

KfK 4441
Juli 1988

**Regulatorische Elemente
in den Albumin- und
Vitellogenin-Genen des
Krallenfrosches *Xenopus Laevis*:
Identifikation eines
zellspezifischen Aktivators im
Vitellogenin A2-Gen**

U. Döbbeling
Institut für Genetik und Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4441

REGULATORISCHE ELEMENTE IN DEN ALBUMIN- UND VITELLOGENIN-
GENEN DES KRALLenfROSCHEs XENOPUS LAEVIS:
IDENTIFIKATION EINES ZELLSPEZIFISCHEN AKTIVATORS IM
VITELLOGENIN A2 GEN.

Udo Döbbling

Dissertation genehmigt von der Fakultät für Bio- und Geowissen-
schaften der Universität Karlsruhe



Kernforschungszentrum Karlsruhe G.m.bH., 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

Die Albumin- und Vitellogenin-Gene von *Xenopus laevis* werden leberspezifisch exprimiert. Um die Regulationssequenzen zu identifizieren, die für die leberspezifische Expression dieser Gene verantwortlich sind, wurden die 5' flankierenden Bereiche des Albumin 68 Kd - und Vitellogenin A2 - Gens auf DNA-se I hypersensitive Bereiche untersucht, da diese Bereiche häufig genregulatorische Sequenzen enthalten.

Im Albumin 68 Kd - Gen konnte in der Nähe des Transkriptionsstarts ein leberspezifischer DNA-se I hypersensitiver Bereich gefunden werden, und in der 5' flankierenden Region des Vitellogenin A2 - Gens wurden in den Leberzellkernen von östrogenbehandelten Tieren zwei hypersensitive Bereiche bei -300 und -100 identifiziert. Diese drei hypersensitiven Bereiche korrelieren mit drei regulatorischen Sequenzen: Dem leberspezifischen Promotorelement HP1 des Albumin 68 Kd-Gens (Schorpp et. al., 1988), dem ERE (= estrogen responsive element) der Vitellogeningene (Klein-Hitpass et. al., 1986, Seiler-Tuyns et. al., 1986) und einem zellspezifischen Aktivator des Vitellogenin A2 - Gens (diese Arbeit).

Durch die Analyse von Restriktionsfragmenten, die den 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2 - Gens enthalten, auf Polyacrylamidgelen, konnte gezeigt werden, daß der Bereich von -270 bis -150 "curved DNA" enthält. Da bekannt war, daß der Bereich von -260 bis -87 einen hormonunabhängigen Aktivator besitzt (Klein-Hitpass et. al., 1986), wurde durch funktionelle Tests untersucht, ob die "curved DNA" mit dem Aktivator identisch ist.

Diese Tests zeigten, daß die "curved DNA" nicht der Aktivator ist. Der Aktivator liegt zwischen -121 und -87 und besteht aus mehreren Elementen. Er besitzt enhancerähnliche Eigenschaften, da er sowohl in umgekehrter Orientierung als auch in größerer Entfernung von Transkriptionsstarts aktiv ist. Er unterscheidet sich von einem Enhancer jedoch

dadurch, daß seine Wirksamkeit in umgekehrter Orientierung geringer ist und seine Wirkung mit größer werdender Entfernung vom Transkriptionsstart abnimmt.

Der Aktivator ist zellspezifisch. Er ist in MCF-7-(Brustkarzinom)-Zellen und Hepatomzellen wirksam, während er in Fibroblasten und Cervixkarzinomzellen keine Aktivierung bewirkt.

Die einzelnen Aktivatorelemente können mit Zellkernextrakten DNA-Proteinkomplexe bilden. Dies weist darauf hin, daß genregulatorische Proteine an den Aktivator binden können. Allerdings sind die Komplexe im Gegensatz zum Aktivator nicht zellspezifisch. Vermutlich müssen noch andere Faktoren, die nicht direkt an die DNA binden, vorhanden sein, damit der Aktivator wirksam sein kann.

REGULATORY ELEMENTS IN THE ALBUMIN- AND VITELLOGENIN GENES OF THE CLAWED FROG XENOPUS LAEVIS :
IDENTIFICATION OF A CELLSPECIFIC ACTIVATOR IN THE VITELLOGENIN A2 GENE.

ABSTRACT

The albumin and vitellogenin genes of *Xenopus laevis* are tissue-specifically expressed in the liver. To identify the regulatory sequences which are responsible for the tissue-specific expression, I have tested the 5' flanking regions of the albumin 68 kd and vitellogenin A2 gene for DNA-se I hypersensitive sites, since such sites are often correlated with gene regulatory sequences.

In the albumin 68 kd gene I could identify a liver-specific DNA-se I hypersensitive site which maps close to the start of transcription. In the 5' flanking region of the vitellogenin A2 gene two DNA-se I hypersensitive sites were found in liver nuclei of estrogen-treated animals at the positions -300 and -100.

All three DNA-se I hypersensitive sites are correlated with regulatory sequences - HP 1, the liver-specific promoter element of the albumin 68 kd gene (Schorpp et al. 1988b), the ERE (= estrogen responsive element) of the vitellogenin genes (Klein-Hitpass et al. 1986) and a cell-specific activator of the vitellogenin A2 gene (this work).

The analysis of restriction fragments containing the the 5' flanking region of vitellogenin A2 gene on polyacrylamide gels revealed, that the region between -270 and -160 contains curved DNA. The experiments of Klein-Hitpass et al. (1986) have shown, that the sequences between -260 and -87 contain a hormone-independent activator. As this region includes most of the curved DNA, I tested if the curved DNA represents or at least includes the activator. Transient transfection experiments using various deletion mutants of the vitellogenin A2 5' flanking region revealed, that the activator maps outside of the curved DNA between the positions -121 and -87. I could also show that it consists of three different elements and that possesses enhancer-like properties, as it is active at a long distance and in inverted orientation. But it differs

from an enhancer, as its activating potential is reduced in inverted orientation and diminishes at increasing distance from the start of transcription.

The activator is cell-specific. It is only effective in MCF-7 (breast cancer cell line) and hepatoma cells, whereas it is ineffective in fibroblasts and cervix carcinoma cells.

The individual activator elements form DNA-protein complexes with nuclear extracts. This indicates that regulatory proteins may bind the activator, but in contrast to the activator, these complexes are not cell-specific. Possibly other factors which do not bind directly to DNA are necessary to get activation.

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
c - AMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis (oxyethylenenitril)- tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure
HSV	Herpes simplex Virus
IMX	3-isobutyl-1-methyl-Xanthin
Kb	Kilobasenpaare

Kd	Kilodalton
KTartrat	Kaliumtartrat
MS 222	3-Aminobenzoessäure-ethylester
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
Nt	Nukleotide
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
tRNA	transfer-RNA
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethyl-ethylendiamin
tk	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit

INHALTSVERZEICHNIS	Seite:
ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN	V
EINLEITUNG	1
1. Die Albumin- und Vitellogenin-Gene von Xenopus laevis	1
2. Die Chromatinstruktur eukaryontischer Gene	2
3. "Curved DNA"	4
4. Die genregulatorischen Elemente der Eukaryonten	5
MATERIALIEN	8
1. Chemikalien, Enzyme, Arbeitsmittel und Radioisotope	8
2. Bakterien, Phagen und eukaryontische Zellen	11
3. Kulturmedien	12
METHODEN	13
Allgemeine Arbeitsmethoden	13
1. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	13
2. Extraktion von Nukleinsäuren	13
3. Fällung von Nukleinsäuren	13

	Seite:
Klonierungstechniken	14
1. Restriktionsverdau	14
2. Auffüllen von 5' Überhängen	14
3. Dephosphorylierung von DNA	15
4. Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen	15
5. Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Polyacrylamidgelen	16
6. Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen	16
7. Herstellung von Bal 31 - Deletionen	17
8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	17
9. Reinigung von Oligonukleotiden	18
10. Ligation von DNA-Fragmenten	19
11. Ligation von Linkern	19
12. Transfektion von Bakterien	19
13. Präparation von einzelsträngiger DNA aus rekombinanten pEMBl - Plasmiden	20

	Seite:
14. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA	21
15. Präparation großer Plasmid-DNA-Mengen	22
16. Präparation von Plasmid-DNA zur Trans- fektion von eukaryontischen Zellen	23
 ZELLKULTUR	 24
1. Trypsinbehandlung	24
2. Rekultivierung	25
3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
4. Transiente Transfektion und Protein- präparation	25
 Analytische Methoden	 26
1. Präparation von radioaktiv markierten Proben	26
1.1 Die Kinasierung von Oligonukleotiden	26
1.2 Die Nick-Translationsreaktion	27
2. DNA-Sequenzierung	28
2.1 Sequenzierung einzelsträngiger DNA nach Sanger	28
2.2 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	29
3. Isolierung von Blut- und Leberzellkernen	31

	Seite:
4. DNA-se I - Behandlung von Zellkernen	32
5. Isolierung DNA-se I unbehandelter Zellkern-DNA	33
6. Southern-Transfer von DNA	33
7. Proteinbestimmung nach Lowry	35
8. Bestimmung der CAT-Aktivität	35
9. "Band shift" - Analyse	36
ERGEBNISSE	37
1. Untersuchung des Albumin 68 Kd - Gens und Vitellogenin A2 - Gens auf DNA-se I hypersensitive Bereiche	37
1.1 Das Albumin 68 Kd - Gen enthält einen leberspezifischen DNA-se I hypersensitiven Bereich in der Nähe des Transkriptionsstarts	38
1.2 Das aktive Vitellogenin A2 - Gen enthält zwei leberspezifische DNA-se I hypersensitive Bereiche	44
2. Die 5' flankierende Region des Vitellogenin A2 - Gens enthält "curved DNA"	46

Seite:

