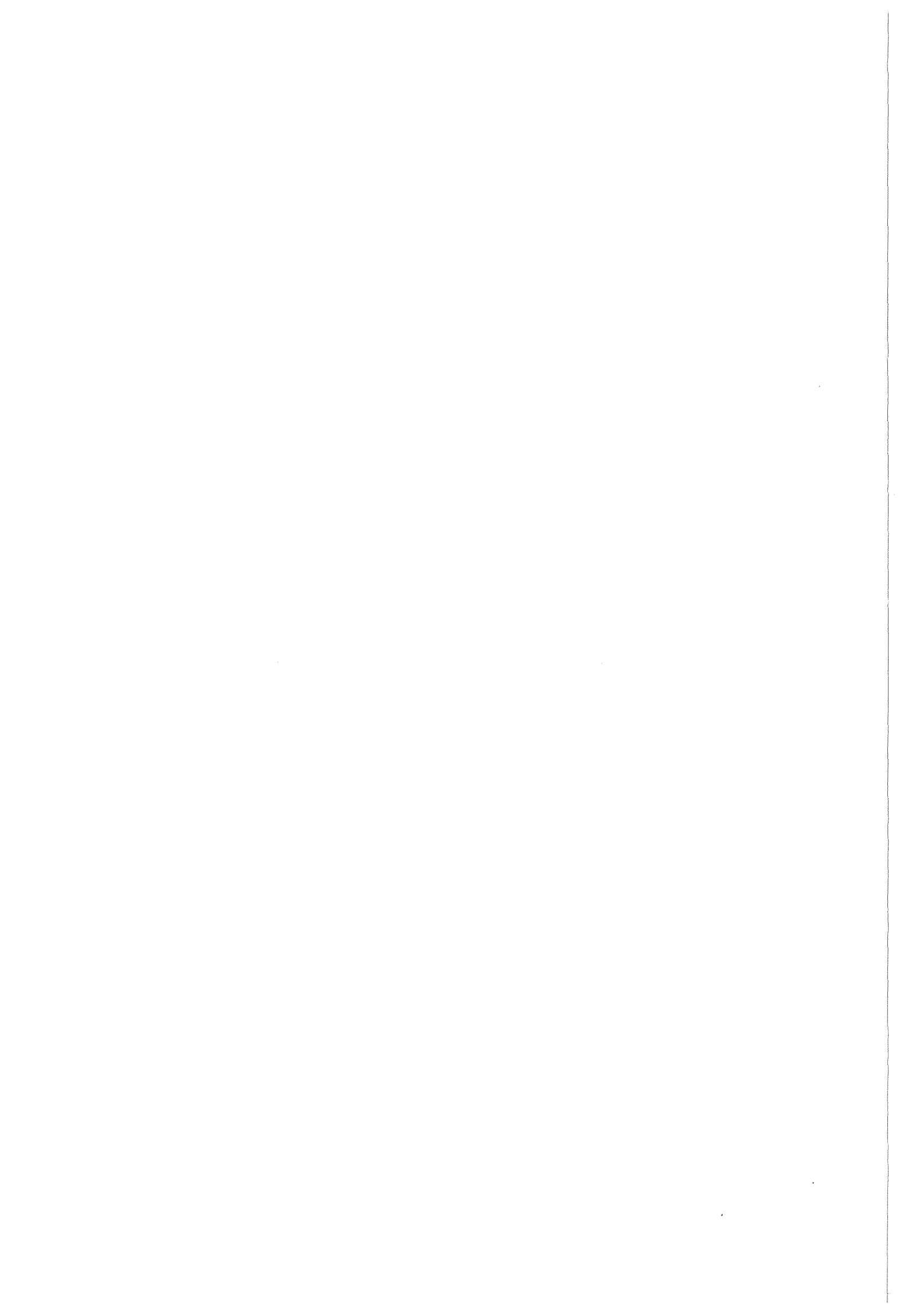


Abb.12: Autoradiographie der SP6-Analyse korrekt initiiertes  $\beta$ -Globin-Transcripte. Die Zellen wurden stabil transfiziert mit DNA der Plasmide p $\beta$ glob1 (1), p $\beta$ glob2 (2), p $\beta$ glob3 (3), p $\beta$ glob4 (4) und pUC $\beta$ glob (Co). RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. Ltk<sup>-</sup> = RNA untransfizierter Zellen, MEL<sup>-</sup> = RNA unbehandelter MEL-Zellen, MEL<sup>+</sup> = RNA DMSO-induzierter MEL-Zellen, M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA

Das transfizierte  $\beta$ -Globingen wird in Ltk<sup>-</sup>-Zellen exprimiert. Der Vergleich mit RNA von DMSO-behandelten Maus Erythroleukämie (MEL) Zellen zeigt, daß die  $\beta$ -Globin-Transcripte an der authentischen cap site starten. MEL-Zellen gehören der hematopoetischen Linie an. Sie sind in einem relativ späten Stadium der Erythropoese blockiert, Behandlung mit DMSO induziert aber die Differenzierung und damit die Transcription der Globingene (Friend et al. 1971, Ross et al. 1972). Das BamHI HRE vermittelt dem transfizierten  $\beta$ -Globingen in Ltk<sup>-</sup>-Zellen unabhängig von Abstand, Position und Orientierung Hormoninduzierbarkeit. Damit wurde die Eigenschaft des HREs als konditionaler Enhancer zu wirken, an einem weiteren Gen nachgewiesen.



Bestimmung der Menge korrekt initiiertes TK-Transcripte

Die Menge korrekt initiiertes TK-Transcripte wurde durch eine S1-Analyse bestimmt (Berk u. Sharp 1977). Eine DNA Probe, die sowohl kodierende als auch 5'flankierende Sequenzen des Gens der zu quantifizierenden mRNA umfaßt, wird an dem der RNA komplementären Strang radioaktiv endmarkiert. Die DNA Stränge der Probe werden aufgeschmolzen und mit der zu analysierenden RNA hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Länge der komplementären Sequenzen zwischen zu testender mRNA und DNA Probe. Einzelsträngige Bereiche des Hybrids werden durch Behandlung mit Nuklease S1 abgebaut. Die Länge der geschützten Sequenz wird durch Auftrennung auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel bestimmt. Die Schwärzung der Banden auf der anschließenden Autoradiographie ist ein direktes Maß für die Menge spezifischer Transcripte.

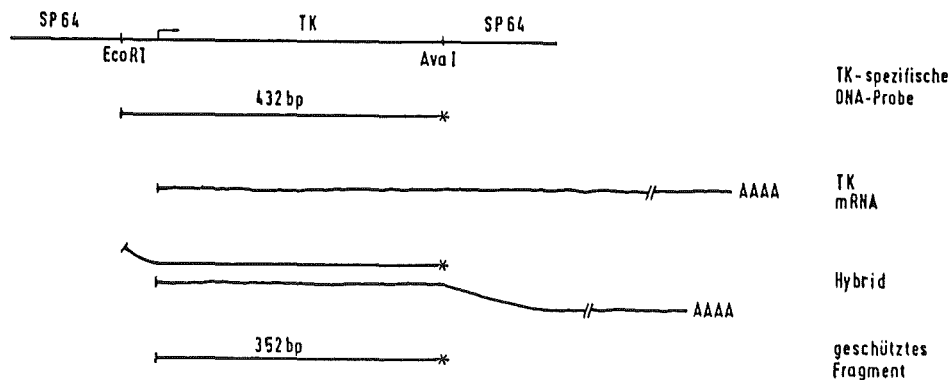
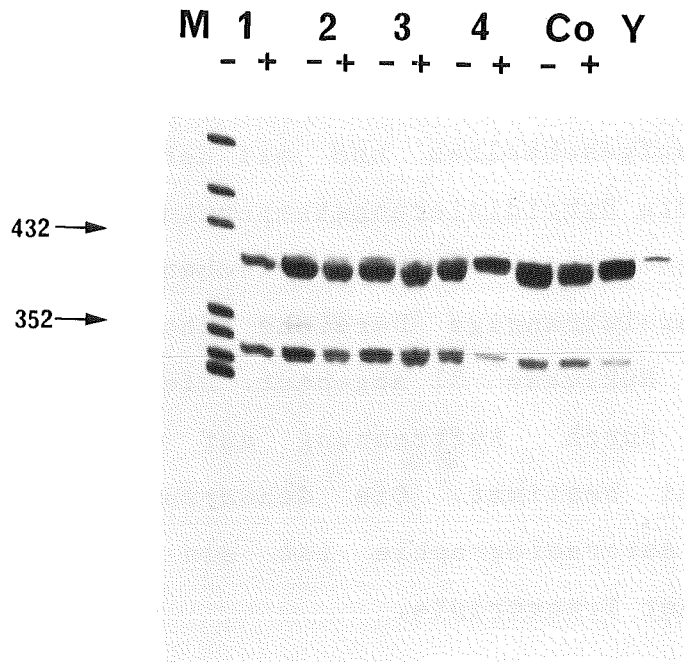


Abb.13: TK-spezifische S1-Probe. Als spezifische Probe wurde ein EcoRI-AvaI TK-Subfragment isoliert, das 80bp 5'flankierende Sequenzen und 352bp aus der kodierenden Region enthält, und an der AvaI Rss radioaktiv endmarkiert. Durch die Hybridisierung mit TK-spezifischer mRNA werden die 352bp aus der kodierenden Region vor dem Abbau durch Nuklease S1 geschützt.

Abb.14



Die erste Serie getesteter TK-Konstrukte, die Plasmide der Reihe pSP2, rekombiniert das BamHI HRE mit dem 3,4kb BamHI TK-Subfragment (Abb.7)

Abb.14: Autoradiographie der S1-Analyse korrekt initiiertes TK-Transcripte. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pSP2.1 (1), pSP2.2 (2), pSP2.3 (3), pSP2.4 (4) und pUC.Bam.TK (Co) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA

Das BamHI TK-Subfragment wird in Ltk<sup>-</sup>-Zellen exprimiert. Das HRE vermittelt dem TK-Promotor nur eine sehr schwache Hormoninduzierbarkeit.

Die Definition des HRE als diejenige Sequenz, die sowohl dem MMTV-Promotor selbst, als auch einem heterologen Promotor Hormoninduzierbarkeit vermittelt, war unter Verwendung eines TK-Subfragments mit kryptischem Promotor erfolgt. Der vollständige Promotor des HSV-TK Gens umfaßt die 105bp vor der Initiationsstelle. Dieser Bereich enthält neben einer TATA-Box (Position -21 bis -26), eine CAAT-Box (Position -85 bis -89), die von zwei GC-Boxen (Positionen -50 bis -55 und -98 bis -103) umschlossen wird. Das Fehlen der distalen GC-Box und der CAAT-Box im kryptischen Promotor (80bp zwischen EcoRI Rss und cap site) reduziert die Expression des TK-Gens auf 10% (McKnight et al 1981 und 1984).

Abb.15

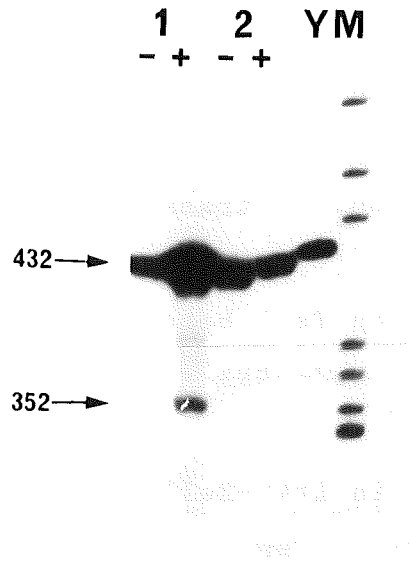
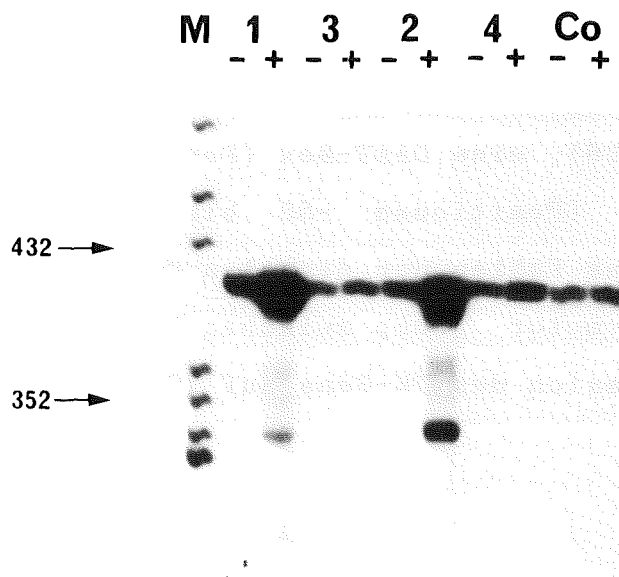


Abb.16





Die zweite Serie getesteter TK-Konstruktionen, die Plasmide der Reihe pHRE.TK, rekombiniert das EcoRI HRE in 5'Position mit dem 1,7kb EcoRI-PvuII TK-Subfragment (Abb.9)

Abb.15: Autoradiographie der S1-Analyse korrekt initiiertes TK-Transcripte. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pHRE.TK1 (1) und pHRE.TK2 (2) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA

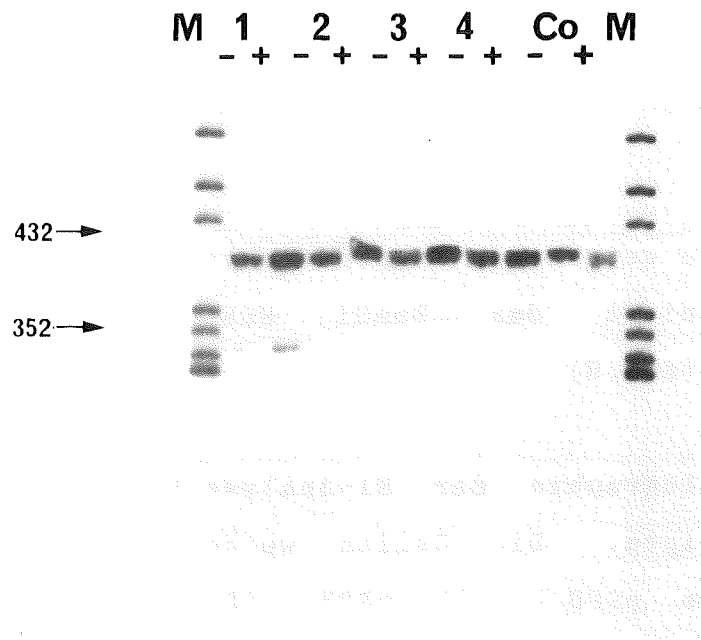
Das EcoRI HRE vermittelt dem kryptischen TK-Promotor aus 5'Position syn Orientierung Hormoninduzierbarkeit. Aus anti Orientierung dagegen erfolgt keine Aktivierung.

Um auszuschließen, daß die env-Sequenzen des EcoRI HREs einen Einfluß auf die Induzierbarkeit des kryptischen TK-Promotors haben, wurden sie in einer weiteren Serie von Rekombinanten entfernt.

Die dritte Serie getesteter TK-Konstrukte, die Plasmide der Reihe pSP3, rekombiniert das BamHI HRE mit dem 2,3kb EcoRI TK-Subfragment (Abb.8)

Abb.16: Autoradiographie der S1-Analyse korrekt initiiertes TK-Transcripte. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pSP3.1 (1), pSP3.2 (2), pSP3.3 (3), pSP3.4 (4) und pUC.EcoRI.TK (Co) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. M = DNA-Größenmarker

Abb.17



In 5'Position syn Orientierung inseriert, vermittelt das HRE dem kryptischen TK-Promotor Hormoninduzierbarkeit. Die env-Sequenzen haben keinen Einfluß. Induktion erfolgt ebenfalls aus 5'Position anti Orientierung. Hinter die kodierende Region inseriert, ist das HRE dagegen völlig inaktiv.

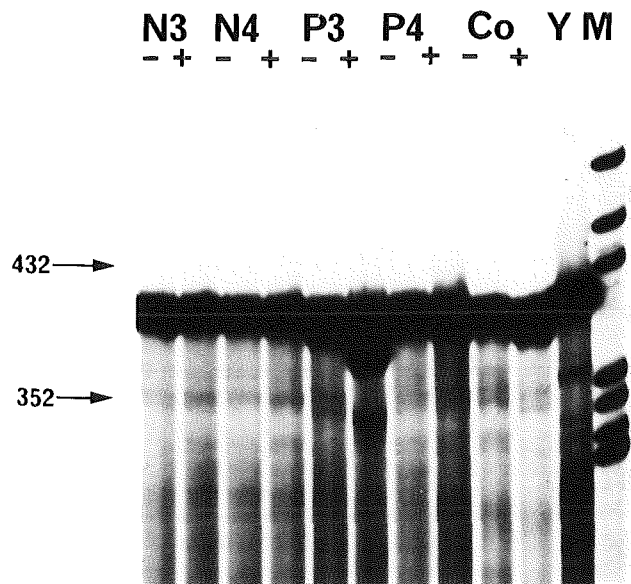
Die mangelnde Fähigkeit des HREs dem kryptischen TK-Promotor aus einer 3'Position Induzierbarkeit zu vermitteln, könnte in einem Fehlen relevanter Bestandteile der umgebenden LTR-Sequenzen begründet sein. Um dies zu überprüfen, wurde der gesamte LTR in die Analyse einbezogen.

Die vierte Serie getesteter TK-Konstrukte, die Plasmide der Reihe pSP1, rekombiniert den gesamten LTR mit dem 2,3kb EcoRI TK-Subfragment (Abb.6)

Abb.17: Autoradiographie der S1-Analyse korrekt initiiertes TK-Transcripte. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pSP1.1 (1), pSP1.2 (2), pSP1.3 (3), pSP1.4 (4) und pUC.EcoRI.TK (Co) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. M = DNA-Größenmarker

Rekombination des kryptischen TK-Promotors mit den gesamten LTR-Sequenzen führt nur in 5'Position syn Orientierung zu Induzierbarkeit.

Abb. 18



Das Ergebnis der Analyse der pSP3 Konstrukte macht es wahrscheinlich, daß eine physische Nähe des HREs zu den übrigen Elementen des kryptischen TK-Promotors notwendig ist, um Induzierbarkeit zu erreichen. Daher wurde in einer letzten Serie von Rekombinanten untersucht, ob ein Heranrücken des HREs an das Ende der transkribierten Sequenz eine Induzierbarkeit aus 3'Position ermöglicht.

Die fünfte Serie getesteter TK-Konstrukte, die Plasmide der Reihe pM105.HRE, rekombiniert das BamHI HRE in 3'Position mit dem 1,7kb EcoRI-PvuII TK-Subfragment (Abb.10)

Abb.18: Autoradiographie der S1-Analyse korrekt initiiertes TK-Transcripte. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pM105.HRE.P3 (P3), pM105.HRE.P4 (P4), pM105.HRE.N3 (N3), pM105.HRE.N4 (N4) und M105 (Co) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA.

Keine der vier Rekombinanten ist hormoninduzierbar. Auch ein Heranrücken bis auf 300bp hinter das Polyadenylierungssignal kann dem kryptischen TK Promotor keine Induzierbarkeit durch das HRE aus 3'Position vermitteln.

Das HRE vermittelt dem gekoppelten TK-Gen nicht in jedem Fall Hormoninduzierbarkeit. Distanz, Position und Orientierung beeinflussen in unterschiedlichem Maß die Wirkung des HREs auf diesen spezifischen Promotor.

## S T R U K T U R E L L E   A N A L Y S E   D E S   H R E

Es gibt Hinweise darauf, daß mehr als ein trans-wirkender Faktor an das HRE bindet. Das Entfernen zunehmender 5'-Sequenzen des HREs führt zu einem schrittweisen Verlust der Induzierbarkeit, das Entfernen der 6bp zwischen den Nukleotiden -59 und -65 vom 3'Ende her, führt dagegen abrupt zum vollständigen Funktionsverlust. Position und Orientierung des vollständigen HRE haben Einfluß auf die Enhancer-Wirkung bezüglich des kryptischen TK-Promotors. Auch in vitro Bindungsstudien am HRE sprechen für die Existenz struktureller Subdomänen: DNaseI-Protektions-Experimente mit gereinigtem Glucocorticoid Rezeptor zeigen zwei geschützte Domänen innerhalb der HRE-Region: die Sequenzen zwischen den Nukleotiden -191 und -164, sowie die Sequenzen zwischen den Nukleotiden -124 und -71. Auffällig an der Sequenz der geschützten Bereiche ist das mehrfache Auftreten der Basenfolge 5'TGTTCT 3'. In der proximalen Domäne ist es dreifach, in der distalen einfach vertreten. In vitro Methylierungsschutz-Experimente deuten auf eine direkte Interaktion zwischen den Guaninresten der Motive und dem Glucocorticoid-Rezeptor hin: das gebundene Rezeptormolekül verhindert eine in vitro Methylierung spezifisch der Guaninreste der Motive; umgekehrt verhindert in vitro Methylierung der Guaninreste des singulären Motivs der distalen Domäne eine Anlagerung des Rezeptormoleküls (Scheidereit u. Beato 1984).

Die proximale Bindungsdomäne besitzt zusätzlich an identischer Position eine Sequenz starker Homologie mit dem ebenfalls Glucocorticoid-regulierten Tryptophan Oxygenase Gen (TO-Gen) der Ratte (Schmid et al. 1982).

Der Bereich des HREs zwischen den Rezeptor-Bindungsdomänen zeichnet sich durch den Besitz eines besonderen Motivs aus: die

Nukleotide -147 bis -141 sind der von Weiher, König und Grub 1983 formulierten Enhancer Kernsequenz 5'TGGA/T A/T A/T 3' homolog.

Am äußersten 3'Ende des HREs wurde die Bindung eines weiteren regulatorischen Proteins, des nuclear factor I (NF1) durch DNaseI Protektions Experimente nachgewiesen. Die geschützte Region zwischen den Nukleotiden -80 und -59 enthält eine Sequenz, die der NF1-Erkennungssequenz 5'TGGCANNNTGCCA 3' stark homolog ist (Nowock et al. 1985). Footprint und Erkennungssequenz überlappen mit dem 3'Ende der proximalen Bindungsdomäne.

Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit habe ich die funktionelle Bedeutung dieser Strukturelemente des HRE analysiert. Ich habe die HRE-Sequenz gezielt an jedem einzelnen der TGTTCT Motive, der Homologie zur Enhancer-Kernsequenz, der Homologie zum TO-Gen und der NF1-Erkennungssequenz verändert und den Einfluß der Mutationen auf die Hormoninduzierbarkeit des authentischen MMTV-Promotors und des gekoppelten TK-Gens mit kryptischem Promotor untersucht.

#### EINFÜHREN VON MUTATIONEN IN DIE SEQUENZ DES HRE

Die herzustellenden Mutanten sollten zwei Bedingungen erfüllen: Nur exakt die auszutauschenden Basen sollten von der Mutation betroffen sein und der Austausch sollte unter Wahrung der Anzahl an Basen gegen eine vorher festgelegte Sequenz erfolgen.

Um diese Bedingungen zu erfüllen, habe ich zur Herstellung der Mutanten eine etwas modifizierte Form der von Zoller und Smith 1984 vorgestellten Methode zur Mutagenese unter Verwendung von Oligonukleotiden benutzt.

Die mutierenden Oligonukleotide wurden synthetisch als einzelsträngige Moleküle hergestellt. Sie hatten eine Länge von durchschnittlich 35 Basen. Ihre Sequenz war bis auf die

mutierende Basenfolge der Wildtyp LTR-Sequenz homolog. Die Sequenz der mutierenden Basenfolge wurde nach zwei Kriterien ausgewählt: Sie sollte der zu ersetzenden Sequenz möglichst unähnlich sein und sie sollte Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym sein, das normalerweise in diesem LTR-Bereich keine Schnittstelle hat, um die Identifikation mutierter DNAs zu erleichtern.

#### Gezielte Mutagenese

Das mutierende Oligonukleotid wird an einzelsträngige DNA der zu mutierenden DNA hybridisiert. Zur Produktion einzelsträngiger DNA wurde die zu mutierende Sequenz in DNA des Vektors pEMBL9+ inseriert. Die pEMBL Vektoren wurden zur Sequenzierung von DNA nach der Methode von Sanger konzipiert (Dente et al. 1983). Sie basieren auf dem pUC8 Vektor und besitzen dadurch den Bereich des  $\beta$ -Galaktosidasegens, dem die kommerziell erhältlichen Sequenzierprimer komplementär sind. Zusätzlich besitzen sie eine Sequenz aus dem Originbereich des einzelsträngigen Phagen Fl. Diese Sequenz beinhaltet Signale, die während der Vermehrung der Phagen in Bakterienzellen das Umschalten von semikonservativer Replikation auf den sogenannten rolling circle Mechanismus ermöglichen, d.h. die Umstellung von der Herstellung doppelsträngiger Moleküle auf die Produktion und Verpackung einzelsträngiger Moleküle. Diese Region vermittelt auch der DNA der pEMBL Vektoren samt inserierter Sequenzen die selben Eigenschaften, wenn sie zusammen mit Helferphagen kultiviert werden.

Gleichzeitig mit den mutierenden Oligonukleotiden wird der Sequenzierprimer an die einzelsträngige Plasmid-DNA hybridisiert. Die für die anschließende Vervollständigung des 2.Strangs eingesetzte DNA-Polymerase I findet somit zwei freie 3'OH-Enden



als Startpunkte der Synthese. Die zu mutierende Sequenz wird mit geeigneten Restriktionsenzymen wieder ausgeschnitten und einer *in vitro* Behandlung mit DNA-Adenosin-Methyltransferase unterzogen. Damit erhält der synthetisch hergestellte 2.DNA Strang das bakterienspezifische Methylierungsmuster und wird vor Eingriffen des bakteriellen Reparaturapparates geschützt.

Das Restriktionsfragment wird in vollständig doppelsträngige Plasmid-DNA inseriert. Bakterien werden mit den Rekombinanten, die einen durch die mutierende Sequenz eingebrachten kurzen Heteroduplexbereich besitzen, transformiert. Die Bakterien produzieren durch semikonservative Replikation aus der Heteroduplex-DNA zwei Tochterplasmide: solche mit der Wildtyp-Sequenz und solche mit der gewünschten Mutation. Die gemischten Plasmidpopulationen werden durch erneute Transformation in Bakterien getrennt.

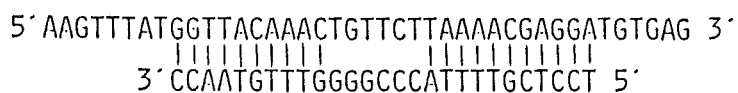
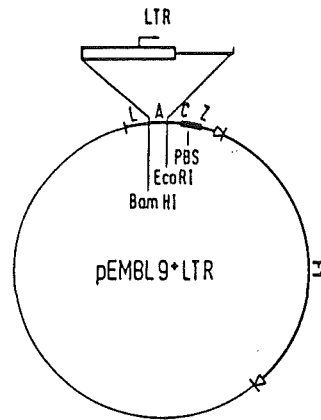
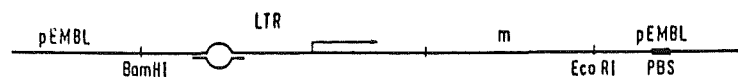


Abb.19: Sequenz des Oligonukleotids zur Mutation des TGTTCT Motivs der distalen Bindungsdomäne. In der oberen Reihe ist die Wildtyp HRE Sequenz dargestellt. Komplementäre Basen sind durch Striche verbunden

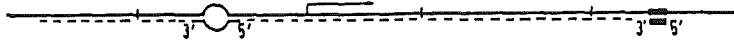
Abb.20: Schema der gezielten Mutagenese des HRE unter Verwendung von Oligonukleotiden



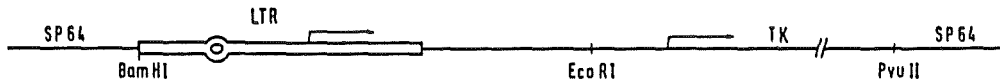
Ein 600bp BamHI-EcoRI Fragment, das die LTR-Sequenzen ab dem Nukleotid -237 (Kästchen) und 222bp flankierende Mausequenzen (einfache Linie) enthält, wird zwischen die entsprechenden Rss in der multiplen Klonierungsregion des Vektors pEMBL9+ inseriert. PBS = Bindungsstelle des Sequenzierprimers, Lac Z =  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase, Fl = DNA-Fragment des Phagen Fl.



Bakterien des Stammes E.coli K12 71/18 werden mit DNA des Plasmids pEMBL9+LTR transformiert und anschließend mit dem Helferphagen IRI infiziert. Aus dem ins Kulturmedium sezernierten Phagengemisch wird einzelsträngige DNA präpariert und direkt mit DNA der jeweiligen mutierenden Sequenz und des Sequenzierprimers hybridisiert. m = flankierende Maus-Sequenzen. Der Heteroduplexbereich zwischen Wildtyp-DNA und mutierender Sequenz ist als Kreis dargestellt.



Der 2.DNA-Strang wird durch Inkubation mit DNA-Polymerase I ergänzt, die verbleibende Lücke zwischen dem 5'Ende der mutierenden Sequenz und dem 3'Ende des an den Sequenzierprimer ansynthetisierten Polynukleotidstrangs wird durch Ligase geschlossen.

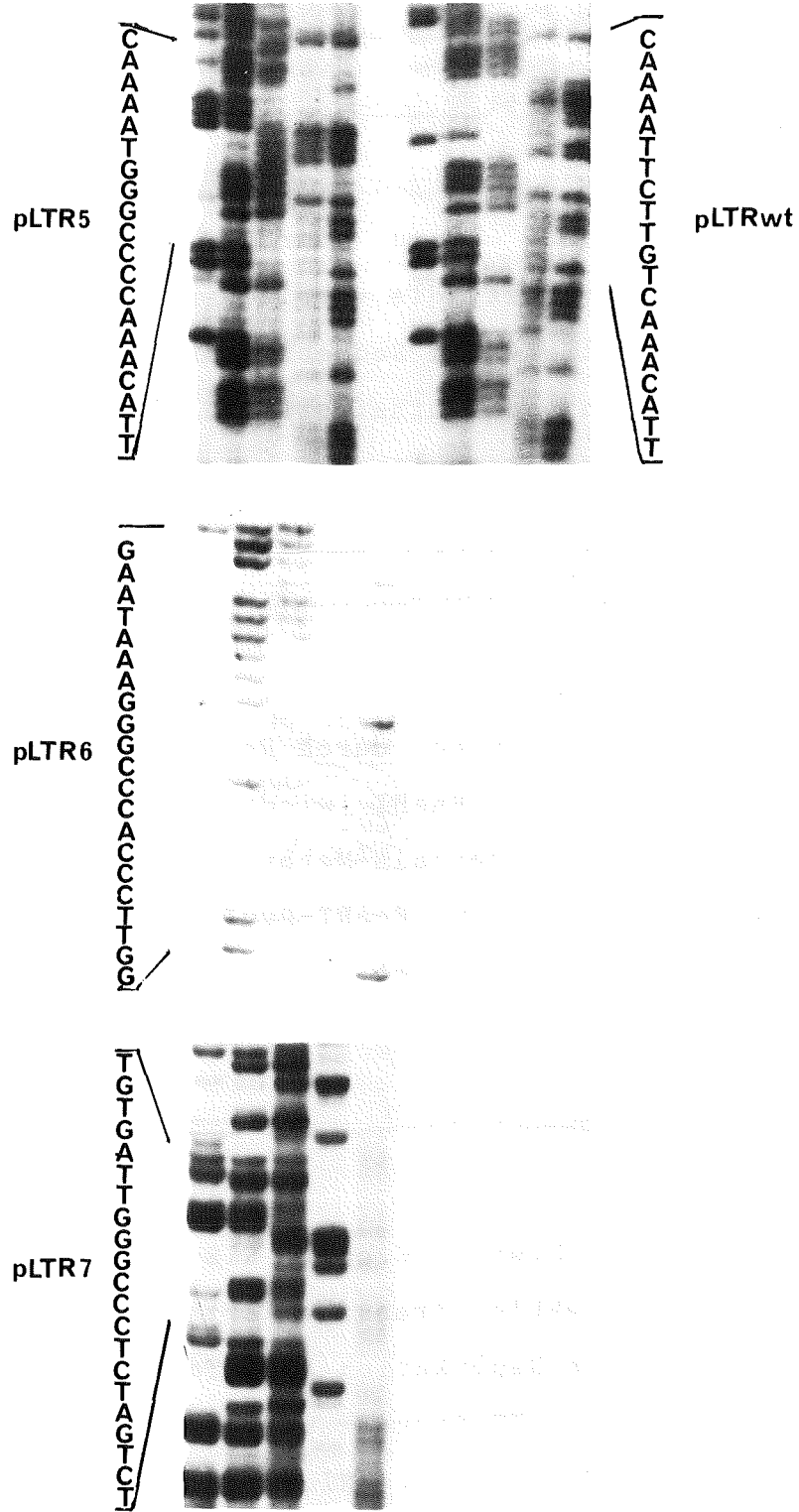


Das LTR-Fragment wird durch Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und BamHI wieder ausgeschnitten und in vitro mit DNA-Adenosin-Methyltransferase behandelt, anschließend vor ein EcoRI-PvuII TK-Subfragment in DNA des Vektors SP64 inseriert.