3.	Charakterisierung eines zellspezifischen Aktivators im 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2 - Gens durch funktionelle Tests	51
3.1	Die "curved" DNA ist nicht der Aktivator	52
3.2	Der Aktivator liegt zwischen -121 und -87 und besteht aus mehreren Elementen	53
3.3	Der Aktivator besitzt Enhancereigenschaften	56
3.4	Der Aktivator ist c-AMP unabhängig	57
3.5	Der Aktivator ist zellspezifisch	59
3.6	Der Aktivator wird von DNA-bindenden Proteinen erkannt	62
	DISKUSSION	67
1.	Die DNA-se I hypersensitiven Bereiche des Albumin 68 Kd - und Vitellogen A2 - Gens korrelieren mit genregulatorischen Sequenzen	67
2.	Die "curved DNA" des Vitellogenin A2 - Gens	70
3.	Der Aktivator des Vitellogenin A2 - Gens	72
3.1	Der Aktivator besteht aus drei Elementen	72
3.2	Der Aktivator besitzt Enhancereigenschaften	73

	Seite:
3.3 Der Aktivator ist zellspezifisch	74
3.4 Der Aktivator wird von DNA-bindenden Proteinen erkannt	75
LITERATURVERZEICHNIS	83

EINLEITUNG

1. Die Albumin- und Vitellogenin-Gene von Xenopus laevis

In der Evolution bildeten sich vielzellige Organismen heraus, in denen verschiedene Gewebe unterschiedliche Aufgaben übernahmen. Diese Spezialisierung auf bestimmte Aufgaben führte dazu, daß in einem Gewebe nur ein Teil aller Gene aktiv ist, wobei jedes Gewebe seinen eigenen Satz exprimierter Gene besitzt, der zur Erfüllung der gewebespezifischen Aufgaben notwendig ist.

Die Mechanismen, die für die gewebespezifische Genaktivität verantwortlich sind, können an Genen untersucht werden, die nur in einem bestimmten Gewebe exprimiert werden. Für solche Untersuchungen sind die Albumin- und Vitellogenin-Gene des Krallenfrosches *Xenopus laevis* gut geeignet, da sie nur in der Leber exprimiert werden.

Albumin ist das häufigste Plasmaprotein der Wirbeltiere. *Xenopus laevis* besitzt zwei Albumin-Gene (68 Kd und 74 Kd, Westley et. al., 1981), die in der Leber von Kaulquappe und erwachsenem Tier aktiv sind und durch Östrogen reprimiert werden (May et. al., 1982, Kazmaier et. al., 1985, Wolffe et. al., 1985).

Die vier Vitellogenin-Gene (A1, A2, B1, B2) kodieren für die Vorläufer der Dotterproteine von *Xenopus laevis*. Sie werden nur in der Leber von erwachsenen Weibchen synthetisiert, und ihre Transkription wird durch Östrogen induziert (s. Übersichtsartikel von Wahli und Ryffel, 1985).

Die Vitellogenin-Gene können durch Östrogengabe auch in Männchen induziert werden. Die Kompetenz für das Östrogen-signal wird während der Metamorphose erworben und durch Thyroxin induziert (Huber et. al., 1979).

An diesen beiden Genfamilien kann daher nicht nur die gewebespezifische Genexpression, sondern auch die Hormonregulation untersucht werden.

Die Regulation von Genen erfolgt über kurze DNA-Sequenzen, an die genregulatorische Proteine binden (Ptashne, 1967, Gilbert und Müller-Hill, 1967). Die Albumin- und Vitellogenin-Gene bieten als leberspezifische Gene die Möglichkeit, die betreffenden Sequenzen zu identifizieren, die die leberspezifische Expression vermitteln.

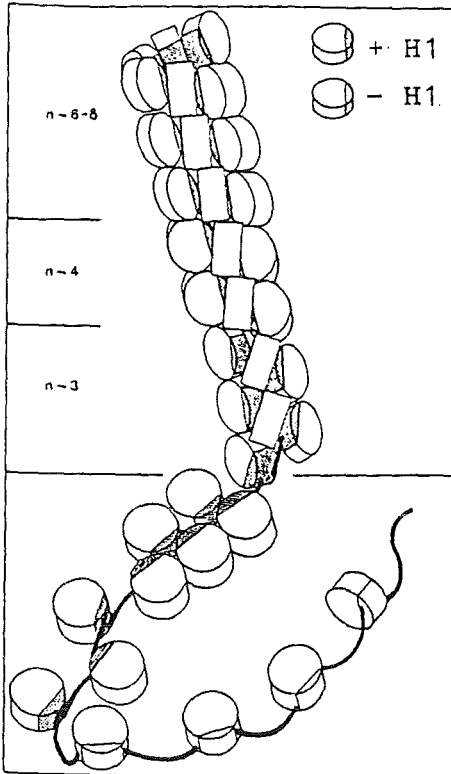
2. Die Chromatinstruktur der eukaryontischen Gene

Es stellt sich nun die Frage, wie man die Regulationssequenzen eines Gens identifizieren kann. Ein Hinweis darauf, wo im Gen eine regulatorische Sequenz liegt, kann die Chromatinstruktur geben. Die DNA von Eukaryonten ist auf Nukleosomen aufgewickelt. Die Nukleosomen bestehen aus vier Dimeren der vier Histonproteine 2A, 2B, 3 und 4. Die einzelnen Nukleosomen sind durch 40 bis 80 Bp lange, freie DNA-Abschnitte (Linker-DNA) miteinander verbunden und bilden eine perlenkettenähnliche Struktur (s. Abb. 1a). Nach dem Modell von Thoma et. al. (1979) wird durch die Bindung von Histon 1 - Molekülen (s. Abb. 1a) an die Linker-DNA die Perlenkettenstruktur soweit verdichtet, bis die sogenannte Solenoidstruktur entsteht, die eine Faser von 30 nm bildet (s. Abb. 1a).

Alle 50 bis 200 Kb ist die DNA an der Gerüststruktur der Chromosomen befestigt, die auch als Scaffold (engl. = Gerüst) bezeichnet wird (s. Abb. 1b, s. Übersichtsartikel von Reeves, 1984 und Gasser und Lämml, 1987).

Bei der Aktivierung eines Gens löst sich das Histon 1 von der DNA, und es entfalten sich die 50 - 200 Kb langen DNA-Schleifen, die dann in der Perlenkettenstruktur vorliegen. Durch diese Entfaltung wird die DNA für DNA-Polymerasen zugänglich. Solche entfalteten, aktiven DNA-Bereiche können leicht identifiziert werden, da sie auch für DNA-abbauende Enzyme, z.B. DNA-se I, leichter zugänglich sind (Weintraub und Groudine, 1976).

a.



b.

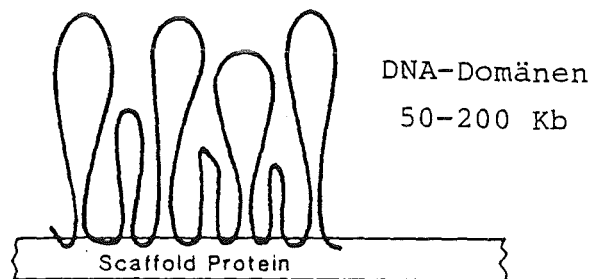


Abb. 1: Idealierte Darstellung der einzelnen Chromatinstrukturen

- a) Darstellung des Übergangs von einer inaktiven zu einer aktiven Chromatinstruktur.
Im inaktiven Zustand liegen die Gene in der Solenoidstruktur vor, eine Solenoid-Helixwindung enthält 6 - 8 Nukleosomen (oben).
Bei der Genaktivierung kommt es zur Entwindung der Solenoid-Helix ($n \sim 4$, $n \sim 3$), bis die Nukleosomen einzeln vorliegen (unten).
Im aktiven Zustand bindet kein Histon 1 (H1) mehr an den Nukleosomen, und die Gene liegen dann in der Perlenkettenstruktur vor (unten rechts).
- b) Die chromosomale DNA ist in Domänen von 50 - 200 Kb organisiert, die in der Gerüststruktur (Scaffold Protein) des Chromosoms verankert sind.

Innerhalb der aktiven Gene findet man kurze Abschnitte (ca. 200 - 300 Bp), die gegenüber DNA-se I besonders sensitiv sind (hypersensitive Bereiche), die häufig in den 5' flankierenden Regionen von Genen auftreten. Da in diesen Regionen wichtige Bereiche für die Genregulation liegen, wird vermutet, daß die DNA-se I hypersensitiven Bereiche mit genregulatorischen Sequenzen korreliert sind. Eine solche Korrelation konnte z.B. für die Regulationssequenzen des Affenvirus SV 40 und des Hühnchen-Vitellogenin-Gens nachgewiesen werden (Jonstra et. al., 1984, Burch und Weintraub, 1983).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des SV 40 - Genoms zeigten, daß die Regulationssequenzen frei von Nukleosomen sind (Saragosti et. al. 1980). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, daß die Regulationssequenzen eines aktiven Gens frei von Histonen sind, um den Regulationsproteinen den Zugang zur DNA zu ermöglichen. Da die regulatorischen Proteine nicht den gesamten histonfreien Bereich abdecken, bleiben freie DNA-Bereiche übrig, die von der DNA-se I angegriffen werden können.

Wenn nun die Albumin- und Vitellogenin-Gene ebenfalls DNA-se I hypersensitive Bereiche besitzen, so kann man diese Bereiche lokalisieren und gezielt auf genregulatorische Sequenzen untersuchen. Da DNA-se I hypersensitive Bereiche meist mit Regulationssequenzen korreliert sind, sollte es möglich sein, Sequenzen zu identifizieren, die für die Expression dieser Gene wichtig sind.

3. "Curved DNA"

Es gibt Vermutungen, daß regulatorische Proteine bevorzugt an DNA-Bereiche binden, die sich in ihrer Konformation von der "normalen" B-DNA unterscheiden, die dem Watson-Crick-Modell entspricht.

Eine solche besondere Konformation ist "curved DNA".