Bakterien des Stamms E.coli K12 C600 werden mit den Heteroduplexmolekülen transformiert und produzieren durch semikonservative Replikation zwei Tochterplasmide: solche mit der Wildtyp LTR-Sequenz und solche mit der mutierten (gestreift) LTR-Sequenz. Klone die beide Plasmid-DNAs enthalten, werden durch Verdau der DNA mit dem Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz inseriert wurde, identifiziert.

Abb. 21



Die gemischte Plasmidpopulation wird durch erneute Transformation in Bakterien getrennt. Die Richtigkeit der gewünschten Sequenz wird durch Sequenzieren der DNAs nachgeprüft.

#### Sequenzanalyse der DNAs der pLTR Konstrukte

Die Sequenzierung der mutierten DNAs wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert durchgeführt. Ein Ende des zu sequenzierenden DNA-Fragments wird radioaktiv markiert. In Einzelreaktionen wird jeweils eine oder zwei spezifische Basen modifiziert. Im zweiten Reaktionsschritt wird der DNA-Strang hinter der modifizierten Base gespalten. Die Subfragmente werden auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Für die Sequenzierung der mutierten LTRs wurden BamHI-EcoRI Subfragmente der pLTR Konstrukte isoliert und an ihrer BamHI Rss radioaktiv markiert

Abb.21: Autoradiographie der Sequenzanalyse mutierter LTR DNA. Gezeigt sind die mutierten DNA-Bereiche der Plasmide pLTR5, pLTR6 und pLTR7, neben pLTR5 die entsprechende Region nicht mutierter DNA.

Die Sequenzanalyse bestätigte, daß sich die Mutationen an den gewünschten Positionen befanden und keine Veränderungen in den flankierenden Sequenzen stattgefunden hatten.

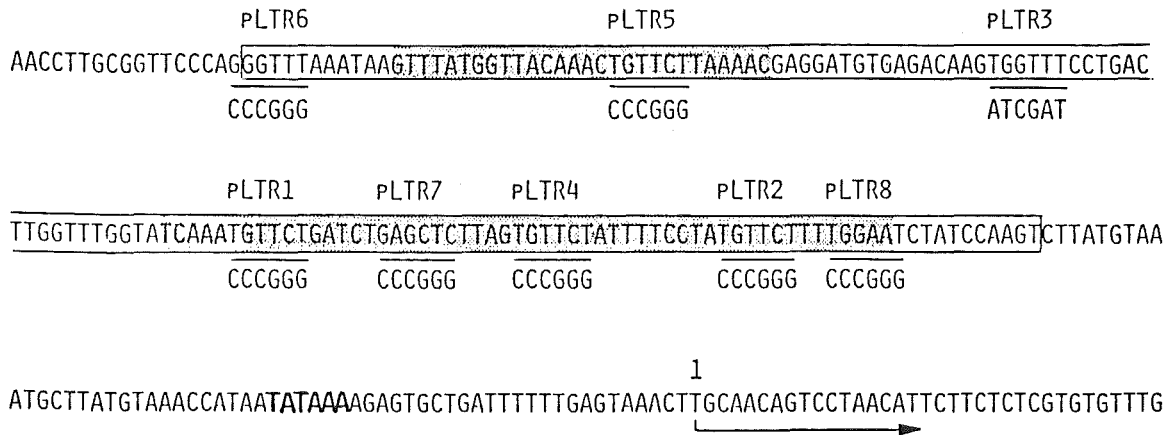


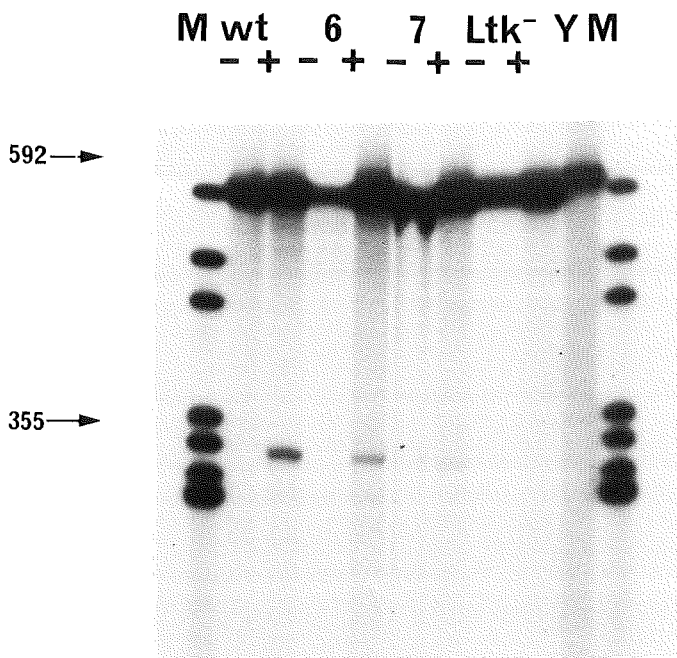
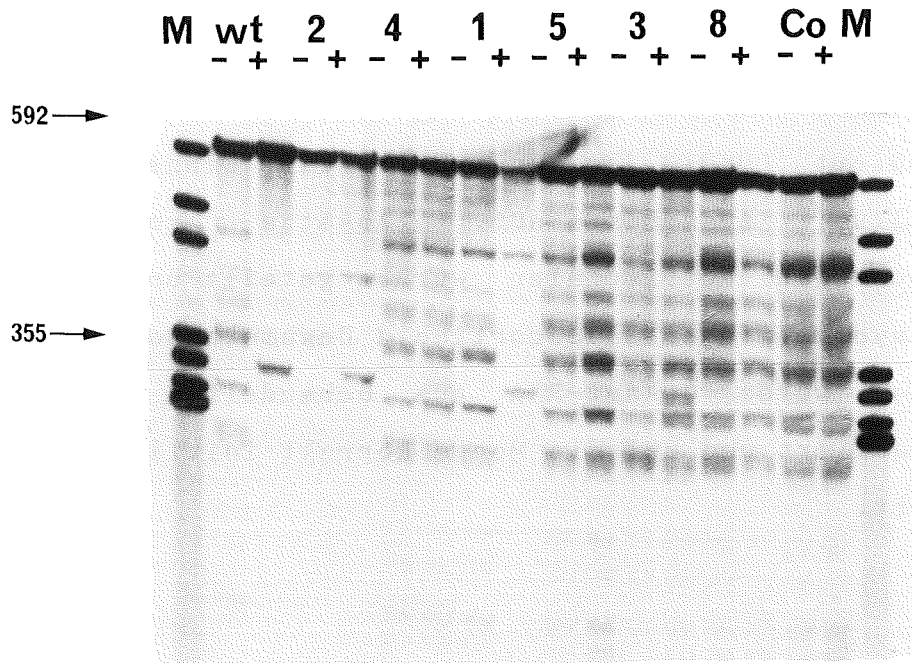
Abb.22: Schaubild aller mutierten LTR-Sequenzen. Dargestellt ist die Wildtyp LTR-Sequenz. Die durch Deletionsanalyse als HRE definierte Sequenz ist umrahmt, die Bindungsdomänen des Glucocorticoid-Rezeptors sind grau unterlegt. Die mutierten Basen sind unterstrichen, die Sequenz nach erfolgter Mutation ist darüber angegeben, die Bezeichnung der mutierten DNAs darunter. Der Pfeil markiert Transcriptionsstart und -richtung.

Folgende Sequenzen wurden in eine SmaI Rss mutiert: das TGTCT Motiv der distalen Bindungsdomäne (pLTR5), jedes der drei TGTCT Motive der proximalen Bindungsdomäne (pLTR2, pLTR4, pLTR1), die Homologie zum TO-Gen der Ratte (pLTR7), eine Hälfte der NF1 Erkennungssequenz (pLTR8) und eine Sequenz am äußersten 5'Ende des HREs (pLTR6). Die Homologie zur Enhancer-Kernsequenz wurde in eine ClaI Rss mutiert.

ANALYSE DER HORMONINDUZIERBARKEIT DER pLTR KONSTRUKTE

DNA jedes einzelnen Mutanten-Plasmids, des Wildtyp-Plasmids und des Kontroll-Plasmids SP64.TK, das keine HRE-Sequenzen enthält, wurde mit DNA des Plasmids pSV2NEO in Ltk<sup>-</sup>-Zellen im Verhältnis 10:1 kotransfiziert, um eventuelle Effekte der Mutationen auf die Transfektionseffizienz zu umgehen. Stabile Transfektanden wurden selektioniert und jeweils ca. 100 Einzelklone zu einer Massenkultur zusammengefaßt. Ansätze von jeweils 10 vollgewachsenen Petrischalen wurden geteilt und die eine Hälfte mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason behandelt. Nach 4 Stunden wurde Gesamt-RNA aus behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und auf die Menge korrekt initiiertes Transcript untersucht.

Abb. 24





Bestimmung der Menge am korrekten MMTV-Start initiiertes  
Transcripte

Die Menge der am korrekten MMTV-Start initiierten Transcripte wurde durch S1- und SP6-Analyse bestimmt.

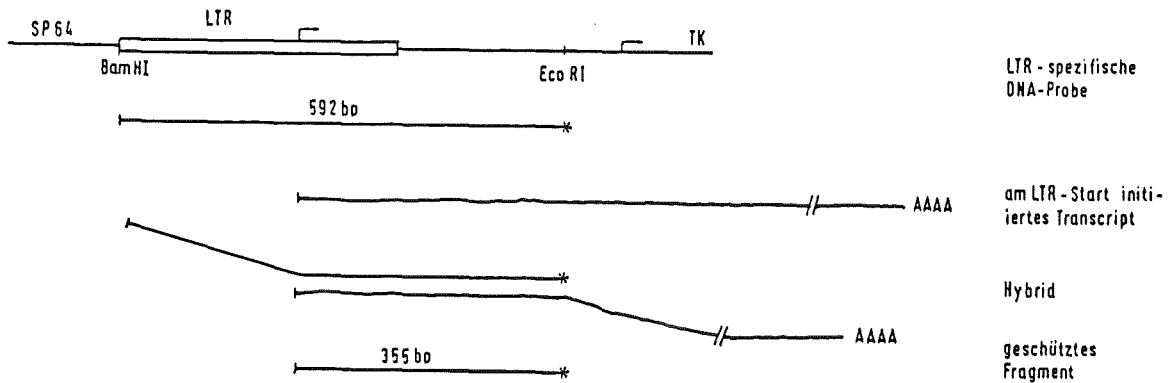


Abb.23: MMTV-spezifische S1-Probe. Als MMTV-spezifische S1-Probe wurde ein BamHI-EcoRI Subfragment aus DNA der Konstruktion pLTRwt isoliert. Es enthält 237bp 5'flankierende LTR-Sequenzen, 130bp LTR kodierende Sequenzen und 222bp ebenfalls transkribierte flankierende Maus-Sequenzen. Durch Hybridisierung mit spezifisch am MMTV-Start initiiertes RNA wird ein Fragment von 352bp vor dem Abbau durch Nuklease S1 geschützt.

Abb.24: Autoradiographie der S1-Analyse von am korrekten MMTV-Start initiierten Transcripten. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pLTRwt (wt), pLTR1 (1), pLTR2 (2), pLTR3 (3), pLTR4 (4), pLTR5 (5), pLTR6 (6), pLTR7 (7), pLTR8 (8) und SP64.TK (Co) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. Ltk<sup>-</sup> = RNA untransfizierter Zellen, M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA.

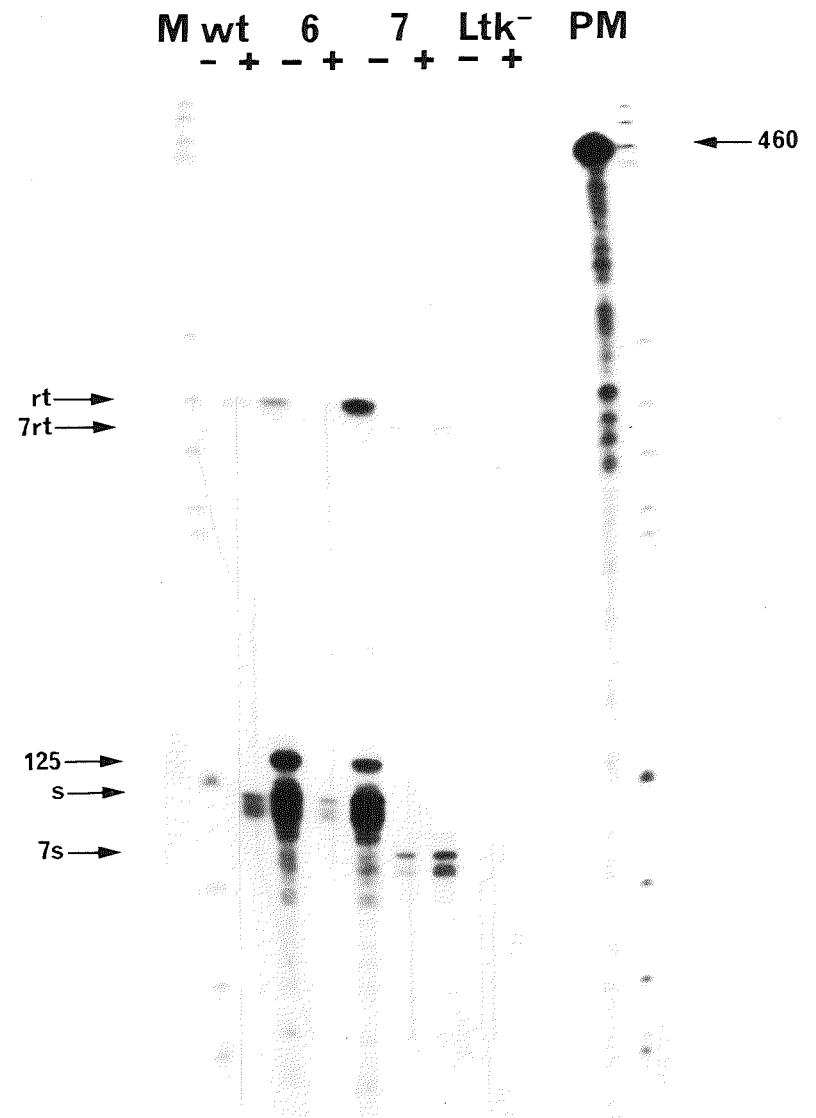
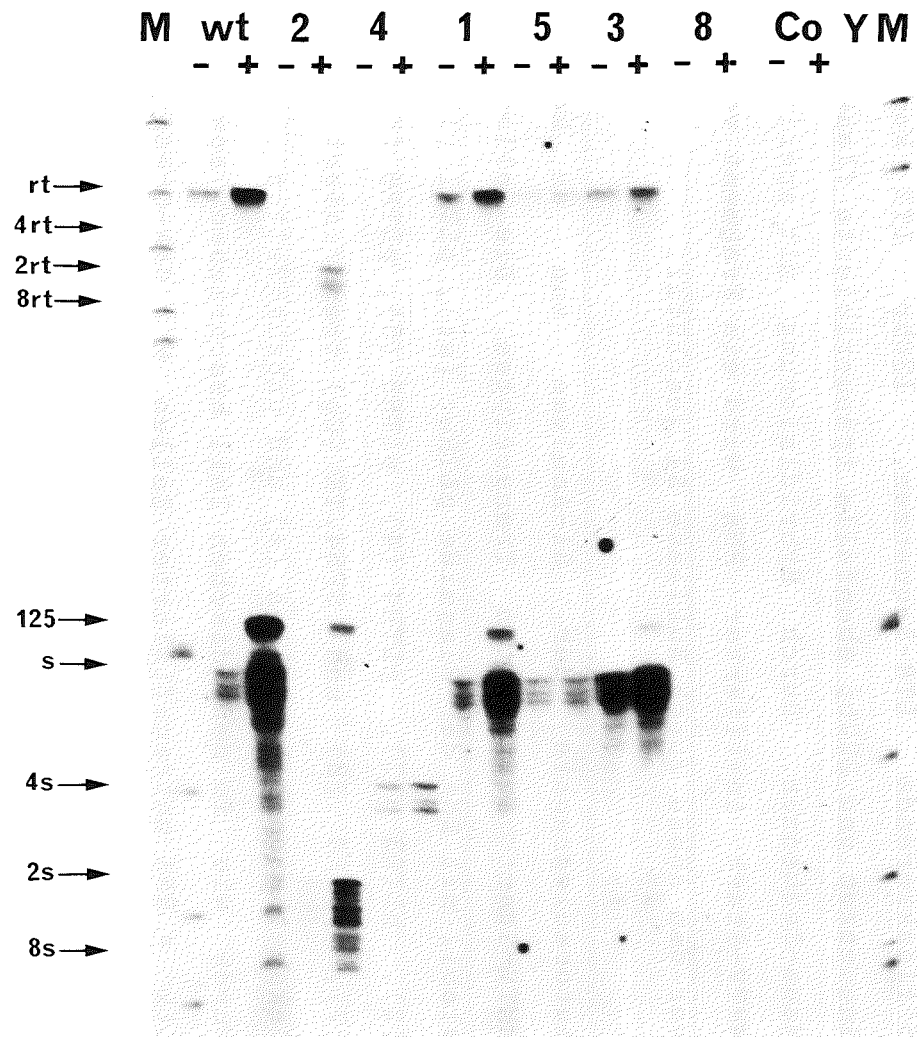