Der Name zeigt an, daß die DNA hier nicht als gerade Doppelhelix vorliegt, sondern daß die Doppelhelix gebogen ist. Die Biegung wird durch Adenin- und Thyminblöcke verursacht, die 3 bis 9 Basenpaare lang sind und sich alle 10 bis 11 Basenpaare wiederholen, was ungefähr einer Windung der DNA-Doppelhelix entspricht (Wu et. al., 1984, Diekmann, 1986, Koo et. al., 1986). Wie genau diese Adenin- und Thyminblöcke die Verbiegung der DNA-Helix bewirken, ist noch Gegenstand kontroverser Diskussion, da zwei verschiedene Modelle vorgeschlagen wurden (Koo et. al., 1986 und Ulanowsky et. al., 1987).

Die Krümmung der "curved DNA" bewirkt, daß Restriktionsfragmente, die "curved DNA" enthalten, in der Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen langsamer wandern, da diese Moleküle dem Polyacrylamidgel einen höheren Widerstand entgegensetzen als gerade DNA-Moleküle. Diese Eigenschaft macht es möglich, "curved DNA" leicht zu erkennen.

4. Die genregulatorischen Elemente der Eukaryonten

DNA-Abschnitte, die die Wirkung genregulatorischer Proteine vermitteln, werden in zwei Gruppen eingeteilt:

Enhancer und Promotorelemente (s. Übersichtsartikel von Maniatis et.al., 1987).

Enhancer sind orientierungsunabhängig und auch wirksam, wenn sie sehr weit (6 Kb und mehr) vom betreffenden Gen entfernt sind. Dabei ist es gleichgültig, ob der Enhancer vor oder hinter dem Gen liegt. Viele Enhancer können durch extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Hitzeschock, UV-Licht oder Hormone, induziert werden. Ein Beispiel für einen hormoninduzierten Enhancer ist das ERE (= estrogen responsive element) der Vitellogenin-Gene (Klein-Hitpass et.al., 1986).

Die Promotoren der eukaryontischen Gene bestehen aus zwei Komponenten. Die erste Komponente ist eine 6- bis 7 Basenpaare lange A-T-reiche Sequenz, die wegen ihrer Abfolge von Thyminen und Adeninen auch TATA-box genannt wird. Die TATA-box liegt in der Regel 25 bis 30 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart und bewirkt die korrekte Initiation der Transkription.

Die zweite Komponente sind die sogenannten stromaufwärts liegenden Promotorelemente (UPEs = upstream promoter elements), die 50 bis 150 Basenpaare oberhalb (= stromaufwärts) des Transkriptionsstarts liegen. Sie erhöhen die Transkription entweder in orientierungsabhängiger oder in orientierungsunabhängiger Weise. Die Einführung von zusätzlichen Nukleotiden zwischen den UPEs und der TATA-box führt jedoch im Gegensatz zu den Enhancern zu einer Reduktion der Transkriptionsrate. Ein Beispiel für ein solches Element ist die sogenannte CCAAT-box, die in vielen eukaryontischen Genen vorkommt.

Unter den Enhancern und UPEs gibt es Regulationselemente, die in allen Geweben die Transkription erhöhen, wie z.B. der SV 40 - Enhancer. Es gibt aber auch DNA-Sequenzen, die eine gewebespezifische Regulation bewirken. So konnten z.B. De Simone et. al., 1987, Courtois et. al., 1987, und Schorpp et. al., 1988, kürzlich ein Element beschreiben, das eine leberspezifische Regulation vermittelt.

Zielsetzung

Ziel meiner Doktorarbeit war es, durch die Untersuchung der Chromatinstruktur des Vitellogenin A2- und Albumin 68 Kd - Gens Hinweise auf die Position von genregulatorischen Sequenzen zu erhalten.

Hierbei waren folgende Fragen zu beantworten:

1. Gibt es im Albumin 68 Kd- und Vitellogenin A2-Gen leberspezifische DNA-se I hypersensitive Bereiche und wird die Ausprägung dieser Bereiche durch Östrogen beeinflusst?
2. Korrelieren leberspezifische DNA-se I hypersensitive Bereiche mit genregulatorischen Sequenzen und vermitteln diese Sequenzen die leberspezifische Expression?

MATERIALIEN

1. Chemikalien, Enzyme, Arbeitsmittel, Radioisotope

Acetyl Coenzym A	Pharmacia, Freiburg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	DIFCO, Detroit (USA)
Agarose, Typ II, Typ IV	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Böhringer, Mannheim
Ammoniumperoxidisulfat	Biorad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Trypton	DIFCO, Detroit (USA)
Bacto-Hefeextrakt	DIFCO, Detroit (USA)
Bacterienschalen	Greiner, Nürtingen
Bal 31 Exonuklease	Gibco-BRL, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
8-Bromo-c-AMP	Sigma, München
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
desoxy Nukleosidphosphate	Böhringer, Mannheim
didesoxy Nukleosidtriphosphate	Böhringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	Gibco-BRL, Karlsruhe
DNA Sequencing Kit	New England Nuclear, Dreieich
DNA-se I	Cooper Biomedical, Malvern (USA)
DNA-se I (RQ ₁ , RNA-se frei)	Genofit, Heidelberg
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Schwalbach
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Gene screen plus	New England Nuclear, Dreieich
Glasplatten für Elektrophorese	Renner, Darmstadt
Haftsilan	Wacker-Chemie, München
Harnstoff	Biorad, München
HEPES	Sigma, München

IMX (3-isobutyl-1-methyl-Xanthin)	Sigma, München
Kalbsthymus DNA	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Machery und Nagel, Düren
Linker-DNA	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Böhringer, Mannheim
Microtiterplatten	Greiner, Nürtingen
M-13 Pentadekamer (Primer)	New England Biolabs, Schwalbach
MS 222	Sigma, München
NACS-Prepac - Säulen	Gibco-BRL, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nick-translation Kit	Amersham-Buchler, Braunschweig
Nitrozellulosefilter	Schleicher und Schüll, Dassel
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio Rad, München
Nukleosidtriphosphate	Böhringer, Mannheim
Organische Lösungsmittel (Phenol, Chloroform, Ethylacetat, Aceton)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10 ⁴ U/ml)	Gibco-BRL, Karlsruhe
Polyethylenglykol	Sigma, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Quickszint	Zinsser, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	ABL, Basel Böhringer, Mannheim Gibco-BRL, Karlsruhe Promega-Biotec, Heidelberg Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, München
RNA-se A	Böhringer, Mannheim
RNA-se T1	Sigma, München
RNA-sin	Promega, Biotec, Heidelberg
transfer-RNA (Kalbsleber)	Böhringer, Mannheim
Salze und Säuren (NaCl, HCl etc.)	Merck, Darmstadt
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Böhringer, Mannheim

T4-Polynukleotidkinase	New England, Biolabs, Schwalbach
TEMED	BioRad, München
Tris	Sigma, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Whatman GF/C-Filter	Bender und Hobein, Karlsruhe
Whatman 3 MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg

Radiochemikalien

D-threo-(dichloracetyl-1-¹⁴C)

Chloramphenicol (7,4 MBq/ml, 1,96 GBq/mmol)

γ- ³² P	ATP (370 MBq/ml,	185 TBq/mmol)
α- ³² P	GTP (370 MBq/ml	15 MBq/mmol)
α- ³² P	UTP (370 MBq/ml	110 MBq/mmol)
α- ³⁵ S	dATP (296 MBq/n	14,8 T Bq/mmol)

2. Bakterien, Phagen und eukaryontische Zellen

Bakterien und Phagen

E. coli RR1 M15 F⁻, hsd S20, ara-14, pro A2, lac Y1,
ton A21, sup E44, -;
erhalten von U. Rüter, Heidelberg

E. coli 71/18 F', lacJ, lacZ, M15, pro⁺, sup E;
erhalten von R. Cortese, Heidelberg

Phage IR-I erhalten von R. Cortese, Heidelberg

Eukaryontische Zellen

MCF - 7 Menschliche Brustkarzinomzellen,
erhalten von Dr. Klein-Hitpass,
Karlsruhe

HepG2 Menschliche Hepatomzellen mit fötalem
Status, erhalten von Dr. Karin,
San Diego

BW1J Subklon der Maushepatom-Zelllinie
BW (Szpirer und Szpirer, 1975),
isoliert von Cassio und Weiss (1979),
erhalten von M.C. Weiss, Paris

LtK⁻ Maus-L-Zellderivat, Thymidinkinase-
Defekt, tumorigen,
erhalten von Dr. N. Hynes, Bern

NFB-München Primäre Hautfibroblasten eines gesunden
Menschen,
erhalten von Dr. Sperling, Berlin

HeLa Menschliche Cervixkarzinomzellen,
endotelial, gehalten von Dr. Drüge,
Karlsruhe

METHODEN

ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

1. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Nukleinsäurekonzentration wird in wässriger Lösung über die optische Dichte bestimmt. Dazu wird ein Spektrum von 320 bis 220 nm aufgenommen. Einer OD_{260} von 1,0 entsprechen 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige Oligonukleotid-DNA. Aus dem Verlauf des Spektrums kann die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden. Die OD_{280} (Absorption durch aromatische Aminosäuren) sollte maximal 70 % der OD_{260} betragen.

2. Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden von Proteinen durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt.

Das Mindestextraktionsvolumen sollte 50 μl betragen.

Ein Volumen nukleinhaltiger wässriger Lösung wird mit einem gleichen Volumen Phenol (gesättigt mit 0,1 M Tris pH 7,5, 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA) und einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) kräftig durchmischt und kurz zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige, obere wässrige Phase wird noch zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

3. Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wird mit NaAc pH 4,8 oder mit NaCl auf eine Konzentration von 0,2 M eingestellt und mit einem 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt. Nach einer Fällung von 30 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder über Nacht

bei -20°C werden die ausgefallenen Nukleinsäuren 10 min bei 8800 x g abzentrifugiert, zweimal in 80 %igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend unter Vakuum getrocknet.

KLONIERUNGSTECHNIKEN

1. Restriktionsverdau

Mit einer Enzymeinheit werden, falls vom Hersteller nicht anders angegeben, 1 μg DNA/h verdaut. Der Verdau erfolgt in der Regel in einem 2- bis 4-fachen Enzymüberschuß in einem Volumen von 20 μl , wobei die DNA-Konzentration 0,1 - 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ beträgt.

Die optimale Salzkonzentration wird mit 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer eingestellt (s. Angaben des Herstellers). Das Volumen an zugegebenem Enzym darf ein Zehntel des Endvolumens nicht überschreiten, da eine zu hohe Konzentration von Glycerin, in dem die Enzyme aufbewahrt werden, die Reaktion hemmt. Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration mindestens 10 mM) abgebrochen.

2. Auffüllen von 5' Überhängen

1 μg gereinigte Plasmid-DNA wird in 10 μl 7 mM Tris pH 7,5, 7 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT mit 0,5 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach werden 0,5 μl dNTP-Mix (10 mM dNTPs) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 μl 0,2 M EDTA gestoppt. Durch Phenol-Extraktion und anschließende Etherextraktion wird die DNA gereinigt und mit Ethanol gefällt.

3. Dephosphorylierung von DNA

Restriktionsverdauete, gereinigte DNA wird mit 4 U alkalischer Phosphatase in 50 μ l, 50 mM Tris - HCl pH 9,0, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $ZnCl_2$, 1 mM Spermidin 15 min bei 37 °C und 15 min bei 56 °C inkubiert. Danach werden vier weitere U alkalischer Phosphatase zugegeben und nochmals wie oben inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen bei 70 °C wird das Enzym inaktiviert.

4. Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen

Auf Agarosegelen werden DNA-Fragmente aufgetrennt, die größer als 0,5 Kb sind. Die Agarosekonzentration beträgt 0,8 bis 2,0 % . Je kleiner die zu untersuchenden DNA-Fragmente sind, desto höhere Agarosekonzentrationen werden verwendet. Zur Gelelektrophorese werden Gele von 25 x 13 cm oder Minigele von 12,5 x 8,5 cm verwendet.

Zur Herstellung der Gele wird die entsprechende Menge Agarose in 50 ml (Minigel) oder 200 ml (großes Gel) TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM NaAc pH 8,2, 1 mM EDTA) durch Erhitzen gelöst.

Zur Anfärbung der DNA wird entweder dem flüssigen Gel 0,3 μ g/ml Ethidiumbromid zugegeben oder das Gel nach der Elektrophorese in einer Lösung von 1 μ g/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Taschen zum Auftragen der DNA werden durch einen Kamm erzeugt.

Als Elektrophoresepuffer wird TAE verwendet. Die Elektrophorese erfolgt entweder bei 40 V über Nacht (große Gele) oder bei 100 V in 1 - 3 Stunden (Minigele). Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden durch das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

5. Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Polyacrylamid-
gelen

6%ige Polyacrylamidgele werden aus einer Stammlösung mit 29 Gew% Acrylamid und 1 Gew% NN' - Methylenebisacrylamid hergestellt. Die Endkonzentrationen im Gel betragen: 90 mM Tris, 90 mM Borat, 2,5 mM EDTA pH 8,3, 0,03 % TEMED und 0,07 % Ammoniumperoxidisulfat. Die Elektrophorese erfolgt in einer Gelapparatur nach Studier bei 100 bis 300 V in TBE-Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M Borat, 2,5 mM EDTA pH 8,3). Nach der Elektrophorese werden die Gele im Lauffpuffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht.

6. Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden
Bedingungen

Die getrockneten Nukleinsäuren werden in 3 µl Sanger-Probenpuffer (100 ml deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA, 0,03 g Xylencyanol, 0,03 g Bromphenolblau) aufgenommen, 3 min gekocht, sofort auf Eis gestellt und möglichst schnell auf ein Gel aufgetragen.

Ein Gel wird folgendermaßen vorbereitet: 30 ml einer Gel-lösung, bestehend aus 6 % Acrylamid (19 Teile Acrylamid, 1 Teil N, N' - Methylenebisacrylamid), 8 M Harnstoff in TBE wird nach Zugabe von 0,05 % TEMED und 0,1 % Ammoniumperoxidisulfat zwischen 2 Glasplatten mit Abstandshaltern (20 x 40 x 0,15 cm) gegossen.

Eine der Glasplatten war zuvor mit 2 ml Dimethyldichlor-silan silikonisiert worden, die andere mit 2,5 ml 0,3 % Haftsilan (in Ethanol mit 0,15 ml Essigsäure) beschichtet worden.

Die Gele werden 20 min bei 25 Watt vorelektrophoresiert. Die Auftrennung der Proben erfolgt ebenfalls bei 25 Watt, als Lauffpuffer dient TBE.

Nach der Auftrennung wird die silikonisierte Glasplatte abgehoben, das Gel bleibt auf der mit Haftsilan behandelten Platte. Das Gel wird 10 min in 10-%iger Essigsäure fixiert, unter fließendem Wasser abgespült, bei 80 °C getrocknet und autoradiographiert.

7. Herstellung von Bal 31 - Deletionen

25 µg geschnittene und gereinigte Plasmid-DNA wird in 300 µl Bal 31 - Puffer (12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1) mit 6 U Bal 31 bei 37 °C inkubiert. In 30 sec-Abständen werden dem Reaktionsgemisch je 75 µl entnommen und mit EDTA zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt. Auf diese Weise erhält man Deletionen von vier verschiedenen Zeitpunkten, deren Größen sich um ca. 100 Bp unterscheiden. Durch Variation der Zeitabstände und Enzymzugabe können entsprechend unterschiedlich große Deletionen erzielt werden. Die deletierten DNA-Fragmente werden anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und nachfolgende Ethanol-fällung gereinigt.

8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA wird auf ein Agarosegel Typ VII (Low gelling temperature) aufgetrennt. Das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wird ausgeschnitten und bei 68 °C geschmolzen. Danach wird ein gleiches Volumen (ca. 50 - 100 µl) einer 20 mM Tris, 10 mM EDTA-Lösung zugegeben und das ganze auf 47 °C abgekühlt. Nach Zugabe von einem gleichen Volumen (100 - 200 µl) TE (pH 9,0) gesättigtem Phenol wird die Lösung durchmischt und 5 min bei 47 °C inkubiert. Die Mischung wird bei 8000 x g 5 min abzentrifugiert, die wäßrige Phase abgenommen und mit einem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt.

9. Reinigung von Oligonukleotiden

Die einzelsträngigen Oligonukleotide werden auf einem Gene Assembler der Firma Pharmacia nach Gebrauchsanweisung synthetisiert, danach über Nacht in 1 ml 25%igem Ammoniak bei 50 °C aus der Kassette herausgelöst und unter Vakuum eingetrocknet.

Jeweils 250 µg eines Oligonukleotids werden in 60 µl Ladepuffer gelöst und auf einem 20%igen Polyacrylamidgel drei bis vier Stunden bei 1000 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer dient TBE (4 h, 60 mM Tris, 45 mM Borat, 2,5 mM EDTA, pH 8,9). Danach wird das Gel mit einer 10 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt und die oberste Bande, die das vollständige Oligonukleotid enthält, herausgeschnitten und die DNA mit 1 ml H₂O bei 37 °C über Nacht extrahiert. Danach werden die Gelreste über eine Quarzsandsäule abgetrennt und mit einem Spektralphotometer die DNA-Konzentration bestimmt. Jeweils gleiche Mengen komplementärer Stränge werden zusammengegeben und mit 4 M Ammoniumacetat auf 0,25 M Ammoniumacetat eingestellt.

Zur weiteren Reinigung des Oligonukleotids wird eine NACS-Prepac-Säule mit 1 ml Ammoniumacetat hydriert und jeweils 3 x mit 4 M Ammoniumacetat und 0,25 M Ammoniumacetat gewaschen. Danach läßt man die Oligonukleotide durch die Säule laufen und wäscht mit 2 x 100 µl 0,25 M Ammoniumacetat und 5 x mit 1 ml 0,25 M Ammoniumacetat. Danach wird dann das Oligonukleotid mit 3 x 100 µl 4 M Ammoniumacetat eluiert und in einem Rotationsverdampfer eingeeengt, wobei die komplementären Stränge sich miteinander paaren. Das eingetrocknete, doppelsträngige Oligonukleotid wird in 1 ml H₂O gelöst, die Konzentration bestimmt und bei -20 °C eingefroren. Das so vorbereitete Oligonukleotid kann für die Klonierung und Kinasierung verwendet werden.

10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente werden aus einem Typ VII - Agarosegel herausgeschnitten und in einem Verhältnis von 1:1 zusammengegeben. Die Gelstücke werden 10 min bei 68 °C geschmolzen, danach auf 42 °C abgekühlt und das Gemisch auf 20 mM Tris (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 250 ug/ml BSA und 3 mM ATP eingestellt. Die Mischung wird mit 1 - 2 U T4 - DNA - Ligase versetzt und für mindestens 3 h bei 15 °C inkubiert.

11. Ligation von Linkern

1 ug Linker-DNA wird mit 5 U Polynukleotidkinase und 10 mM ATP phosphoryliert. Die Inkubation erfolgt in 10 ul 70 mM Tris - HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂ über 60 min bei 37 °C.

2 ul phosphorylierte Linker-DNA werden zu 1 ug gereinigter blunt end - DNA gegeben und über Nacht bei 15 °C in 10 ul 70 mM Tris-HCl pH 7,5, 7 mM MgCl₂, 0,07 mM ATP mit 1 U T4-DNA-Ligase ligiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wird die Reaktionsmischung anschließend 10 min bei 68 °C inkubiert. Durch einen nachfolgenden Restriktionsverdau werden die Linkerketten getrimmt. Dazu wird die abgekühlte Reaktionsmischung auf das doppelte Volumen gebracht und mit 10-fach konzentriertem Enzympuffer auf die für das jeweilige Restriktionsenzym notwendige Salzkonzentration gebracht. Der Restriktionsverdau wird mit 40 - 60 Enzymeinheiten über 3 h durchgeführt. Auf einem Agarosegel wird dann die DNA von den überschüssigen Linkern abgetrennt.