Abb. 26

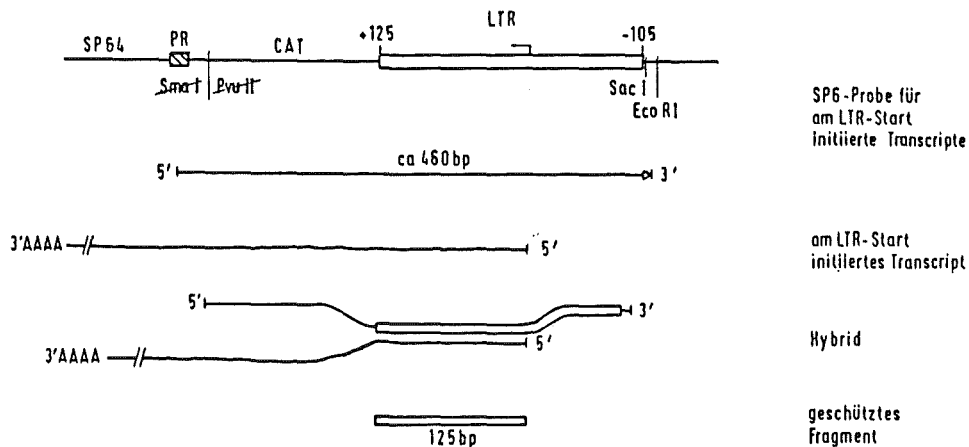


Abb.25: MMTV-spezifische SP6-Probe. Ein SacI-PvuII Subfragment des Plasmids pHCwt wurde zwischen die SmaI und die SacI Rss der multiplen Klonierungsregion von DNA des Vektors SP65 inseriert. Das Fragment umfaßt 105bp 5'flankierende LTR-Sequenzen, 125bp kodierende Region des MMTV-Genoms und Sequenzen aus dem kodierenden Bereich des CAT-Gens. DNA des Plasmids wurde an ihrer singulären EcoRI Rss linearisiert. Die Länge des Transcripts beträgt 460 Basen, durch Hybridisierung mit spezifisch am MMTV-Start initiiertes RNA werden 125 Basen geschützt. PR = SP6 Promotor.

Abb.26: Autoradiographie der SP6-Analyse von am korrekten MMTV-Start initiierten Transcripts. Es wurden die selben RNAs wie für die S1-Analyse verwendet: wt = pLTRwt, 1 - 8 = pLTR1 - pLTR8, Co = SP64.TK, Ltk<sup>-</sup> = untransfizierte Zellen, M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA, P = MMTV-spezifische SP6-Probe.

Zusätzlich zu dem indikativen Fragment für korrekt initiierte Transcripte (125 Basen) schützten die RNAs

jeweils ein größeres Fragment der Probe (rt). Die hierfür verantwortliche spezifische RNA initiiert irgendwo stromaufwärts vom authentischen MMTV-Start und umfaßt für Zellen, die mit DNA der Plasmide pLTRwt, pLTR1, pLTR3, pLTR5 und pLTR6 transfiziert wurden die gesamten 105 Basen 5'flankierender Region der Probe zusätzlich zu den 125 Basen aus den kodierenden Sequenzen (rt = read through). Die Hybride von RNAs aus Zellen, die mit DNA der Plasmide pLTR2, pLTR4, pLTR7 und pLTR8 transfiziert wurden, erzeugen durch die mutierte Sequenz einen Heteroduplexbereich mit der SP6-RNA, der den in der Analyse eingesetzten RNasen zugänglich ist. Als geschütztes Fragment wird nur noch der Bereich zwischen Transcriptionsstart und Mutation (rt2, rt4, rt7, rt8) sichtbar.

Unmittelbar vor der Transcriptionsstartstelle im LTR befindet sich ein Poly-Adenylierungs-Signal. Es sorgt dafür, daß die natürlicherweise im linken LTR gestartete MMTV-RNA direkt nach Überschreiten der Startstelle im rechten LTR abbricht. Dies geschieht auch mit einem Großteil der read through Produkte. Das bei der SP6-Analyse resultierende Signal hat eine Länge von 105 Basen plus 10-15 Basen aus der kodierenden Region (s). Die RNAs aus Zellen, die mit DNA der Plasmide pLTR2, pLTR4, pLTR7, pLTR8 transfiziert wurden, schützen entsprechend kürzere Fragmente der Probe (s2, s4, s7, s8).

Dieser zusätzliche Transcriptionsstart wird durch das Wildtyp-HRE und die mutierten HREs in der selben Weise beeinflußt, wie der authentische Start.

Mutation von jeweils einem der beiden äußeren TGTTCT Motive der proximalen Bindungsdomäne reduziert die Induzierbarkeit um etwa ein Drittel. Die Veränderung der Homologie zur Enhancer-Kernsequenz hat einen vergleichbaren Effekt. Die Mutation des singulären TGTTCT Motivs der distalen Domäne oder des mittleren Hexanukleotids der proximalen Domäne verhindert dagegen die Hormoninduktion des MMTV-Promotors völlig. Dasselbe gilt für einen Eingriff in die NF1-Erkennungssequenz. Auch Mutation der Homologie zum TO-Gen reduziert die Induktion stark. Eine Veränderung von Sequenzen am äußersten 5'Ende des HRE hat dagegen nur schwachen Einfluß.

Bestimmung der Menge korrekt initiiertes TK-Transcripte

Die selben RNA-Präparationen wurden auf die Menge korrekt initiiertes TK-Transcripte untersucht, um den Einfluß von Mutationen im HRE auf die Fähigkeit einem fremden Promotor Hormoninduzierbarkeit zu vermitteln, zu prüfen. Es wurde eine SP6-Analyse durchgeführt.

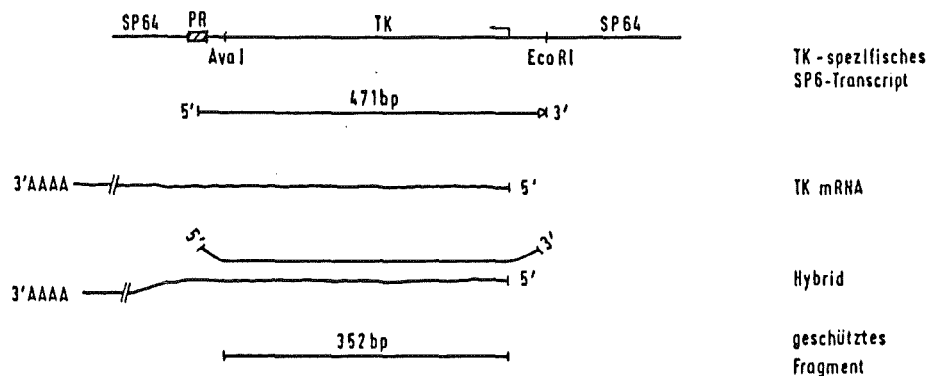
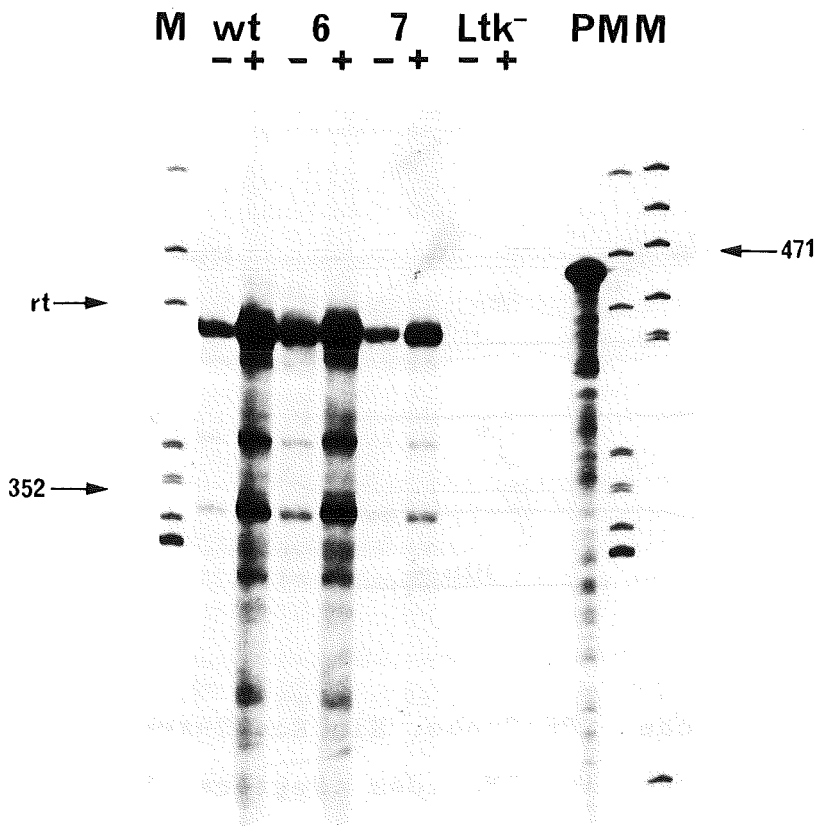
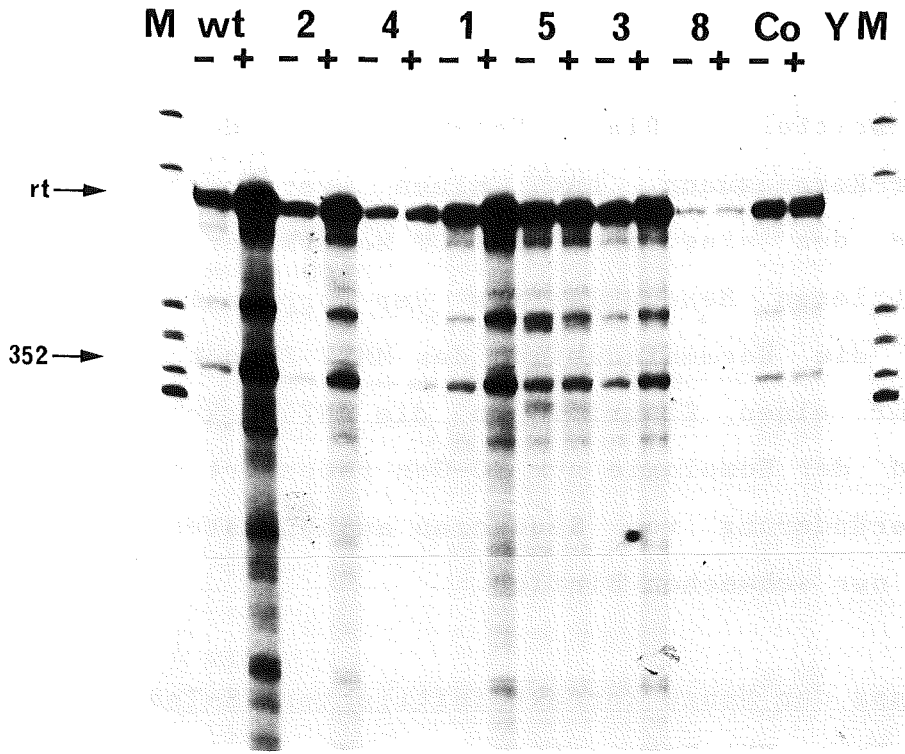


Abb.27: TK-spezifische SP6-Probe. Ein EcoRI-AvaI Subfragment des TK-Gens wurde in DNA des Vektors SP64 zwischen die entsprechenden Rss der multiplen Klonierungsregion

Abb.28

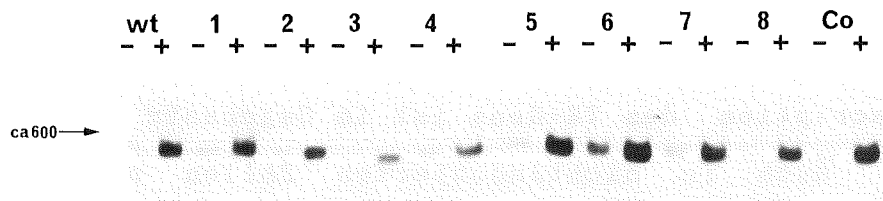


insetiert. Das Fragment umfaßt 80bp 5'flankierende Sequenzen und 352bp aus der kodierenden Region. DNA des Plasmids wurde an ihrer singulären EcoRI Rss linearisiert. Die Länge des Transcripts beträgt 471 Basen, durch Hybridisierung mit spezifischer TK-RNA werden 352 Basen geschützt. PR = SP6-Promotor.

Abb.28: Autoradiographie der SP6-Analyse korrekt initiiertes TK-Transcripte. Es wurden die selben RNAs wie für die Analyse am korrekten MMTV-Start initiiertes Transcripte verwendet. wt = pLTRwt, 1 - 8 = pLTR1 - pLTR8, Co = SP64.TK, M = DNA-Größenmarker, Y = Hefe-RNA, P = SP6-Probe. Zusätzlich zum indikativen Fragment für korrekt initiiertes TK-Transcripte (352) schützen die RNAs ein größeres Fragment der Probe (rt). Die verantwortliche RNA initiiert irgendwo stromaufwärts vom authentischen TK-Start, möglicherweise handelt es sich um ein read through Produkt des authentischen MMTV- Starts.

Die Transcription des TK-Gens ist im Gegensatz zu der des MMTV-Fragments auch in nichtinduzierten Zellen nachweisbar. Das Wildtyp-HRE vermittelt dem TK-Promotor in Anwesenheit von Glucocorticoiden eine ca. 5fache Steigerung der Transcriptionsrate. Mutationen im HRE reduzieren die Induzierbarkeit des TK-Promotors ebenso wie die des MMTV-Promotors. Die einzelnen Mutationen haben auf beide Promotoren vergleichbaren Einfluß.

Abb.29





### Northern-Analyse der RNA stabil transfizierter Zellen

Die Expression der endogenen Maus-Metallothioneingene steht unter Glucocorticoid-Kontrolle (Mayo u. Palmiter 1980). Um sicherzustellen, daß in allen stabil mit DNA der pLTR Konstrukte transfizierten Zellen die Glucocorticoid-Behandlung erfolgreich war, wurden die RNAs der Dexamethason-behandelten Zellen auf erhöhte Expression der Metallothioneingene gegenüber den unbehandelten Kontrollen untersucht.

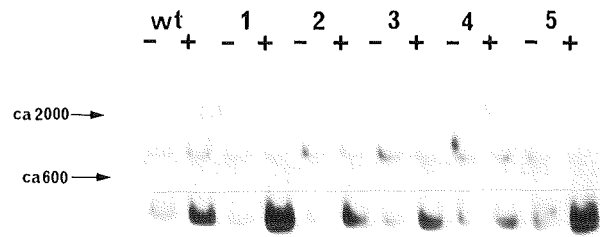
Gesamt-RNA wird auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und mit einer spezifischen radioaktiv markierten DNA-Probe hybridisiert. Die Schwärzung der Banden auf der anschließenden Autoradiographie ist ein direktes Maß für die Menge spezifischer Transkripte (McMaster u. Carmichael 1977).