12. Transfektion von Bakterien (Cohen et. al., 1972)

Eine Einzelkolonie wird über Nacht in 10 ml LB-Medium bei 37 °C hochwachsen gelassen. 1 ml der Übernachtskultur wird in 100 ml LB-Medium verdünnt und anschließend bei 37 °C

bis zu einer OD_{600} von 0,2 inkubiert. Die Bakterien werden 10 min bei 4 °C und 2000 x g abzentrifugiert, in eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und 30 min auf Eis stehengelassen. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Bakterien in 1 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ aufgenommen.

Zur Transfektion werden 100 ml der kompetenten Zellen mit 10 - 100 ng der zu transfizierenden DNA mit 10 bzw. 40 Vol% eines Ligationsansatzes 15 min auf Eis inkubiert. Dann wird der Ansatz 2 min auf 37 °C erwärmt, mit 0,5 ml LB-Medium versetzt, 2 min bei 42 °C und schließlich 45 min bei 37 °C inkubiert. Mit Top-Agar (0,8 % Agar in H_2O) werden die transfizierten Bakterien auf Selektivagarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

13. Präparation einzelsträngiger DNA aus rekombinanten pEMBL - Plasmiden (Dente et. al., 1983)

Bakterien des Stammes E. coli 71/18 werden mit pEMBL - Plasmiden - wie oben beschrieben - transfiziert, jedoch wird bei der Herstellung der kompetenten Zellen von einer Einzelkolonie ausgegangen, die auf Glukose/Minimalagarplatten gewachsen sind. Auf Minimalmedium können nur Bakterien wachsen, die ein pEMBL-Plasmid besitzen, das für die Prolin-Synthese notwendiges Gen enthält. Auf diesen Plasmiden ist gleichzeitig die Information für die F-pili-Synthese gespeichert. Durch die Vorselektion wird gewährleistet, daß die zu transfizierenden Bakterien F-pili besitzen, über die die Bakterien mit dem IR-I-Helferphagen infiziert werden können, mit deren Hilfe von den transfizierten pEMBL - Plasmiden einzelsträngige DNA synthetisiert werden kann (s. Übersichtsartikel von Messing, 1983).

Von einer rekombinanten Bakterienkolonie wird eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit 100 ug/ml Antibiotikum angesetzt. Davon wird 0,1 ml auf 5 ml LB-Medium mit 100 ug/ml Antibiotikum verdünnt und bis zu einer OD_{660} von 0,2 wachsen gelassen.

Dann werden die Zellen mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 20 mit dem Helferphagen IR-I infiziert (= ca. 4×10^9 Phagen/ml) und 6 h unter Schütteln weiterhin inkubiert. Anschließend werden pro Ansatz jeweils 2 x 1,5 ml Bakterien- und Phagensuspension 10 min bei 8800 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, ein zweites Mal zentrifugiert und 1,2 ml dieses Überstandes mit 150 ul 20 % PEG, 2,5 M NaCl versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die Phagen 10 min bei 8800 x g abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und die gefällten Phagenpartikel nochmals kurz zentrifugiert. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wird der restliche Überstand vorsichtig entfernt. Das Sediment wird in 200 ul 10 mM Tris pH 8,0, 0,1 mM EDTA aufgenommen und 30 - 60 min bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wird durch eine Extraktion mit 100 ul Phenol (gesättigt mit 0,1 M Tris - HCl pH 9,0, 10 mM EDTA) die Proteinhülle der Phagen entfernt. Die wäßrige Oberphase, die die einzelsträngige DNA enthält, wird 2 x mit 200 ul Chloroform extrahiert. Die einzelsträngige DNA wird schließlich in Gegenwart von 0,4 M LiCl mit 2,5 Vol Ethanol über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt.

Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 8800 x g wird die DNA mit 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und danach in 30 ul 10 mM Tris - HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA aufgenommen. Um die Ausbeute an einzelsträngiger DNA und deren Qualität abzuschätzen, werden 5 ul der DNA-Lösung auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Verhältnis der produzierten einzelsträngigen DNA zur Helferphagen-DNA sollte 2:1 betragen.

14. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA

1,5 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium mit 35 ug/ml Ampicillin werden 1 min bei 8800 x g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wird mit 100 ul einer eiskalten

LysozymbLösung (2 mg/ml Lysozym, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris - HCl) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 200 ul alkalische SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % SDS) zugegeben, 5 min stehengelassen, mit 150 ul 3M NaAC versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation mit 8800 x g wird der Überstand mit 1 ml Ethanol versetzt, die Plasmid-DNA 30 min bei -20 °C ausgefällt und schließlich mit 8800 x g abzentrifugiert. Das Sediment wird in 100 ul 50 mM Tris - HCl pH 8,0, 0,1 M NaAC aufgenommen und erneut mit Ethanol 10 min bei -20 °C gefällt. Danach wird die Plasmid-DNA mit 8800 x g abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 50 ul 10 mM Tris - HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA aufgenommen.

15. Präparation großer Plasmid-DNA-Mengen (Birnboim und Doly, 1979)

200 ml einer Bakterien-Übernachtskultur werden bei 4 °C mit 3600 x g abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 10 ml LysozymbLösung aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert, mit 20 ml alkalischer SDS-Lösung versetzt, 5 min weiterinkubiert, und schließlich werden 15 ml 3 M NaAC pH 4,8 zugegeben. Nach 60 min Inkubation auf Eis werden die Zellfragmente und die hochmolekulare DNA 10 min bei 4 °C mit 16800 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 100 ml Ethanol versetzt und 30 min bei -80 °C inkubiert. Die ausgefallene Plasmid-DNA wird 10 min bei 4 °C mit 10800 x g abzentrifugiert und in 10 ml 50 mM Tris - HCl pH 8,0, 100 mM NaAC resuspendiert. Die Plasmid-DNA wird ein weiteres Mal mit Ethanol gefällt und danach in 50 mM Tris - HCl pH 8,0, 1 mM EDTA aufgenommen. Zur DNA-Lösung wird CsCl zu einer Endkonzentration von 4,2 M und 0,5 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gegeben. Diese Lösung wird in einem Beckman-Vertikalrotor, Typ 65, 16 h mit 55000 U/min zentrifugiert. Durch das CsCl bildet sich ein Dichtegradient aus, in dem die Plasmid-DNA von der

verbliebenen genomischen DNA entsprechend ihrer verschiedenen Auftriebsdichte getrennt wird. Die plasmidhaltige Bande wird mit einer Spritze abgezogen und erneut unter den selben Bedingungen 6 h zentrifugiert. Wiederum wird die plasmidhaltige Bande abgezogen, mit 2 Vol H₂O verdünnt, 3 x mit wassergesättigtem Butanol extrahiert und ohne Salzzugabe mit Ethanol gefällt.

16. Präparation von Plasmid-DNA zur Transfektion von eukaryontischen Zellen (Maniatis et. al., 1982)

0,5 ml einer Übernachtskultur werden in 500 ml LB-Medium mit 35 ug/ml Antibiotikum angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 wachengelassen. Dann wird, um die Plasmide zu amplifizieren, 100 ug/ml Tetrazyklin für CAT-Plasmide oder 170 ug/ml Chloramphenicol für andere Plasmide zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wird die Bakteriensuspension 10 min bei 4 °C mit 3600 x g abzentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml 50 mM Tris - HCl pH 8,0, 25 % Sacharose aufgenommen, in ein Polyallomer-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml 2 mg/ml Lysozym, 100 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und weiteren 10 min bei 70 °C werden die Zellfragmente von der Plasmid-DNA durch 60 min Zentrifugation im Beckman-Rotor SW 40 oder SW 40.1 bei 40 000 U/min und 4 °C getrennt. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA mit 10 ml 20 % PEG, 1 M NaCl in TE (10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) 30 bis 90 min bei Raumtemperatur ausgefällt und anschließend 5 min bei 2400 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in 3 ml TE 30 bis 60 min bei 37 °C gelöst. Nach Zugabe von 4,2 g CsCl und 250 ul Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) wird eine Dichtegradientenzentrifugation - wie oben beschrieben - durchgeführt. Nach den zwei Zentrifugationsschritten wird die Plasmid-DNA mit einem gleichen Volumen Butanol (gesättigt mit 1 M NaCl) solange extrahiert, bis alles Ethidiumbromid entfernt worden ist, (ca. 3 bis 4-mal). Dann wird die Plasmidlösung

gegen 1 l 10 mM Tris - HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA 16 bis 24 h dialysiert. Der Puffer wird zweimal gewechselt. Wenn das Volumen nach der Dialyse zu groß ist, werden die Plasmide mit Ethanol gefällt.

ZELLKULTUR

Die Zellen werden in Gewebekulturschalen (Durchmesser 90 mm) unter 6 % CO₂ im Brutschrank bei 37 °C gezogen. Den Zellen wird je Schale 10 ml Medium zugesetzt, das alle 3 bis 4 Tage gewechselt wird. Kurz vor Erreichen der Konfluenz werden die Zellen trypsinisiert und rekultiviert.

Für BW1J-Zellen sind besondere Kulturbedingungen erforderlich: Modifiziertes Ham F12 - Medium (s. Materialien), Serum sehr guter Qualität, das eine Plattierungseffizienz von 80 - 100 % gewährleistet und Gewebekulturartikel der Firma Falcon.

1. Trypsinbehandlung

Das Kulturmedium wird abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und mit 1 ml 0,1 %igem Trypsin gespült. Die Trypsinlösung wird abgesaugt und die Zellen 5 bis 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um das an den Zellen haftende Trypsin wirken zu lassen. Die abgelösten Zellen werden mit 5 ml Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neugebauer-Zählkammer gezählt.

2. Rekultivierung

Jeweils 5×10^5 (HeLa -, NIH 3 T3 - und Ltk⁻ - Zellen) bis 1×10^6 Zellen (NFB - München, MCF-7, HepG2 -, und BW1J - Zellen) werden pro 9 cm Gewebekulturschale ausgesät, mit dem entsprechenden Medium auf 10 ml aufgefüllt und dann bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen sollten nicht länger als 2 - 3 Monate in Kultur gehalten werden.

3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen von einer 9 cm - Gewebekulturschale werden abtrysiniert, zentrifugiert, in 1 ml Kulturmedium mit 10 % DMSO aufgenommen und 30 min auf Eis stehengelassen. Danach werden sie 24 h bei -80 °C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Aufgetaut werden die Zellen bei 37 °C, danach in 10 ml - Medium aufgenommen, abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

4. Transiente Transfektion und Proteinpräparation (Graham und van der Eb, 1973, Wigler et. al., 1979)

Einen Tag vor der Transfektion werden je nach Zelllinie 1×10^6 (HeLa - und Ltk⁻ - Zellen) bis 3×10^6 (MCF-7-, HepG2 -, BW1J - und NFB-München-Zellen) Zellen/ 9 cm - Schale ausgesät. Zur Vermeidung von Östrogen-Effekten wird bei MCF-7-Zellen 10^{-6} M Tamoxifen zum Medium dazugegeben. 3 Stunden vor der Transfektion wird das Medium gewechselt. 10 µg DNA werden mit 0,125 M CaCl₂ (25 µl 2,5 M CaCl₂ in 500 µl) in HSB (8 g/l NaCl, 0,37 g/l KCl, 0,125 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,1 g/l Dextrose und 5 g/l HEPES pH 7,05) in einem Volumen von 500 µl für 30 min gefällt.

Das Präzipitat wird zu dem Medium gegeben und 4 Stunden auf den Zellen (in 9 cm-Schalen mit 10 ml Kulturmedium) gelassen. Danach wird das Medium abgesaugt, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und 2 min mit 15 % Glycerol in 5 ml PBS geschockt. Danach werden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit frischem Medium inkubiert. 40 Stunden nach dem Entfernen des Präzipitats werden die Zellen 2 x mit eiskaltem TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) gewaschen, abtrypsiniert und in 0,6 ml TBS aufgenommen. Die Zellen werden dann bei 8800 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in 150 ul 0,25 M Tris - pH 7,8 - resuspendiert und die Zellen durch dreimaliges Frieren und Tauen (Trockeneis/Methanol - Bad und 37 °C) aufgebrochen. Die Zelltrümmer werden 10 min mit 8800 x g abzentrifugiert, der Proteingehalt des Überstandes nach der Methode von Lowry (s.u.) bestimmt und die Proteinlösung danach bei -20 °C eingefroren.

ANALYTHISCHE METHODEN

1. Präparation von radioaktiv markierten Proben

1.1 Die Kinasierung von Oligonukleotiden

20 ng gereinigtes Oligonukleotid wird mit 1 - 2 U T4 - Polinukleotid-Kinase und 30 uCi γ -(³²P) - ATP kinasiert. Die Reaktion erfolgt 30 min bei 37 °C in 20 ul 50 mM Tris - HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 M Spermidin und 0,1 mM EDTA. Die radioaktiv markierte DNA wird dann über eine NACS-Prepac-Säule gereinigt. Hierzu wird die Säule mit 1 ml 1 M NaCl in TE hydriert und jeweils 3 x mit 1 ml 1 M NaCl in TE und 1 ml 0,1 M NaCl in TE gewaschen.

Danach werden 100 μ l gelöstes Oligonukleotid auf die Säule gegeben und nach dem Durchlauf 2 x mit 100 μ l 0,1 M NaCl in TE und 5 x mit 1 ml 0,1 M NaCl in TE gewaschen. Schließlich wird das Oligonukleotid mit 3 x 100 μ l 1 M NaCl in TE eluiert und mit 0,3 M NaAc, 50 μ g E.coli t - RNA und 700 μ l Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wird das gefällte Oligonukleotid 15 min bei 8800 x g abzentrifugiert, getrocknet, in 100 μ l H_2O gelöst und die eingebaute Radioaktivität gemessen.

1.2 Die Nick-Translationsreaktion (Rigby et. al., 1977)

In dieser Reaktion wird die 5' \rightarrow 3' Exonuklease- und 5' \rightarrow 3' Polymerase - Aktivität der DNA-Polymerase I von E.-coli ausgenutzt, um DNA-Fragmente radioaktiv zu markieren. Durch DNA-se I werden in doppelsträngiger DNA Einzelstrangbrüche ("nicks") gesetzt, die durch die 5' \rightarrow 3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I erweitert, aber gleichzeitig durch ihre 5' \rightarrow 3' - Polymerase-Aktivität wieder aufgefüllt werden. Während der Reparatursynthese werden die angebotenen α -(^{32}P) desoxy-Nukleotide in die DNA eingebaut. Mit dieser Reaktion erhält man spezifische Aktivitäten von $1 - 2 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA. In einem Reaktionsvolumen werden 200 - 500 ng DNA, Nukleotide und Puffer (10 μ l), α -(^{32}P) dCTP (6 μ l = 60 uCi) und Enzyme (DNA-se I, E.-coli - Polymerase I, 5 μ l) 3 h bei 15°C inkubiert.

Während dieser Zeit wird eine sog. "spin-solumn" hergestellt. Hierzu werden Eppendorf-Reaktionsgefäße folgendermaßen vorbereitet:

Mit einer Nadel wird in den Boden ein Loch gestoßen, das anschließend mit Quarzsand bedeckt wird. Danach wird das Röhrchen silikonisiert und autoklaviert.

Ein so vorbereitetes Eppendorf-Röhrchen wird auf ein 10 ml-Plastikröhrchen gesteckt und mit Sephadex G50 (in TE) gefüllt. Zur Beschleunigung des Vorganges wird das Ganze

2 min bei 1500 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wird ein- bis zweimal wiederholt, bis das Eppendorf-Gefäß ca. 1 ml Säulenvolumen beinhaltet. Dann werden 200 ul Kalbsthymus-DNA (1 mg/ml) auf die Säule gegeben und die Säule anschließend mit TE gewaschen. Die fertige Säule wird dann auf ein Eppendorf-Gefäß gesteckt und diese beiden wiederum auf ein 10 ml - Plastikröhrchen. Dann wird die Reaktionslösung in einem Volumen von 100 ul aufgetragen und 2 min bei 1500 x g zentrifugiert. Hierbei laufen die Nukleinsäuren durch die Säule, während die freien Nukleotide in der Säule verbleiben.

2. DNA - Sequenzierung

2.1 Sequenzierung einzelsträngiger DNA nach Sanger (1978)

7,5 ul der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA werden mit 5 ul primer-Mix (50 mM Tris - HCl pH 8,5, 25 mM MgCl₂, 12 ng M13 - Sequenzierprimer (15-mer) 1 h bei 60 °C inkubiert. Je 2 ul dieses Ansatzes werden für jede der vier Sequenzierreaktionen (G, A, C, T) eingesetzt, die in Mikro-Titerplatten durchgeführt werden. Zu den 2 ul des Ansatzes werden je 2 ul einer für die jeweilige Sequenzierreaktion spezifischen dNTP/ddNTP-Reaktionslösung (s.u.) zugegeben. Diese Reaktionslösung wird für fünf zu sequenzierende DNA's berechnet und besteht aus 5 ul NTP⁰-Lösung, 5 ul ddNTP-Lösung, 5 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und 8 uCi α -(³⁵S) dATP (600 Ci - mmol).

Das Reaktionsgemisch wird 20 min bei 30 °C inkubiert, mit 2 ul Chase-Lösung (0,25 mM dNTPs) versetzt und weitere 20 min bei 30 °C inkubiert. Mit diesem Schritt werden vorzeitige Kettenabbrüche verhindert, die aufgrund von zu niedrigen Nukleotidkonzentrationen auftreten können.

Mit 4 ul Sanger-Probenpuffer wird die Reaktion beendet. Die Proben werden - wie beschrieben - auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die einzelnen NTP^o - Lösungen sind:

G^o : 12,5 uM dGTP + 250 uM dCTP + 250 uM dTTP

A^o : 250 uM dGTP 250 uM dCTP + 250 uM TTP

C^o : 250 uM dGTP 12,5 uM dCTP + 250 uM TTP

T^o : 250 uM dGTP 250 uM dCTP + 12,5 uM TTP.

Die Lösungen werden jeweils aus 1 mM dNTP-Stocklösungen hergestellt.

Die ddNTP-Lösungen waren:

ddGTP 0,32 mM ddATP 0,02 mM

ddCTP 0,16 mM ddTTP 0,5 mM

2.2 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA (Chen und Seeburg 1985)

20 ug gereinigte Plasmid-DNA wird in 100 ul TE mit 100 ug/ml RNA-se (10 mg) ml in 10 mM Tris - HCl pH 7,5, 15 mM NaCl) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem RNA-se - Verdau wird das Volumen mit TE auf 400 ul erhöht, die DNA über eine

Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit 2 Volumen Ethanol ausgefällt. Die gefällte DNA wird 10 min bei 8800 x g zentrifugiert, mit 80%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Sediment wird in 20 ul TE aufgenommen und die Konzentration der DNA bestimmt.

2 ug DNA werden eingetrocknet und einer alkalischen Denaturierung unterworfen. Dazu wird die DNA in 40 ul Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen.