Als spezifische Probe wurde ein 1,8kb genomisches Maus-Metallothionein I Fragment benutzt.

Abb.29: Autoradiographie der Northern-Analyse der Menge spezifischer Metallothionein-Transkripte. Die Zellen wurden stabil mit DNA der Plasmide pLTRwt (wt), pLTR1 - pLTR8 (1-8) und SP64.TK (Co) transfiziert. RNA aus Dexamethason-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurde wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. Die spezifische Maus-Metallothionein RNA hat eine Länge von ca. 600 Basen.

In jeder Massenkultur stabil mit DNA der pLTR Konstrukte transfizierter Zellen war die Induktion des endogenen Metallothioneingens durch Dexamethason erfolgt.

Abb. 30



Die Expression des endogenen Maus-Aktins wird durch Glucocorticoide nicht beeinflusst. Zur Kontrolle der pro Spur aufgetragenen Menge RNA, wurden die Nitrocellulosefilter entweder dehybridisiert und anschließend mit einer spezifischen radioaktiv markierten Maus-Aktin DNA-Probe nachhybridisiert, oder gleichzeitig mit beiden Proben hybridisiert.

Abb.30: Autoradiographie der Northern-Analyse der Menge spezifischer Metallothionein- und Aktin-Transcripte. Die selben RNAs wie in Abb.29 beschrieben, wurden gleichzeitig auf Metallothionein- (ca. 600 Basen) und Aktin-Transcripte (ca. 2000 Basen) untersucht.

#### Southern-Analyse der genomischen DNAs stabil transfizierter Zellen

Um sicherzustellen, daß die Massenkulturen stabil mit DNA der pLTR Konstrukte transfizierter Zellen das Chimären-Gen in korrekter Form integriert hatten, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt (Southern 1975). Die stabilen Transfektanden waren auf Aufnahme des in 10fachen molarem Unterschub kotransfizierten Neomycin-Resistenzgens selektioniert worden. Durch die Southern-Analyse wurde gleichzeitig untersucht, ob das molare Verhältnis der transfizierten DNAs in der Zelle manifestiert worden ist.

Genomische DNA der Massenkulturen wird so mit Restriktionsenzymen verdaut, daß das Fragment, dessen Integrität geprüft werden soll, in definierter Länge vorliegt. Die DNA-Fragmente werden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einer spezifischen radioaktiv markierten DNA-Probe hybridisiert.

Abb.31

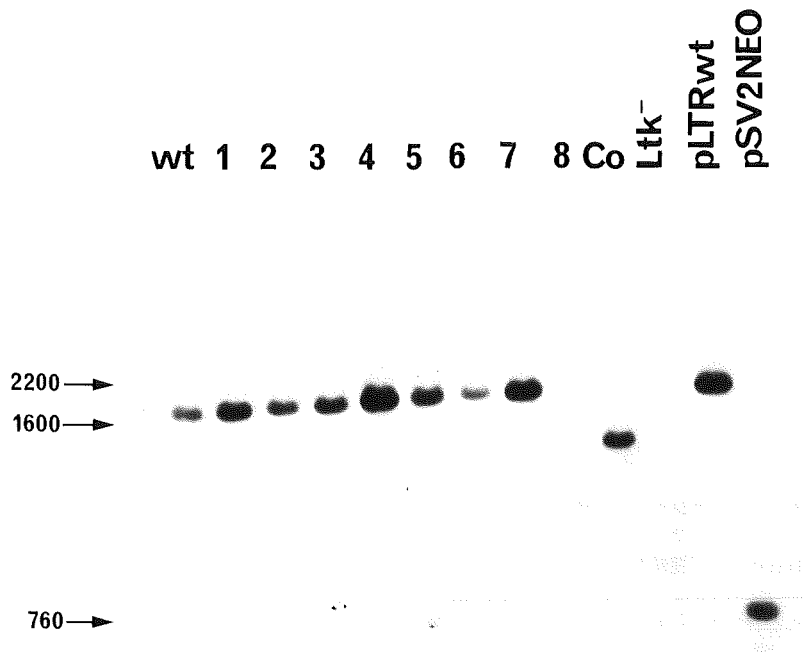
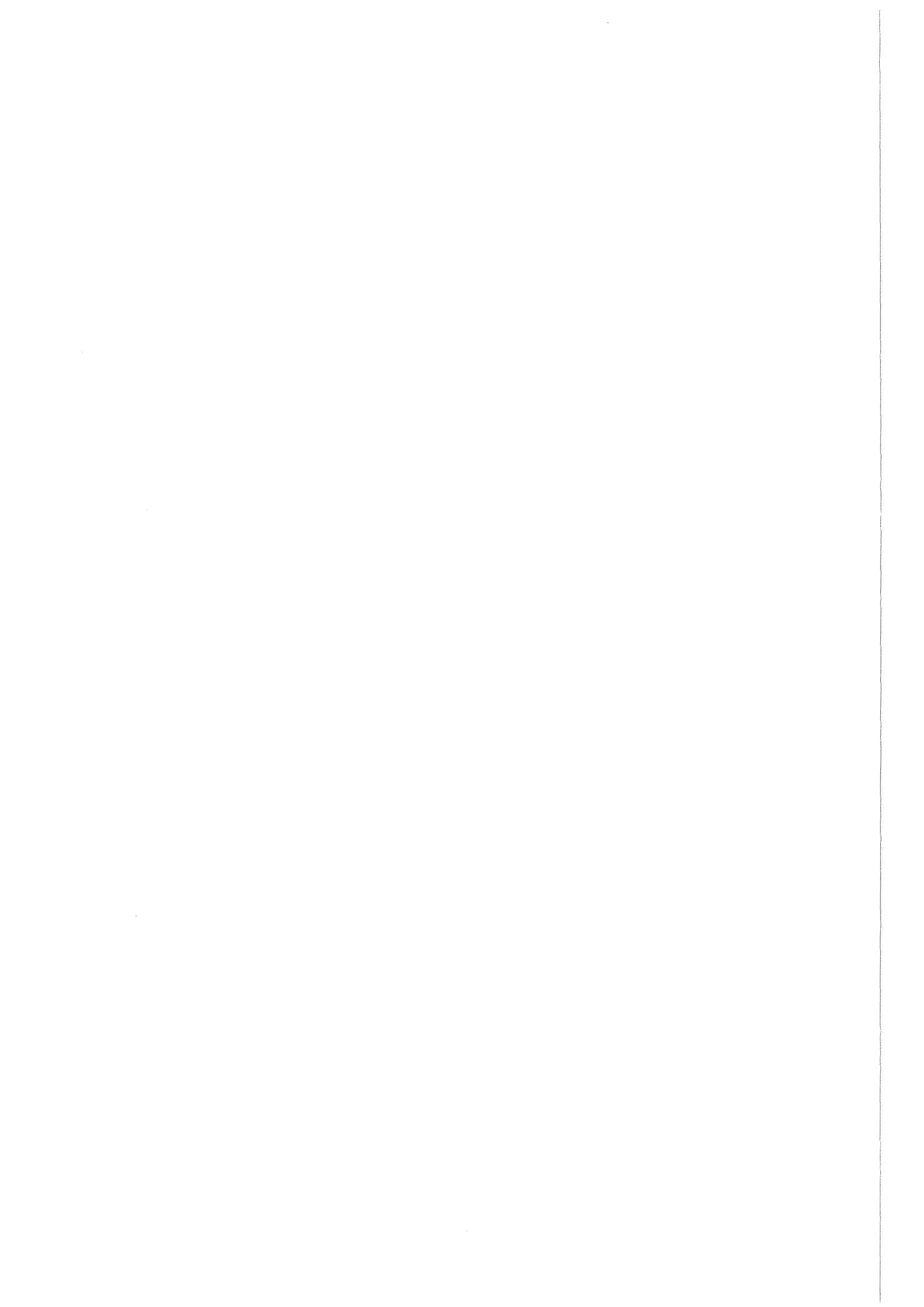


Abb.31: Autoradiographie der Southern-Analyse der stabil transfizierten Zellen. Die genomischen DNAs der Massenkulturen pLTRwt (wt), pLTR1 - pLTR8 (1-8), SP64.TK (Co), DNA untransfizierter Zellen (Ltk<sup>-</sup>) und DNA der Plasmide pLTRwt und pSV2NEO wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und PvuII verdaut. Das Chimären-gen aus LTR- und TK-Sequenzen wird dabei vollständig als Fragment von 2,2kb Länge ausgeschnitten; das indikative Fragment für die mit SP64.TK DNA transfizierte Massenkultur ist 600bp kürzer. Die DNA des Plasmids pSV2NEO wird in Fragmente der Längen 2,5kb, 850bp, 762bp, 568bp und 360bp zerschnitten. Als TK-spezifische Probe wurde das selbe 450bp EcoRI-AvaI Fragment wie zur Sl-Analyse verwendet, als Neo-spezifische Probe das interne 762bp BamHI Fragment.

Die Southern-Analyse zeigt, daß alle Massenkulturen integere Fragmente des LTR-TK-Chimären-gens enthalten. Durch Integration von Konkatemeren der transfizierten DNA möglicherweise entstandene ungewollte Konstellationen von LTR und Indikatorgen sind in dieser Analyse eventuell nicht erkennbar. Der Einsatz eines 10fachen Überschusses an carrier DNA in die Transfektion macht aber eine direkte Hintereinanderreihung mehrerer LTR-TK-Chimären unwahrscheinlich. Das Verhältnis 10:1 zwischen pLTR DNA und kotransfizierter pSV2NEO DNA ist offenbar erhalten geblieben: während das TK-spezifische Signal der genomischen DNAs in der Intensität etwa 50pg spezifischem Fragment entspricht, ist das NEO-spezifische Signal kaum noch nachweisbar.



Analyse der Hormoninduzierbarkeit im transienten System

Der Effekt der Mutationen im HRE auf die Glucocorticoid-Induzierbarkeit des MMTV-Promotors wurde auch auf Proteinebene in einem transienten Transfektionssystem bestimmt (Gorman et al. 1982).



Abb.32: Konstruktion der pHC Plasmide. Die Wildtyp- bzw. mutierten LTR-Sequenzen von Nukleotid -237 bis +125 wurden vor die kodierenden Sequenzen des CAT-Gens inseriert. Die anschließenden SV40-Sequenzen enthalten eucaryontische Spleiß- und Polyadenylierungs-Signale. Die Plasmide sind pHCwt, pHC1 usw. benannt, entsprechend den pLTR Konstrukten, von denen sie abgeleitet wurden.

Analyse der CAT-Aktivität der pHC Konstrukte

DNA der pHC Konstrukte wurde transient in Ltk<sup>-</sup>-Zellen transfiziert. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason behandelt und anschließend geerntet. Der Protein-Extrakt aus den Zellen wird mit <sup>14</sup>C-Chloramphenicol inkubiert. Die Umsetzungsprodukte werden chromatographisch aufgetrennt.

Abb. 33a

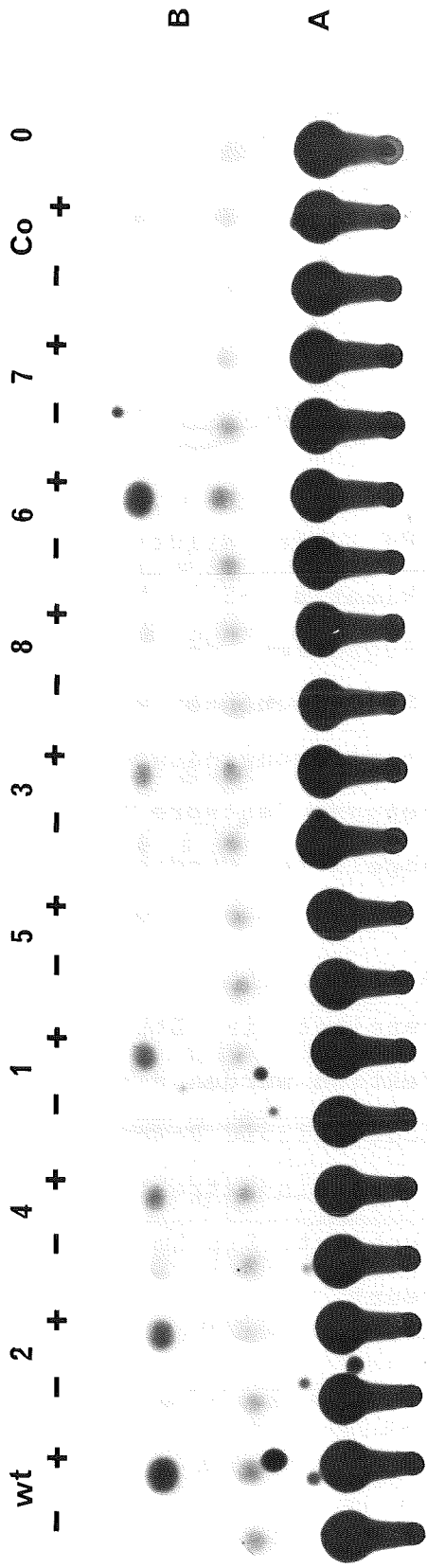


Abb. 33b

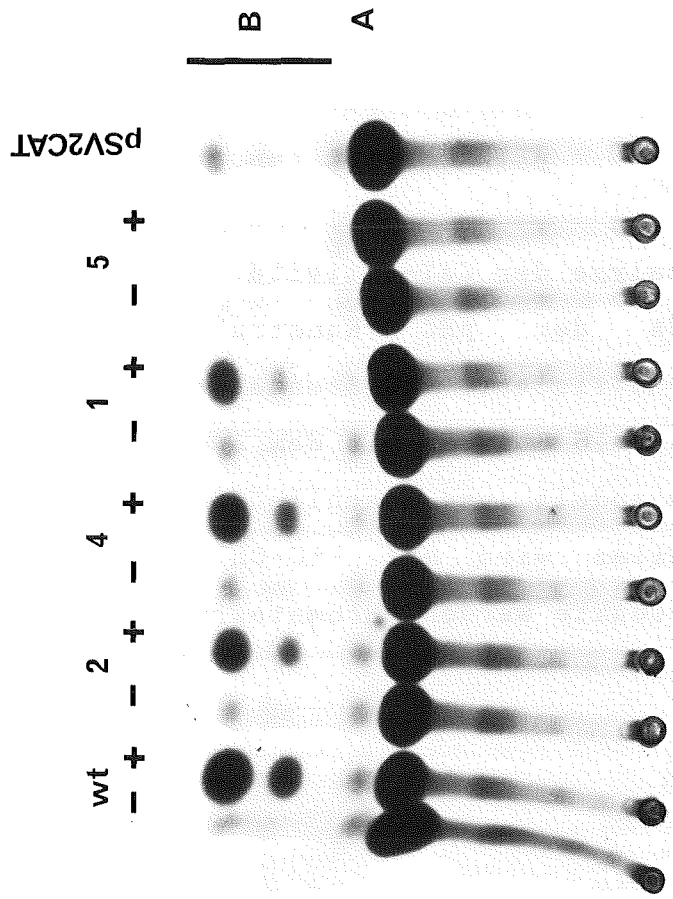




Abb.33: Autoradiographie der Analyse der CAT-Aktivität. Protein aus Zellen, die mit DNA der pHC Konstrukte transfiziert worden waren, wurden wie im methodischen Teil beschrieben, analysiert. A = nicht umgesetztes Chloramphenicol, B = acetylierte Formen des Substrats

a) 2 Stunden CAT-Assay von Protein aus pHCwt (wt), pHCl - pHC8 (1-8) und pGROOCAT (Co) DNA transfizierten Zellen. Das Plasmid pGROOCAT ist identisch mit den pHC-Rekombinanten, enthält aber nur die LTR-Sequenzen von Nukleotid -74 bis +125. 0 = Inkubation ohne Protein-Extrakt.

b) 5 Stunden CAT-Assay von Protein aus pHCwt, pHCl, pHC2, pHC4, pHC5, pSV2CAT transfizierten Zellen.

Das Resultat der Analyse der CAT-Aktivität transient transfizierter Ltk<sup>-</sup>-Zellen bestätigt bis auf eine Ausnahme die Ergebnisse der RNA-Analyse stabil transfizierter Zellen: Jede der Mutationen im HRE hat Einfluß auf die Induzierbarkeit des authentischen MMTV-Transcriptionsstarts. Die einzelnen Mutationen zeigen in beiden Test-Systemen vergleichbare Auswirkungen. Lediglich die Mutation des mittleren Hexanukleotids der proximalen Rezeptor-Bindungsdomäne reduziert im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten die Induzierbarkeit des MMTV-Promotors nur geringfügig.

## DISKUSSION

Das hormone response element (HRE) des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) vermittelt dem eigenen und heterologen Promotoren Glucocorticoid-Induzierbarkeit. Es übt seine Wirkung auf das  $\alpha$ -Globin der Maus unabhängig von Distanz, Position und Orientierung aus. Diese Eigenschaften zeichnen das HRE als konditionalen Enhancer aus (Ponta et al. 1985).

Allgemein setzen sich funktionell als Enhancer definierte DNA-Bereiche aus Subdomänen zusammen, deren Einzelaufgaben sich zum Gesamteffekt addieren - man spricht von einer "Modularstruktur" der Enhancer (Dorsch-Häsler et al. 1985). Die Funktion dieser cis-wirkenden regulatorischen DNA-Elemente wird vermittelt durch das Binden spezieller trans-wirkender Faktoren (Schöler u. Gruss 1984), die mit den allgemeinen Transcriptionsfaktoren am Promotor eines Gens interagieren (Übersichtsart. Serfling et al. 1985, Dynan u. Tjian 1985).

### ANALYSE DER ENHANCER-EIGENSCHAFT DES HRE

Im ersten Teil meiner Doktorarbeit habe ich mich mit funktionellen Eigenschaften des HREs befaßt. Wirkt das HRE auch auf andere Promotoren als hormonabhängiger Enhancer? Sind weitere regulatorische DNA-Elemente für die Funktion notwendig, oder üben einen Einfluß aus?

Ich habe meine Analyse an Hand von zwei Indikatorgenen durchgeführt, dem eucaryontischen  $\beta$ -Globin und dem Thymidinkinasegen (TK-Gen) des Herpes simplex Virus.

### Enhancer-Wirkung des HRE auf das $\beta$ -Globingen

Der Zeitpunkt zu dem die Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globingen während der Differenzierung in erythropoetischen Zellen gestartet wird, ist sehr verschieden (Übersichtsart. Weatherall u. Clegg 1981). Auch nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen wurde sowohl generell, als auch in Kombination mit dem SV40-Enhancer, unterschiedliche Transcriptionsaktivitäten nachgewiesen. Das  $\alpha$ -Globingen wurde auch in Abwesenheit von SV40-Sequenzen exprimiert, Transkripte des  $\beta$ -Globingens waren unter gleichen Bedingungen nicht nachweisbar. In Verbindung mit dem SV40-Enhancer wurde die Expression des  $\alpha$ -Globingens um das 5-10fache gesteigert, die des  $\beta$ -Globingens um einen Faktor von mindestens 100, deduziert aus der Nichtnachweisbarkeit der Transcription in Abwesenheit des Enhancers (Treisman et al. 1983).

Meine Experimente zeigen, daß das  $\beta$ -Globingen nach stabiler Transfektion in Maus-Fibroblasten (Ltk<sup>-</sup>-Zellen) auch in Abwesenheit von Enhancer-Sequenzen exprimiert wird, wie bereits von Dierks et al. 1981 nachgewiesen wurde. Rekombination mit dem HRE vermittelt dem  $\beta$ -Globingen Glucocorticoid-Induzierbarkeit, unabhängig von Position und Orientierung des HRE zum  $\beta$ -Globin Promotor über eine Distanz von 1,2 bis 2kb.

Das HRE übt auf zwei verschiedene Promotoren, den des  $\alpha$ - und den des  $\beta$ -Globingens, die Wirkung eines Glucocorticoid-abhängigen Enhancers aus.

### Enhancer-Wirkung des HRE auf das TK-Gen

Die Resultate, die ich bezüglich des zweiten Indikatorgens, des TK-Gens, erhalten habe, möchte ich unterteilt in die Einzelaspekte Distanz, Orientierung und Position darstellen.

## Distanz

Erste Hinweise auf die Enhancer-Eigenschaft des HRE lieferten die Experimente zur Definition der Grenzen des Elements, die eine distanzunabhängige Aktivierung des TK-Promotors gezeigt hatten (Hynes et al. 1983). Das in diesen, wie auch in der Mehrzahl meiner Experimente verwendete TK-Gen Fragment enthält 80bp 5'flankierender Region. Es fehlen gegenüber dem vollständigen, 105bp umfassenden Promotor zwei regulatorische DNA-Bereiche: die CAAT-Box und eine der beiden GC-Boxen (McKnight et al. 1984). Die Basalexpression des kryptischen TK-Promotors ist gegenüber dem vollständigen auf 10% reduziert (McKnight et al. 1981). Beide Promotoren sind aus 5'Position syn Orientierung distanzunabhängig durch das HRE aktivierbar (pSP1.1, pSP3.1, pHRE.TK1 und pers. Mitt. A.Cato). Eine Erweiterung der 5'flankierenden Sequenzen des TK-Gens auf 600bp verhindert dagegen die Induzierbarkeit durch das HRE völlig. Ein Distanzeffekt ist ausgeschlossen, wie die Rekombinanten zwischen HRE und den beiden Globingenen zeigen, und auch der TK-Promotor ist über eine Distanz von "neutralen" 430bp aktivierbar (pSP1.1). Daher müssen sich zwischen den Nukleotiden -600 und -105 der flankierenden Region des TK-Gens spezifische Sequenzen befinden, die dem Einfluß des HREs auf das TK-Gen entgegenwirken. Experimente zu Eigenschaften der regulatorischen Region des menschlichen Metallothionein IIA Gens (Karin et al. 1984b) hatten ebenfalls eine Interferenz zwischen den 600bp 5'flankierenden Regionen des TK-Gens und Glucocorticoid-Induktion vermittelnden Sequenzen gezeigt. Die Existenz von negativ regulatorischen DNA-Elementen wurde kürzlich nachgewiesen: Das Insulingen 1 der Ratte besitzt in seiner 5'flankierenden Region ein "Silencer-Element", das die Aktivierung seiner Expression durch Rekombination mit dem SV40-Enhancer verhindert (Laimins et al. 1986).

### Orientierung

Aus 5'Position ist der kryptische TK-Promotor unabhängig von der Orientierung des HRE aktivierbar (pSP3.1 und pSP3.2). Erweiterung des Abstands zwischen HRE und TK-Transcriptionsstart von 80bp auf (pSP3.2) auf 525bp (pHRE.TK2) durch Insertion von 445bp env-Sequenzen verhindert die Induzierbarkeit aus 5'Position anti Orientierung vollständig. Die identischen 445bp hatten keinen Einfluß auf die Induzierbarkeit des  $\alpha$ -Globingens durch das HRE aus 5'Position anti Orientierung (Ponta et al. 1985). Der beschriebene Effekt beruht somit auf Eigentümlichkeiten des verwendeten TK-Promotors.

### Position

Im Unterschied zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin Rekombinanten, erfolgte in keinem der getesteten TK-Rekombinanten eine Induktion durch das HRE aus einer 3'Position. Im Verlauf der Analyse wurde das HRE von 2,6kb (pSP2.3 und pSP2.4) über 2,15kb (pSP3.3 und pSP3.4) und 1,9kb (pM105.HRE.N3 und pM105.HRE.N4) auf 1,7kb (pM105.HRE.P3 und pM105.HRE.P4) an den TK-Transcriptionsstart herangerückt. In den letzteren Rekombinanten verbleiben 300bp 3'flankierender Region zwischen HRE und Poly-Adenylierungs-Signal. Möglicherweise verhindern ebenfalls inhibitorische Sequenzen dieses flankierenden Bereichs oder in den kodierenden Sequenzen selbst die Induktion. Andererseits könnte der selbe Mechanismus, der die Aktivierung des kryptischen TK-Promotors über größere Distanzen aus 5'Position anti Orientierung verhindert, auch bei einer 3'Position des HRE zum Tragen kommen.

LTR-Sequenzen außerhalb des HRE hatten keinen zusätzlichen Einfluß (pSP1.1-pSP1.4).

### Zusammenfassung zur Analyse der Enhancer-Wirkung des HRE

Das HRE kann heterologen Promotoren unabhängig von Distanz, Position und Orientierung Glucocorticoid-Induzierbarkeit vermitteln. Das HRE besitzt somit die Fähigkeit als konditionaler Enhancers zu wirken.

Der kryptische TK-Promotor kann durch das HRE nur aus 5'Position syn Orientierung distanzunabhängig aktiviert werden. Aus 5'Position anti Orientierung entscheidet die Distanz zwischen HRE und Transcriptionsstart über die Induzierbarkeit. Aus einer 3'Position ist das HRE völlig inaktiv. Für das HRE besteht, ebenso wie für andere Enhancer, die Notwendigkeit mit allgemeinen Transcriptionsfaktoren zusammen zu arbeiten (Übersichtsart. Sassone-Corsi u. Borelli 1986). Der kryptische TK-Promotor erfüllt offenbar nicht die erforderlichen Voraussetzungen, um diese Zusammenarbeit in jedem Fall zu ermöglichen.

### STRUKTURELLE ANALYSE DES HRE

Im zweiten Teil meiner Arbeit habe ich strukturelle Eigenschaften des HREs untersucht. Kann man innerhalb des HREs, wie in anderen Enhancer-Elementen, Subdomänen mit unterschiedlichem Einfluß auf die Hormoninduzierbarkeit des MMTV-Promotors definieren? Kann man die Resultate auch auf einen heterologen Promotor übertragen? Bindungsstudien mit trans-wirkenden Faktoren und Sequenzhomologien zu anderen regulatorischen DNA-Elementen im HRE lieferten Hinweise auf mögliche strukturelle Untereinheiten. Durch gezielte Mutagenese und anschließende in vivo Analyse habe ich die biologische Signifikanz spezifischer Basenfolgen im HRE untersucht. Sie umfaßten das singuläre TGTTCT Motiv der distalen Glucocorticoid-Rezeptor Bindungsdomäne und jedes einzelne der drei Motive der proximalen Bindungsdomäne (Scheidereit et al.

1983), sowie eine ebenfalls in der proximalen Domäne befindliche Homologie zu einer Sequenz an identischer Position im Glucocorticoid-induzierbaren Tryptophan Oxygenase Gen (TO-Gen) der Ratte (Schmid et al. 1982). Weiterhin habe ich eine Homologie zur Enhancer-Kernsequenz (Weiher et al. 1983) zwischen den beiden Rezeptorbindungsdomänen, die Erkennungssequenz des ebenfalls an das HRE bindenden nuclear factor 1 (NF1) (Nowock et al. 1985, Leegwater et al. 1986) und eine Sequenz am äußersten 5'Ende des HRE mutiert.

Jede einzelne Mutation im HRE hatte einen Einfluß auf die Hormoninduzierbarkeit des authentischen MMTV-Promotors und ebenso auf die des gekoppelten TK-Promotors.

#### Absolut notwendige Sequenzen

Zwei Basenfolgen sind für die Funktion des HRE absolut notwendig: das TGGTCT Motiv der distalen Rezeptor Bindungsdomäne und die NF1 Erkennungs-Sequenz. In vitro Methylierungsschutz-Experimente mit gereinigtem Glucocorticoid-Rezeptor (Scheidereit u. Beato 1984) hatten eine spezifische Interaktion des Rezeptors mit allen TGGTCT Motiven beider Bindungsdomänen gezeigt. Im umgekehrten Experiment verhindert jedoch exklusiv eine Methylierung der Guaninreste des Hexanukleotids der distalen Domäne die Anlagerung des Rezeptors. Linker-Scanning Mutanten (Buetti u. Kühnel 1986) zur strukturellen Analyse des HRE hatten ebenfalls der distalen Domäne und innerhalb dieser besonders dem Hexanukleotid eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Glucocorticoid-Induzierbarkeit zugeschrieben. Die selbe Analyse demonstrierte ebenfalls die kritische Bedeutung der NF1 Erkennungs-Sequenz. Kürzlich wurde der direkte Zusammenhang zwischen in vitro Bindung des Faktors und in vivo Glucocorticoid-Induktion des

MMTV-Promotors bewiesen (Miksicek u. Nowock 1987). Die Mutation der NFl-Erkennungssequenz verhinderte ebenfalls die Induzierbarkeit des kryptischen TK-Promotors. Weitere Experimente in unserem Labor haben gezeigt, daß dieses DNA-Element für die Aktivierung des vollständigen 105bp TK-Promotors nicht notwendig ist (A.Cato pers. Mitt.). Die Notwendigkeit der NFl-Erkennungssequenz für die Vermittlung der Hormoninduzierbarkeit auf den kryptischen TK-Promotor bietet eine mögliche Erklärung für die negativen Resultate bei der Analyse der Enhancer-Wirkung des HREs auf eben diesen TK-Promotor. Kürzlich wurde die Identität von NFl und dem CAAT-Box bindenden Faktor CTF nachgewiesen (Jones et al. 1987). Dem kryptischen TK-Promotor fehlt neben einer der GC-Boxen auch die CAAT-Box. Über eine kurze Distanz kann die NFl-Erkennungssequenz des HRE orientierungsunabhängig (pSP3.1, pSP3.2) die Rolle der CAAT-Box des TK-Promotors für die Hormoninduktion übernehmen. Sie reicht allerdings nicht aus, in Abwesenheit von Hormon den Basallevel des kryptischen TK-Promotors auf den des vollständigen anzuheben (Vergleich der Expression der 5'syn HRE-Rekombinanten ohne Hormonzugabe mit der Expression der Kontroll-Plasmid-DNAs ohne HRE).

#### Die Hexanukleotide der proximalen Bindungsdomäne

Bezüglich des Einflusses der TGTTCT Motive der proximalen Bindungsdomäne waren die Ergebnisse meiner Analysen nicht vollständig übereinstimmend. Mutation von jeweils einem der äußeren Hexanukleotide reduziert die Induzierbarkeit auf zwei Drittel bis die Hälfte. Mutation des mittleren Motivs führte dagegen abhängig von Konstruktion und Testsystem zu unterschiedlichen Resultaten. Im stabilen Testsystem (Plasmid pLTR4) erwies sich dieses Motiv als absolut notwendig für die Funktion des HREs, während sich sein Einfluß im transienten



Testsystem (Plasmid pHC4) nicht von dem der beiden übrigen Hexanukleotide der proximalen Domäne (Plasmide pHCl und pHC2) unterschied. Auch in einer weiteren Glucocorticoid-induzierbaren Zelllinie, Ratten XC-Zellen, wird die Expression von pHCl-, pHC2- und pHC4-DNA nach transienter Transfektion durch Hormonbehandlung gleichstark induziert. (pers. Mitt. A.Cato). Die getesteten LTR-Fragmente waren in beiden Systemen identisch: die CAT-Gen Rekombinanten sind direkte Abkömmlinge der TK-Gen Rekombinanten. Das bedeutet, die funktionstüchtige Rekombinante ist aus der nicht funktionierenden hervorgegangen. Ein technischer Fehler bei der Analyse der stabil transfizierten DNA ist sehr unwahrscheinlich. Die Integrität der transfizierten DNA wurde durch eine Southern Blot Analyse überprüft, die erfolgreiche Durchführung der Hormoninduktion wurde durch eine Northern Blot Analyse nachgewiesen. Sowohl die Transfektion der DNA in Ltk<sup>-</sup>-Zellen, als auch die Analyse der RNAs Dexamethason-behandelter und nicht behandelter Zellen wurde mehrfach durchgeführt. Es ist daher anzunehmen, daß die unterschiedlichen Ergebnisse durch Unterschiede der analysierten DNA-Konstrukte hervorgerufen wurden. Die LTR-TK-Chimären besitzen im Gegensatz zu den LTR-CAT-Chimären noch 222bp flankierende Maus-Sequenzen, die in dieser speziellen Mutante so verändert sein könnten, daß sie zu einer Interferenz mit dem HRE führen, denn auch der TK-Start ist nicht induzierbar.

Jedem einzelnen TGTTCT Motiv der proximalen Bindungsdomäne kommt also ein unterstützender Einfluß auf die Funktion des HREs zu. Auch die Methylierungsschutz-Experimente von Scheiderei und Beato hatten auf eine Beteiligung der Hexanukleotide der proximalen Domäne an der Rezeptorbindung hingewiesen. Die Linker-Scanning Analyse von Buetti und Kühnel hatte allerdings starke Unterschiede im Ausmaß des Einflusses der Einzelmotive

gezeigt: Mutation des äußerst 5'lokalisierten Hexanukleotids hatte die Induzierbarkeit auf ein Fünftel reduziert, während die übrigen Elemente nur geringen Einfluß ausübten. Die unterschiedlichen Ergebnisse erklären sich zum Teil durch die unterschiedlichen Techniken zur Gewinnung der Mutanten. Linker-Scanning Mutanten treffen nicht immer 100%ig die gewünschte Sequenz, außerdem treten häufig zusätzliche Deletionen oder Insertionen auf, deren Einfluß schwer abschätzbar ist.