Zur Neutralisierung werden 4 ul einer 2 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 4,5) zugegeben und die DNA mit 2 Volumen Ethanol über Nacht gefällt. Nach zehnmütlicher Zentrifugation bei 8800 x g wird die denaturierte Plasmid-DNA mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

Die so vorbehandelte DNA wird mit 5 ul primer (0,5 pmol/ul), 1,5 ul 10 x Annealing-Puffer (70 mM Tris - HCl pH 7,5, 70 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 100 mM DTT, 1 mM EDTA) und 2 ul (³⁵S) dATP (8 u Ci/ul, 660 Ci/mmol) und 6,5 ul H₂O versetzt. Während der Hybridisierung (15 min bei 37 °C) werden vier Eppendorf-Röhrchen mit den jeder Sequenzierreaktion entsprechenden dNTP/ddNTP-Lösungen vorbereitet.

Zum Hybridisierungsansatz werden 2 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) gegeben und je 3 ul dieses Gemisches auf die vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen verteilt.

Die Reaktion wird über 30 min bei 30 °C durchgeführt. Nach Zugabe von 1,5 ul Chase-Lösung (0,125 mM dNTPs) werden die Proben weitere 15 min bei 30 °C inkubiert.

Schließlich werden die Proben unter Vakuum getrocknet und in 4 ul Sanger-Probenpuffer aufgenommen. Es wird je 1 ul auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Die einzelnen dNTP/ddNTP-Lösungen hatten folgende Nukleotidkonzentration: (in 1 x Annealing-Puffer

A - Mix	100 uM dTTP	C - Mix	100 uM dTTP
	100 uM dCTP		10 uM dCTP
	100 uM dGTP		100 uM dGTP
	100 uM ddATP		100 uM ddCTP
G - Mix	100 uM dTTP	T - Mix	5 uM dTTP
	100 uM dCTP		100 uM dCTP
	5 uM dGTP		100 uM dGTP
	120 uM ddGTP		500 uM ddTTP

3. Isolierung von Blut- und Leberzellkernen

Alle Manipulationen sind bei 0 °C und rasch auszuführen! Ein Frosch wird in 250 ml MS-200 narkotisiert, die Bauchhaut geöffnet, das Herz freigelegt und das Perikard entfernt. Mit einer Blutkapillare, die etwas 3,2 % Natriumcitrat enthält, um die Blutgerinnung zu verhindern, wird das Blut aus dem Herz abgesaugt und in ein Corex-Röhrchen mit 15 ml 3,2 % Natriumcitrat überführt. Die Blutzellen werden 5 min mit 750 x g abzentrifugiert, in 15 ml RSB/Sacharose + 0,5 % NP40 (Detergenz) resuspendiert und in einem Potter homogenisiert. Das Homogenat wird in ein Corex-Röhrchen gegeben, der Potter mit 5 ml RSB/Sacharose gespült, die dem Homogenat zugegeben werden. Die Zellkerne werden 10 min bei 750 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellkerne mit RSB/Sacharose gewaschen und das restliche NP40 zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation bei 10 min 750 x g werden die Kerne in 2 ml RSB/Sacharose resuspendiert und mit Hilfe eines Spektralphotometers die DNA-Konzentration bestimmt.

Zur Gewinnung von Leberzellkernen wird die Leber ohne Gallenblase entfernt und in mehreren Petrischalen, die 3,2 % Natriumcitratlösung enthalten, mit Hilfe einer 5 ml Spritze mit 3,2 % Natriumcitrat perfundiert, um das Blut in der Leber zu entfernen. Danach wird die Leber in kleine

Stücke geschnitten und mit einem Potter in 15 ml RSB/Sacharose homogenisiert. Das Homogenisat wird durch zwei Schichten Gaze filtriert, um das Bindegewebe zu entfernen, und das Filtrat 5 min bei 750 x g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml RSB/Sacharose + 0,5 % NP40 aufgenommen und - wie für Blutzellen beschrieben - weiterbehandelt.

4. DNA-se I - Behandlung von Zellkernen

150 - 300 ug Nukleinsäuren einer Zellkernpräparation werden in 300 ul RSB/Saccharose mit unterschiedlichen DNA-se I - Konzentrationen (0,75 - 4,5 ug/ml) 10 min bei 25 °C (Xenopus-Zellen) oder 37 °C (Säugerzellen) behandelt. Danach wird die Reaktion mit 2,7 ml 2 x SET (1 x SET: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris - HCl pH 8,0) abgebrochen und das Gemisch mindestens 30 min unter Schütteln mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Zur Phasentrennung wird 10 min mit 1500 x g zentrifugiert und die Nukleinsäuren der wäßrigen Phase mit 2 1/2 Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Nukleinsäuren werden mit 8800 x g abzentrifugiert und in 1 ml TE gelöst.

Auf einem Agarose-Gel werden jeweils 1 ug DNA eines Ansatzes auf den DNA-se I - Abbau getestet. Danach wird die Nukleinsäurelösung auf 2 x SET eingestellt (110 ul 20 x SET), 50 ug/ml RNA-se A zugegeben und das Ganze 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Einstellen auf 0,5 % SDS wird der RNA-se - Verdau abgebrochen und durch Zugabe von Protein K (0,1 mg/ml, 1 h bei 37 °C) die restlichen Proteine und RNA-se A zerstört. Nach einer anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion wird die DNA mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 ul 10 mM Tris aufgenommen. Zur Bestimmung DNA-se I hypersensitiver Bereiche werden 10 ug der Kern-DNA mit einem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

5. Isolierung DNA-se I unbehandelter Zellkern-DNA

Um den Abbau von Kern-DNA durch endogene DNA-sen zu verhindern, wird das betreffende Gewebe in 2 x SET homogenisiert. Das in 2 x SET enthaltene EDTA (10 mM) komplexiert zweiwertige Ionen und hemmt so die endogenen DNA-sen. Zur Zell- und Kernanalyse wird das Homogenat auf 2 % SDS eingestellt und die Nukleinsäure mit Phenol/Chloroform extrahiert. Durch RNA-se A und Proteinase K werden - wie oben beschrieben - die RNA und die verbliebenen Proteine entfernt.

6. Southern-Transfer von DNA (Southern 1975)

Restriktionsverdaute DNA wird auf einem Agarosegel bei einer Spannung von 40 V über Nacht aufgetrennt. Das Gel wird markiert, gefärbt und photographiert.

Das Gel wird dann 5 - 10 min mit 0,25 M HCl behandelt und kurz gewässert. Die DNA im Gel wird anschließend bei Raumtemperatur in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl unter Schütteln denaturiert, kurz gewässert und 30 min in 1 M Tris - HCl pH 5,0, 1,5 M NaCl neutralisiert. Für den Transfer der DNA auf einen Nitrozellulosefilter wird eine modifizierte Apparatur nach Maniatis et. al. (1982) verwendet.

In eine Plastikwanne mit 20 x SSC (3M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat pH 6,5) werden zwei übereinandergestapelte Ständer für Gilson-Pipettenständer gesetzt. Darüber wird eine Glasplatte gelegt, die mit zwei befeuchteten Whatman 3 mm Papierstücken (16 x 30 cm) bedeckt wird, deren Enden in die 20 x SSC-Lösung reichen. Darauf wird das vorbehandelte Gel gelegt und der frei bleibende Raum um das Gel herum mit Parafilm abgedeckt. Ein mit 20 x SSC benetztes Nitrozellulosefilter wird auf das Gel gelegt und darüber eine weitere Lage feuchtes Whatman 3 MM - Papier und eine Packung Papierhandtücher geschichtet.

Das Ganze wird schließlich mit einem schweren Gegenstand bedeckt.

Der Transfer erfolgt über Nacht. Danach wird das Filter in 10 x SSC gewaschen und 2 h bei 80 °C getrocknet.

Wird anstatt der Nitrozellulose eine Nylonmembran verwendet, so kann der Transfer unter alkalischen Bedingungen erfolgen. Hierzu wird das Gel mit 0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl denaturiert. Der Transfer erfolgt dann mit der oben beschriebenen Apparatur, wobei 0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl als Transferflüssigkeit verwendet werden. Die Nylonmembranen werden nach dem Transfer mit 0,5 M Tris - HCl pH 7, 1 M NaCl neutralisiert und bei Raumtemperatur 1 h getrocknet.

Zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen wird das Nitrozellulosefilter bzw. die Nylonmembran vorhybridisiert. Dazu wird das Filter je nach Größe mit 5 - 20 ml einer Mischung aus 88,5 Vol % Hybridisierungslösung und 11,5 Vol % denaturierter Kalbsthymus-DNA (1 mg/ml) 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert.

Die Hybridisierungslösung (177 ml) besteht aus: 40 ml 20 x SET (3M NaCl, 1 M Tris - HCl pH 8,0, 0,1 M EDTA), 100 ml umkristallisiertem Formamid p.a., 10 ml 100 x Denhardt-Lösung (2 % Ficoll, 2 % Polyvenylpyrrolidon, 2 % BSA), 2 ml 20 % SDS, 20 ml Hefe-RNA (2,5 mg/ml in 0,1 % SDS) und 5 ml % % Natriumpyrophosphat (0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,3, 1,5 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$).

Die eigentliche Hybridisierung erfolgt mit denaturierter "nick"-translatierter DNA ($1 - 1,5 \cdot 10^7$ cpm, denaturiert mit 30 ul 10 NaOH (1 min), neutralisiert mit 35 ul 10 M Essigsäure für ein Volumen von 5 ml), 88,5 Vol % Hybridisierungslösung und 11,5 % Kalbsthymus-DNA (5 mg/ml), 48 h bei 37 °C.

Unspezifisch gebundene DNA wird durch zweimaliges Waschen mit 2 x SSC, 0,1 % SDS, 10 ug ml Kalbsthymus-DNA (30 min, 65 °C), dreimaliges Waschen mit 2 x SSC, 0,1 % SDS (45 min, 37 °C) und einmaliges Waschen mit 0,1 x SSC, 0,2 % SDS (30 min, 65 °C) entfernt. Das Filter wird dann naß in Plastikfolie eingeschweißt und autoradiographiert.