#### Die Homologie zum TO-Gen

Eine andere Basenfolge der proximalen Domäne, die Homologie zum TO-Gen der Ratte, hatte starken Einfluß auf die Hormoninduktion, obwohl die in vitro Bindungsstudien keine spezifische Reaktion mit dem Rezeptormolekül nachgewiesen hatten. Es wäre denkbar, daß diese Sequenz von einem weiteren Faktor erkannt wird. Im TO-Gen liegen die Glucocorticoid-Rezeptor Bindungsdomänen weit stromaufwärts von der Homologie-Sequenz (Danesch et al. 1987). Für die Hormoninduktion müßte nicht notwendigerweise ein gleichzeitiges Binden stattfinden, man kann sich auch eine zeitliche Abfolge vorstellen.

#### Sequenzen außerhalb von bisher bekannten mit Proteinen interagierenden Bereichen

Auch Sequenzen außerhalb der Regionen, für die das Binden eines Proteins bereits nachgewiesen wurde, beeinflussen die Hormoninduzierbarkeit in unterschiedlichem Maß. Die Mutation der Homologie zur Enhancer-Kernsequenz reduzierte die Hormon-Induzierbarkeit um ein Drittel bis die Hälfte. Der Enhancer-Kernsequenz kommt also eine spezifische Funktion zu für die Wirkung des HRE zu. Die DNaseI Protektions-Experimente von Scheiderei et al. hatten keine direkte Rezeptor-Bindung in

diesem DNA-Bereich gezeigt, andererseits waren aber drei seiner Guaninreste einer Methylierung nicht zugänglich. Payvar et al. (1983) konnten einen footprint in der Region zwischen den Nukleotiden -137 bis -159 nachweisen. Das Resultat solcher Bindungsstudien ist stark abhängig von der Reinheit der Rezeptorpräparation, dem Rezeptormolekül assoziierte weitere Faktoren könnten zu den beschriebenen Unterschieden führen. Die in meinen Experimenten erzielten Resultate zusammen mit den Daten der in vitro Experimente scheinen mir für die Interaktion eines Faktors mit diesem DNA-Bereich zu sprechen. Dabei bleibt offen, ob es sich um den Rezeptor selbst oder ein anderes Protein handelt.

Ein kurzes Stück nach der mutierten Basenfolge existiert die selbe Sequenz ein zweites Mal. Sowohl in den Methylierungs-Experimenten, als auch in den footprint-Analysen hatte nur das weiter 5' lokalisierte Element spezifisch reagiert. Möglicherweise arbeiten dennoch beide Basenfolgen zusammen, wie dies für die beiden Enhancer-Kernsequenzen der einzelnen 72bp repeats im Genom von SV40 gezeigt wurde (Zenke et al. 1986), oder die weiter 3' lokalisierte kann einen Ausfall der vorderen teilweise kompensieren - der Einfluß der Enhancer-Kernsequenz(en) auf die Funktion des HRE könnte daher stärker sein, als der in der vorliegenden Analyse bestimmte.

Die Mutation von sechs Basenpaaren am äußersten 5' Ende des HRE zeigte immer noch einen, wenn auch schwachen, Effekt. Auch die Guaninreste der Positionen -210 und -213, also Sequenzen vor der 5' Grenze von distaler Bindungsdomäne und in vivo definiertem Element hatten in Methylierungsschutz-Experimenten spezifisch reagiert. Eine Bedeutung dieser Region für die Interaktion mit dem Rezeptor wäre also möglich.

### Modell zur Interaktion von HRE und Glucocorticoid-Rezeptor

Das TGTTCT Motiv ist eine essentielle Sequenz der distalen Bindungsdomäne und die distale Domäne selbst ist für die Glucocorticoid-Induktion absolut notwendig. Mutation von einzelnen Motiven der proximalen Domäne hatte nur einen reduzierenden Effekt, man könnte daraus auf eine Verstärker-Funktion dieser Domäne schließen. Das ebenfalls durch Deletions-Analyse definierte HRE des menschlichen Metallothionein IIA Gens umfaßt nur 29bp, von denen 20 durch Binden des Rezeptors vor Abbau durch DNaseI geschützt werden. Das Element enthält eine singuläre dem MMTV-Hexanukleotid homologe Sequenz (TGTCCT) (Karin et al. 1984a). Für die Bindung eines Rezeptormoleküls kann also ein DNA-Element, das der distalen Domäne entspricht, durchaus hinreichen. Dies führt zu der Frage, wieviele Rezeptormoleküle gleichzeitig an das HRE von MMTV binden. Die proximale Bindungsdomäne ist fast doppelt so groß wie die distale und beinhaltet dreimal das TGTTCT Motiv. Aus sterischen Gründen ist unwahrscheinlich, daß tatsächlich drei Rezeptormoleküle an die proximale Domäne binden, aber unter der Annahme, daß die Orientierung des Rezeptors auf der DNA unabhängig von der Orientierung des Motivs erfolgt, kann man ein Modell entwerfen, das alternativ die Bindung von zwei oder einem Rezeptormolekül an die proximale Domäne vorsieht.

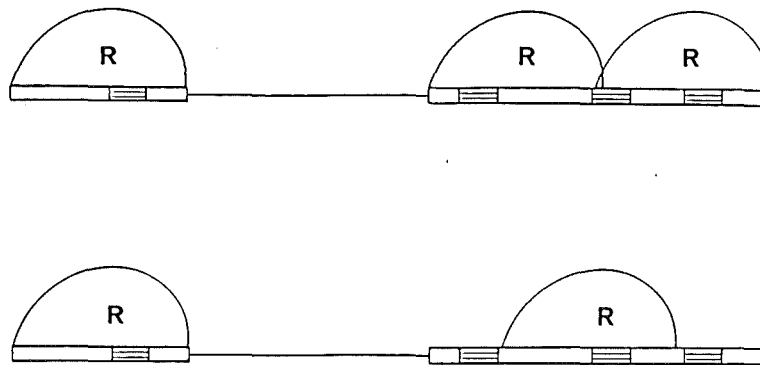


Abb.34: Modell zur Anordnung von Glucocorticoid-Rezeptormolekülen auf DNA des HREs. Die Rezeptor-Bindungsdomänen sind als Kästchen dargestellt, die gestreiften Abschnitte symbolisieren die TGTCT Motive. R = Rezeptormolekül

#### VERGLEICH MIT ANDEREN HORMON-REGULATIONS-SYSTEMEN

Mit meinen Experimenten habe ich die biologische Signifikanz diverser Basenfolgen innerhalb und außerhalb der vom Rezeptor gebundenen DNA-Bereiche des HRE für die Induzierbarkeit durch Glucocorticoide untersucht. Es wurde deutlich, wie empfindlich das System auf Veränderungen der regulatorischen DNA-Sequenz reagiert. Dies spricht für eine hohe Spezifität der HRE-Sequenz für den Glucocorticoid-Rezeptor. Andererseits ist bereits seit einigen Jahren bekannt, daß in vitro auch der Progesteron-Rezeptor an das HRE bindet und dabei in DNaseI Protektions Experimenten genau die selben Sequenzen vor Abbau schützt wie der Glucocorticoid-Rezeptor (Von der Ahe et al. 1985). Kürzlich gelang der Nachweis, daß das HRE auch in vivo einem fremden Promotor in Enhancer-ähnlicher Weise Progesteron-Induzierbarkeit vermittelt (Cato et al. 1986). Fast die identische Situation findet man in der 5'flankierenden Region

des Hühner-Lysozymgens: In Footprint-Experimenten schützen sowohl Glucocorticoid- als auch Progesteron-Rezeptor zwei nahezu identische DNA-Domänen. Die proximale Domäne besitzt ein TGTTCT Motiv, sie wird stärker als die distale vom Glucocorticoid-Rezeptor gebunden; der Progesteron-Rezeptor verhält sich umgekehrt. Die Basenfolge 5'ATTCCTCTGT 3' taucht in beiden Domänen auf und wurde deshalb mit der Bindung des Progesteron-Rezeptors in Verbindung gebracht (Renkawitz et al. 1984, Von der Ahe et al. 1985).

Wie sind diese Ergebnisse mit der Spezifität von Hormonen bei der Geninduktion in Einklang zu bringen?

In den letzten Jahren gelangen Isolierung, Sequenzierung und funktionelle Analyse von cDNAs verschiedener Steroidhormon-Rezeptor-Klassen von Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen und Huhn (Danielsen et al. 1986, Hollenberg et al. 1985, Krust et al. 1986, Walter et al. 1985, Loosfeld et al. 1986, Jeltsch et al. 1986). Die Baupläne der einzelnen Rezeptoren ähneln sich sehr stark. Besonders die DNA-bindenden Domänen gleicher Rezeptorklassen verschiedener Spezies zeichnen sich durch weitgehende Homologie aus. Der Östrogen-Rezeptor von Mensch und Huhn sind in dieser Region auf Aminosäureebene 100% identisch. Auch der Vergleich der DNA-bindenden Domänen verschiedener Rezeptorklassen weist auf einen prinzipiell identischen Aufbau hin: der menschliche Östrogen-Rezeptor ist dem menschlichen Glucocorticoid-Rezeptor in diesem Bereich noch zu 61% homolog (Krust et al. 1986). Dieser Unterschied zwischen den DNA-bindenden Domänen beider Rezeptoren reicht aber aus, um spezifisch verschiedene DNA-Sequenzen zu erkennen. Ein chimäres Östrogen-Rezeptorprotein, dessen DNA-bindende Domäne gegen die des Glucocorticoid-Rezeptors ausgetauscht ist, vermag Östrogen-abhängig nur den Glucocorticoid-induzierbaren MMTV-Promotor zu

aktivieren, nicht aber den Östrogen-induzierbaren Vitellogenin-Promotor (Green u. Chambon 1987). Dagegen sind die DNA-bindenden Domänen des menschlichen Glucocorticoid-Rezeptors und des Hühner Progesteron-Rezeptors zu 91% homolog (Jeltsch et al. 1986) und der Ratten Glucocorticoid-Rezeptor und der Kaninchen Progesteron-Rezeptor binden nahezu identische Bereiche der regulatorischen Region von MMTV und Lysozymgen (Von der Ahe et al. 1985). Dennoch werden in vivo nicht alle Gene, die durch Progesteron aktivierbar sind, gleichzeitig durch Glucocorticoide induziert und umgekehrt. Die Expression des Vitellogenins, eines Vorläufers der Dotterproteine, wird bei Eier legenden Vertebraten wie Frosch und Huhn durch Östrogene in Leberzellen induziert (Übersichtsart. Tata 1978), nicht aber in Oviduktzellen, die ebenfalls Östrogenrezeptoren besitzen. Man muß annehmen, daß weitere zelluläre Faktoren, vielleicht über ganz andere regulatorische DNA-Bereiche, eingreifen, um die spezifische Aktivierbarkeit einzelner Gene in verschiedenen Geweben zu steuern.

Die biologische Bedeutung, die identische Erkennungsregionen für verschiedene Hormone für die Regulation der Genexpression im Gewebeverband oder im Gesamt-Organismus haben, bleibt noch zu klären (Jeltsch et al. 1986).

#### VERGLEICH MIT ANDEREN ENHANCERN

Viele virale Enhancer zeichnen sich durch den Besitz einer repetitiven Sequenz von durchschnittlich 70bp aus. Häufig besitzt jede der repetitiven Sequenzen auch separat Enhancer-Eigenschaft. Eine Feinanalyse des 72bp repeats des SV40 Enhancers (Zenke et al. 1986, Firak u. Subramanian 1986) zeigte die Existenz von zwei Subdomänen, die durch spezifische Sequenzmotive charakterisiert

sind und selbst ebenfalls orientierungsunabhängig einen Promotor aktivieren können. Domäne A ist gekennzeichnet durch zwei "SphI-Motive", Domäne B besitzt zwei Enhancer-Kernsequenzen. Mutation von Einzelmotiven führte aber in keinem Fall zu einer vollständigen Inaktivierung, wie dies die Mutation des TGTTCT Motivs der distalen Bindungsdomäne getan hatte. Die Motive des SV40 Enhancers schienen vielmehr nahezu gleichberechtigt additiv zu wirken.

Während der SV40 Enhancer konstitutiv die Transcription von gekoppelten Promotoren erhöht, funktioniert das HRE nur in Gegenwart von Glucocorticoiden. Dieser augenfällige Unterschied in der Wirkungsweise ergibt sich jedoch nur aus der Verfügbarkeit der trans-wirkenden Faktoren: der SV40 Enhancer interagiert offenbar mit ubiquitär verbreiteten Proteinen (Sassone-Corsi et al. 1985), das HRE benutzt mindestens ein Protein, das nur unter bestimmten Bedingungen aktiv ist.

Das Moloney Maus Sarkom Virus (MoMSV) kombiniert konstitutive und konditionale Enhancer-Eigenschaften (Miksicek et al. 1986). Es besitzt 5' von seiner Initiationsstelle im LTR eine unvollständig repetitierte Sequenz von 73 bzw. 74bp (Laimins et al. 1982). Ebenso wie die entsprechende Region des SV40 Genoms hat sie als Gesamtheit, aber auch jeder Teil einzeln, Enhancer-Eigenschaft. Deletionsanalysen haben gezeigt, daß sich beide repetitierte Sequenzen aus mindestens zwei funktionellen Domänen zusammensetzen (Schulze et al. 1985). Beide besitzen an ihren 3'Enden ein TGTTCT Motiv, ein weiteres befindet sich direkt 5' vor den repetitierten Sequenzen. Die Hexanukleotide und ihre umgebenden Basen werden in DNaseI Protektions Experimenten durch den Glucocorticoid-Rezeptor vor Abbau geschützt. Zwischen den Bindungsdomänen befindet sich jeweils eine Homologie zur Enhancer-Kernsequenz, so daß sich eine ganz ähnliche Situation



wie im HRE von MMTV ergibt. Im Gegensatz zum HRE erhöht der MoMSV-Enhancer die Transcriptionsrate eines gekoppelten TK-CAT-Chimären gens jedoch bereits in Abwesenheit von Hormon. Glucocorticoide führen zu einer weiteren Induktion um das 2-6fache. Beide Eigenschaften werden auch von jeder repetitierten Sequenz einzeln unabhängig von Distanz, Position und Orientierung vermittelt, und können voneinander getrennt werden (DeFranco u. Yamamoto 1986). Obwohl im MoMSV-Enhancer formal die gleiche Situation herrscht wie im HRE, zeichnen sich die Elemente durch stark unterschiedliche Selbständigkeit ihrer Subdomänen aus.

Eine ganze Reihe weiterer Retroviren besitzen ebenfalls TGTTCT Motive, deren biologische Bedeutung aber bisher nicht geklärt ist. Möglicherweise ist die Induzierbarkeit durch Glucocorticoide ein unter Retroviren weitverbreiteter Mechanismus zur Erhöhung ihrer Expression (Miksicek et al. 1986).

Der MMTV-Enhancer funktioniert anscheinend überhaupt nur in Gegenwart von Steroid-Hormonen. Möglicherweise benutzt MMTV den hormonellen Zustand seiner Wirtszelle als Signal, um im geeigneten Moment besonders aktiv zu sein. Sinnvoll ist eine hohe Virusproduktion, wenn für die Übertragung auf die kommende Generation gesorgt werden soll, d.h. während der Schwangerschaft des Wirts.

Möglicherweise sind Hormon-Induzierbarkeit und Enhancer-Eigenschaft prinzipiell verknüpft. Es gibt Hinweise, daß beide Funktionen auch von den hormone response elements anderer Gene erfüllt werden: das HRE des menschlichen Metallothionein IIA Gens kann, zumindest zusammen mit weiteren Sequenzen aus der 5' flankierenden Region, dem TK-Promotor distanzunabhängig Glucocorticoid-Induzierbarkeit vermitteln (Karin et al. 1984b). Das selbe gilt für das HRE im ersten Intron des menschlichen Wachstumshormongens, wobei es außerdem Orientierungs-unabhängig

wirkt (Slater et al. 1985). Auch das estrogen response element (ERE) im Xenopus Vitellogenin-Promotor erfüllt seine Funktion Orientierungs-unabhängig (pers. Mitt. G.Ryffel).

#### AUSBLICK

Innerhalb der letzten 2-3 Jahre wurden große Fortschritte erzielt in Isolierung und Charakterisierung trans-wirkender Faktoren und der für sie kodierenden Gene. Zusammen mit den immer detaillierteren Daten über die cis-wirkenden DNA-Sequenzen sind nun die Voraussetzungen vorhanden, Modelle zur Genregulation zu verifizieren. Gleichzeitige Veränderungen an cis- wie an trans-wirkenden Elementen können jetzt gezielt eingesetzt werden, um offene Fragen über DNA/Protein- und Protein/Protein-Interaktionen zu klären.

LITERATURVERZEICHNIS

- Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. 1981 Cell 27, 299-308
- Banerji J., Olson L., Schaffner W. 1983 Cell 33 729-740
- Benoist C., Chambon P. 1981 Nature 290 304-310
- Berg J. 1986 Science 232 485-487
- Berk A., Sharp P. 1977 Cell 12 721-732
- Bern H., Nandi S. 1961 Prog. Exp. Tumor Res. 2 90-98
- Bittner J. 1936 Science 84 162-169
- Blair P. 1986 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 45 1
- Boot L. 1969 "Induction by Prolactin of Mammary Tumors in Mice"  
North-Holland Publ., Amsterdam
- Boot L. 1970 Int. J. Cancer 5 165
- Boot L. 1981 in "Mammary Tumors in the mouse" Verl: Hilgers J.,  
Sluysers M. Biomedical Press, Elsevier, Amsterdam 117-200
- Boulet A., Erwin C., Rutter W. 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83  
3599-3603
- Breathnach R., Chambon P. 1981 Ann. Rev. Biochem. 50 349-383
- Brown D. 1984 Cell 37 359-365
- Buetti E., Diggelmann H. 1981 Cell 23 335-345
- Buetti E., Kühnel B. 1986 J. Mol. Biol. 190 379-389
- Carlstedt-Duke J., Okret S., Wrangé O., Gustaffson J. 1982 Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 79 4260-4264
- Cato A., Miksicek R., Schütz G., Arnemann J., Beato M. 1986 EMBO  
J. 5 2237-2240
- Chao M., Mellon P., Charnay P., Maniatis T., Axel R. 1983 Cell 32  
483-493
- Coffin J. 1982 in "RNA Tumor Viruses" Verl: Weiss R., Teich N.,  
Varmus H., Coffin J. Cold Spring Harbour Lab. 261-368
- Cohen R., Sheffrey M., Kim C. 1986 Mol. Cell. Biol. 6 821-832
- Corden T., Wasylyk B., Buchwalder A., Sassone-Corsi P., Kedinger

- C., Chambon P. 1980 Science 209 1406-1414
- Danielsen M., Northrop J., Ringold G. 1986 EMBO J. 5 2513-2522
- Danesch U., Gloss B., Schmid W., Schütz G., Renkawitz R. 1987 in  
Vorber.
- Davidson B., Egli J.-M., Milvihill E., Chambon P. 1983 Nature 301  
680-686
- De Franco D., Yamamoto K. 1986 Mol. Cell Biol. 6 993-1001
- Dente L., Cesareni G., Cortese R. 1983 Nucl. Acids Res. 11  
1645-1655
- De Villiers J., Schaffner W. 1981 Nucl. Acids Res. 9 6251-6264
- De Villiers J., Olson L., Tyndall C., Schaffner W. 1982 Nucl.  
Acids. Res. 10 7965-7976
- Dickson C., Haslam S., Nandi S. 1974 Virol. 2 242-252
- Dierks P., Van Ooyen A., Mantei N., Weissmann C. 1981 Proc. Natl  
Acad. Sci. USA 78 1411-1415
- Dierks P., Van Ooyen A., Cochran M., Dobkin C., Reiser J.,  
Weissmann C. 1983 Cell 32 695-706
- Dorsch-Häsler K., Keil G., Weber F., Jasin M., Schaffner W.,  
Koszinowski U. 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 8325-8329
- Dougherty J., Augerau P., Chambon P. 1986 Mol. Cell. Biol. 6  
4117-4121
- Dynan W., Tjian R. 1983 Cell 32 669-680
- Dynan W., Tjian R. 1983 Cell 35 79-87
- Dynan W., Tjian R. 1985 Nature 316 774-778
- Dynan W., Sazer S., Tjian R., Schimke R. 1986 Nature 319 246-248
- Efstradiatis A., Posakony J., Maniatis T., Lawn R., O'Connell C.  
Spritz R., DeRiel J., Forget B., Slighton L., Blechl A.,  
Smithies O., Baralle F., Shoulders C., Proudfoot N. 1980 Cell 21  
653-668
- Firak T., Subramanian K. 1986 Mol. Cell. Biol. 6 3667-3676
- Friend C., Scher W., Holland J., Sato T. 1971 Proc. Natl. Acad.

- Sci USA 68 378-382
- Gillies S., Morrison S., Oi V., Tonegawa S. 1983 Cell 33 717-728
- Godowski P., Rusconi S., Miesfeld R., Yamamoto K. 1987 Nature 325  
365-368
- Goodbourn S., Burstein H., Maniatis T. 1986 Cell 45 601-610
- Gorman C., Moffat L., Howard B. 1982 Mol. Cell. Biol. 2 1044-1051
- Gorman C., Merlino G., Willingham M., Pastan I., Howard B. 1982  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 6777-6781
- Green S., Walter P., Kumar P., Krust A., Bornert J., Argos P.,  
Chambon P. 1986 Nature 320 134-139
- Green S., Chambon P. 1987 Nature 325 75-78
- Gronemeyer H., Pongs O. 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77  
2108-2112
- Groner B., Kennedy N., Rahmsdorf U., Herrlich P., Van Ooyen A.,  
Hynes N. 1982 in "Hormones and Cell Regulation" Verl.:Dumont J.,  
Nunez J., Schulz G. Elsevier, Amsterdam 6 217-228
- Groner B., Hynes N., Rahmsdorf U., Ponta H. 1983 Nucl. Acids Res.  
11 4713-4725
- Groner B., Kennedy N., Skroch P., Hynes N., Ponta H. 1984  
Biochim. Biophys. Acta 781 1-6
- Hanahan D. 1983 J. Mol. Biol. 166 557-580
- Hearing P., Shenk T. 1983 Cell 33 695-703
- Herbomel P., Bourachot B., Yaniv M. 1984 Cell 39 653-662
- Hollenberg S., Weinberger C., Ong E., Cerelli G., Oro A., Lebo  
R., Thompson E., Rosenfeld M., Evans R. 1985 Nature 318 635-641
- Huang A., Ostrowski M., Berard D., Hager G. 1981 Cell 27 245-255
- Hynes N., Kennedy N., Rahmsdorf U., Groner B. 1981 Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 78 2038-2042
- Hynes N., Van Ooyen A., Kennedy N., Herrlich P., Ponta H., Groner  
B. 1983 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 3637-3641
- Jensen E., Jacobson H. 1962 Rec. Prog. Horm. Res. 18 387-418

- Jensen E., Suzuki T., Kawashima T., Strumpf W., Jungblut P., De Sombre E. 1968 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59 632-638
- Jones K., Yamamoto K., Tjian R. 1985 Cell 42 559-572
- Jones K., Kadonaga J., Rosenfeld P., Kelly T., Tjian R. 1987 Cell 48 79-89
- Jungermann K., Möhler H. 1980 "Biochemie" Springer Verl., Berlin 259-262 und 556-560
- Kadonaga J., Jones K., Tjian R. 1986 Trends Bioch. Sci. 11 20-23
- Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Richards R., Krauter P., Westphal H., Beato M. 1984a Nature 308 513-519
- Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Cathala J., Slater E., Baxter J. 1984b Cell 36 371-379
- Karlson P. 1983 Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem. 364 1067-1087
- Klein-Hitpaß L., Schorpp M., Wagner U., Ryffel G. 1986 Cell 46 1053-1061
- Kumar V., Green S., Staub A., Chambon P. 1986 EMBO J. 5 2231-2236
- Krust A., Green S., Argos P., Kumar V., Walter P., Bornert J-M., Chambon P. 1986 EMBO J. 5 891-897
- Laimins L., Khoury G., Gorman C., Howard B., Gruss P. 1982 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 6453-6457
- Lathrop A., Loeb L. 1913 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 11 34
- Lee F., Mulligan R., Berg P., Ringold G. 1981 Nature 294 228-232
- Leegwater P., Van der Vliet P., Rupp R., Nowock J., Sippel A. 1986 EMBO J. 5 381-386
- Levinson B., Khoury G., Van de Woude G., Gruss P. 1982 Nature 295 568-572
- Lewis M., Burgess R. 1982 in "The Enzymes" Verl: Boyer D. Acad. Press, New York 158 109-153
- Loosfelt M., Atger M., Misrahi M., Guiochon-Mantel A., Meriel C., Logeat F., Benarous R., Milgrom E. 1986 Proc. Natl. Acad. Sci USA 83 9045-9049

- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. 1951 J. Biol. Chem. 193 265-275
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. 1982 "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbour Lab., New York
- Matsui T., Segall J., Weil P., Roeder G. 1980 J. Biol. Chem. 225 11992-11996
- Mayo K., Palmiter R. 1980 J. Biol. Chem. 256 2621-2624
- Maxam A., Gilbert W. 1980 Meth. Enzymol. 65 499-560
- McKnight S. 1980 Nucl. Acids Res. 8 5949-5964
- McKnight S., Gavis E., Kingsbury R. 1981 Cell 25 385-398
- McKnight S., Kingsbury R., Spence A., Smith M. 1984 Cell 37 253-262
- McMaster G., Carmichael G. 1977 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 4835-4838
- Melton D., Krieg P., Rebagliati M., Maniatis T., Zink K., Green M. 1984 Nucl. Acids Res. 12 7035-7056
- Miksicek R., Heber A., Schmid W., Danesch U., Posseckert G., Beato M., Schütz G. 1986 Cell 46 283-290
- Miksicek R., Nowock A. 1987 eingereicht EMBO J.
- Miller J., McLachlan A., Klug A. 1985 EMBO J. 4 1609-1614
- Moreau P., Hen R., Wasylyk B., Everett R., Gaub M., Chambon P. 1981 Nucl. Acids Res. 9 6047-6068
- Mühlbock O., Boot L. 1959 Canc. Res. 19 402-412
- Myers R., Rio D., Robbins A., Tjian R. 1981 Cell 25 373-384
- Nandi S., McGrath C. 1973 Adv. Cancer Res. 17 353-414
- Nir U., Walker M., Rutter W. 1986 Proc. Natl. Acad. Sci USA 83 3180-3184
- Nowock J., Borgmeyer U., Püschel A., Rupp R., Sippel A. 1985 Nucl. Acids Res. 13 2045-2061
- Parker C., Topol J. 1984 Cell 36 357-369
- Parks W., Scolnick E., Kozikowski E. 1974 Science 12 158-160

- Payvar F., Wrange O., Carlstedt-Duke J., Okret S., Gustafsson J., Yamamoto K. 1981 Proc. Natl. Acad. Sci USA 78 6628-6632
- Payvar F., De Franco D., Firestone G., Edgar B., Wrange O., Okret S., Gustafsson J., Yamamoto K. 1983 Cell 35 381-392
- Penzlin H. 1977 "Lehrbuch der Tierphysiologie" Fischer-Verlag Stuttgart
- Pfahl M. 1982 Cell 31 475-482
- Ponta H., Kennedy N., Skroch P., Hynes N, Groner B. 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 1020-1024
- Pauley R., Medina D., Socher H. 1979 J. Virol. 32 557-566
- Renkawitz R., Schütz G., Von der Ahe D., Beato M. 1984 Cell 37 503-510
- Ringold G., Yamamoto K., Tomkins G., Bishop J., Varmus H. 1975a Cell 6 299-305
- Ringold G., Lasfargues E., Bishop M., Varmus H. 1975 Virol. 65 135-147
- Rio D., Robbins A., Myers R., Tjian R. 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 5706-5710
- Rosenthal N., Kress M., Gruss P., Khoury G. 1983 Science 222 749-755
- Ross J., Itawi Y., Leder P. 1972 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 3620-3623
- Sassone-Corsi P., Borelli E. 1986 Trends Gen. 2 215-219
- Sassone-Corsi P., Wildeman A., Chambon P. 1985 Nature 313 458-463
- Scheidereit C., Geisse S., Westphal H., Beato M. 1983 Nature 304 749-752
- Scheidereit C., Beato M. 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 3029-3033
- Schmid W., Scherer G., Danesch U., Zentgraf H., Matthias P., Strange C., Röwekamp W., Schütz G. 1982 EMBO J. 1 1287-1293



- Schöler H., Gruss P. 1984 Cell 36 403-411
- Schöler H., Gruss P. 1985 EMBO J. 4 3005-3013
- Schulze F., Boehnlein E., Gruss P. 1985 DNA 4 193-202
- Sequin C., Felber B., Carter A., Hamer D. 1984 Nature 312  
781-785
- Serfling E., Jasin M., Schaffner W. 1985 Trends Gen. 1 224-230
- Shimkin M., Wyman R. 1945 J. Natl. Canc. Inst. 6 187
- Skroch P. 1983 Diplomarbeit Univ. Karlsruhe
- Slater E., Rabenau O., Karin M., Baxter J., Beato M. 1984 Mol.  
Cell. Biol. 5 2984-2992
- Sluyser M., Evers S., Goeij C. 1976 Nature 263 386-389
- Smoller C., Pitelka D., Bern H. 1961 J. Biophys. Biochem. Cytol. 9  
915-920
- Southern P. 1975 J. Mol. Biol: 98 503-517
- Southern P., Berg P. 1982 J. Mol. Appl. Gen. 1 327-341
- Talwar G., Segal S., Evans A., Davidson O. 1964 Proc. Natl. Acad.  
Sci USA 52 1052-1066
- Tata J. 1978 in "Hormones and Cell Regulation" Verl.: Dumont J.,  
Nunez J. Elsevier, Amsterdam 2 37-54
- Treisman R., Green M., Maniatis T. 1983 Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 80 7428-7432
- Van Nie R., Dux A. 1971 J. Natl. Canc. Res. 46 885-897
- Varmus H. 1983 in "Mobile Genetic Elements" Verl.: Shapiro J.  
Acad. Press, Orlando 411-503
- Varmus H., Swanstrom R. 1982 in "RNA Tumor Viruses" Verl: Weiss  
R., Teich N., Varmus H., Coffin J. Cold Spring Harbour Lab.  
369-512
- Von der Ahe D., Janich S., Scheidereit C., Renkawitz R., Schütz  
G., Beato M. 1985 Nature 313 706-709
- Vincent A. 1986 Nucl. Acids Res. 14 4385-4391
- Walker M., Edlund T., Boulet A., Rutter W. 1983 Nature 306

557-561

- Walter P., Green S., Greene G., Krust A., Bornert J-M., Jeltsch J., Staub A., Jensen E., Scrace G., Waterfield M., Chambon P. 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 7889-7893
- Weatherall D., Clegg J. 1981 Oxford Blackwell Sci. Publ.
- Weiher H., König M., Gruss P. 1983 Science 219 626-631
- Westphal H., Fleischmann G., Beato M. 1981 Eur. J. Biochem. 119 101-106
- Wigler M., Silverstein S., Lee L., Pellicer A., Chang Y., Axel R. 1977 Cell 11 223
- Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R. 1978 Cell 14 725-731
- Wildeman A., Sassone-Corsi P., Grundström T., Zenke F., Chambon P. 1984 EMBO J. 3 3129-3133
- Wilkie N., Clements J., Boll W., Mantei N., Lonsdale D., Weissmann C. 1979 Nucl. Acids Res. 7 859-877
- Wrange Ö., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J. 1979 J. Biol. Chem. 254 9284-9290
- Yamamoto K., Stampfer M., Tomkins G. 1974 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 3901-3905
- Young L., Cardiff R., Ashley R. 1975a J. Natl. Canc. Inst. 54 1215-1221
- Young H., Scolnik E., Park W. 1975 J. Biol. Chem 250 3337-3343
- Zenke M., Grundström M., Matthes H., Wintzerith M., Schatz C., Wildeman A., Chambon P. 1986 EMBO J. 5 387-397
- Zoller M., Smith M. 1984 DNA 3 479-488