7. Proteinbestimmung nach Lowry (1951)

10 μ l der zu testenden Proteinlösung werden mit 990 μ l Lösung I (2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH) gemischt und mit 2 ml Lösung IV (1 ml 2 % Kaliumtartrat (= Lösung II), 1 ml Kupfersulfat (= Lösung III) und 100 ml Lösung I) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann werden 0,1 ml frisch angesetzte 50%ige Folin-Lösung (in H_2O) zugegeben und die Reaktionslösung 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 600 nm bestimmt.

Aus parallel angesetzten Standard-Proben mit 10, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 μ g BSA wird eine Eichkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentration der Proben abgeleitet wird.

8. Bestimmung der CAT-Aktivität (CAT-Assay, Gorman et. al., 1982)

Für den CAT-assay werden 1,25 μ l ^{14}C -Chloramphenicol eingetrocknet und in einer bestimmten Proteinmenge (meist 100 μ g) aufgenommen. Mit 0,25 M Tris - HCl pH 3,8 wird das Volumen auf 180 μ l gebracht. Nach 5 min Vorinkubation bei 37 °C werden 20 μ l 4 mM Acetyl-Coenzym A (in 0,25 M Tris pH 7,8) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Chloramphenicol mit 1 ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert. Das Ethylacetat wird in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, das Chloramphenicol in 20 μ l Ethylacetat gelöst und punktweise auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Als Laufmittel dient ein Chloroform/Methanol-Gemisch (9:1). Nach der Chromatographie wird die Platte an der Luft getrocknet und autoradiographiert.

Zur Bestimmung der umgesetzten (d.h. acetylierten) Mengen Chloramphenicol werden die nicht-acetylierte und die acetylierten Formen aus der DC-Platte herausgeschnitten,

mit 5 ml Quickszint versetzt und im Szintillationszähler 2 mal 2 min gezählt. Der Umsatz wird in % nach folgender Formel angegeben:

$$\text{Umsatz} = \frac{\text{Acetyliertes Chloramphenicol}}{(\text{Acetyliertes Chloramphenicol} + \text{nicht umgesetztes Chloramphenicol})} \times 100 \%$$

9. Band shift Analyse (Fried und Crothers, 1981, Barberis et. al., 1987)

Mit dieser Methode kann festgestellt werden, ob ein Restriktions-Fragment oder Oligonukleotid ein Zellkernprotein sequenzspezifisch bindet (Fried und Crothers, 1981).

Hierzu werden in mehreren Eppendorf-Röhrchen 10^4 cpm eines mit γ -(^{32}P) ATP markierten Oligonukleotids ($\hat{=}$ 50 pg bei 15 Bp Länge), die in 5 ul GRBB-Puffer (10 mM Hepes, pH 7,9, 60 mM KCl, 4 % Ficoll, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) pipettiert und steigende Mengen Poly IC zugegeben und mit GRBB auf 20 ul aufgefüllt. Hierzu wird 1 ul Kernextrakt (5 ug Protein/ul) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dieses Gemisch wird auf ein 4%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, und die DNA-Proteinkomplexe werden 2 h bei 4 °C und 150 V aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer dient 0,25 x TBE.

Nach der Elektrophorese wird das Gel 10 min in 10%iger Essigsäure fixiert, mit einem Whatman 3 MM Papier abgezogen und auf dem Papier mit Hilfe einer Gelrocknungsapparatur getrocknet. Das getrocknete Gel wird dann anschließend autoradiographiert.

ERGEBNISSE

1. Untersuchung des Albumin 68 Kd-Gens und Vitellogenin A2-Gens auf DNA-se I hypersensitive Bereiche

DNA-se I hypersensitive Bereiche sind meistens mit genregulatorischen Sequenzen korreliert. Durch die Lokalisierung DNA-se I hypersensitiver Bereiche kann man daher Regionen kartieren, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit regulatorische Sequenzen enthalten.

Da die Albumin- und Vitellogenin-Gene nur in der Leber aktiv sind, sollten DNA-se I hypersensitive Bereiche, die mit der Genexpression korrelieren, nur in den Zellkernen der Leber auftreten. Die Sequenzen, die die leberspezifische Regulation vermitteln, sollten dann in der Nähe dieser hypersensitiven Bereiche liegen.

Die Leberzellkerne von östrogenbehandelten Tieren wurden untersucht, um festzustellen, ob sich die Repression der Albumin-Gene bzw. die Induktion der Vitellogenin-Gene durch Östrogen auf die Ausprägung von DNA-se I hypersensitiven Bereichen auswirkt. Die Zellkerne von Blutzellen, in denen die Albumin- und Vitellogenin-Gene nicht aktiv sind, dienten als Kontrolle, um leberspezifische bzw. hormoninduzierte DNA-se I hypersensitive Bereiche von eventuell auftretenden unspezifischen, hypersensitiven Bereichen unterscheiden zu können.

Da DNA-se I hypersensitive Bereiche und Regulationssequenzen hauptsächlich in 5' flankierenden Bereichen von Genen vorkommen, habe ich mich bei der Analyse des Albumin 68 Kd- und Vitellogenin A2 - Gens auf diesen Bereich beschränkt.

Für die Kartierung von DNA-se I hypersensitiven Bereichen in den 5' flankierenden Bereichen des Albumin 68 Kd- und Vitellogenin A2 - Gens wurden intakte isolierte Zellkerne von Leber und Blut mit DNA-se I behandelt und die Zellkern-DNA extrahiert.

Die Position der DNA-se I hypersensitiven Bereiche wurde nach der Methode von Wu (1980) bestimmt. Hierzu wird die Zellkern-DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das so gewählt wird, daß ein vermuteter DNA-se I hypersensitiver Bereich in der Mitte eines mindestens 2 - 3 Kb großen Restriktionsfragments zu liegen kommt. Die geschnittene DNA wird elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt auf ein Nitrozellulosefilter transferiert und gegen eine radioaktiv markierte Probe hybridisiert, die einem kurzen Stück des 5' oder 3' - Endes des untersuchten Restriktionsfragments entspricht.

Enthält das Restriktionsfragment einen DNA-se I hypersensitiven Bereich, so wird es in zwei Subfragmente gespalten. Da die radioaktive Probe nur DNA von einem Ende des Fragments enthält, hybridisiert es nur gegen eine Subbande. Aus der Größe dieser Subbande kann der Abstand des DNA-se I hypersensitiven Bereichs vom entsprechenden Ende des Restriktionsfragments bestimmt werden.

1.1 Das Albumin 68 Kd Gen enthält einen leberspezifischen DNA-se I hypersensitiven Bereich in der Nähe des Transkriptionsstarts.

Für die Kartierung von DNA-se I hypersensitiven Bereichen ist es notwendig, Restriktionsschnittstellen im betreffenden Gen zu kennen. Da von den genomischen Lambda-Phagenklonen nur wenige Restriktionsschnittstellen bekannt waren, wurden die Schnittstellen von 9 weiteren Restriktionsenzymen kartiert. Die Kartierung von Restriktionsschnittstellen in Lambda-Phagenklonen ist ungenau, da zum Teil sehr große Fragmente entstehen, deren Größe wegen ihrer schlechten Auftrennung auf den Gelen nicht genau bestimmt werden kann. Auch besteht die Gefahr, daß einige Schnittstellen übersehen werden, weil auf einem analytischen Gel maximal 1 µg DNA-Phagen-DNA aufgetragen werden kann und kleine Fragmente von z.B. 500 Bp,

die 1 % des Phagengenoms entsprechen, wegen ihrer geringen DNA-Menge (10 ng) nicht mehr entdeckt werden können.

Zur Vermeidung dieser Fehler wurde der Klon Lambda X 68 a 202 mit den Restriktionsenzymen Hind III oder Eco RI geschnitten und Restriktionsfragmente, die die 5' Hälfte des Albumin 68 Kd - Gens und 5' flankierende Sequenzen enthielten, in die Vektoren p SP 64 und p SP 65 inseriert. Die Konstrukte wurden in *E. coli* transfiziert und vermehrt. An den subklonierten Albumin 68 Kd-Sequenzen wurde dann die Kartierung vorgenommen.

Im 5' flankierenden Bereich und der 5' Hälfte des Albumin 68 Kd-Gens (von -4,3 Kb bis + 7,2 Kb) wurden die Schnittstellen folgender Restriktionsenzyme kartiert: Ava I, Bst E II, Eco RV, Hpa I, Pst I, PVU I, PVU II, Sca I und Xba I (s. Abb. 2). Für drei Schnittstellen (Eco RV^X, PVU^X, Xho I^X, s. Abb. 2) konnten in mehreren Tieren Allele des Albumin 68 Kd-Gens nachgewiesen werden, in denen diese Schnittstellen fehlen. Schnittstellen, die nicht in allen Allelen vorkommen, werden als polymorph bezeichnet.

Für den Nachweis von DNA-se I hypersensitiven Bereichen im Albumin 68 Kd - Gen wurde die DNA von DNA-se I behandelten Leber- und Blutzellkernen mit Kpn I verdaut. Durch diesen Verdau erhält man ein 22 Kb-Fragment, das das gesamte Albumin 68 Kd - Gen sowie 3,5 Kb flankierende Sequenzen umfaßt, (s. Abb. 3a). Die verdaute DNA wurde dann gegen die radioaktive Kpn I/Xho I - Probe (Probe a) hybridisiert, die das 5' Ende des getesteten Fragments umfaßt (s. Abb. 3a). Abbildung 3b zeigt, daß bei Leberkernen unbehandelter Tiere bei steigender DNA-se I - Konzentration eine spezifische Bande von 3,4 Kb Länge erscheint (Bahn 5 und 6). Aus der Größe dieser Subbande (3,4 Kb) läßt sich errechnen, daß der DNA-se I hypersensitive Bereich nahe beim Transkriptionsstart liegt (+ 100 Bp). Weitere Subbanden, wie z.B. bei 2,0 Kb, sind auf sogenannte "Kreuzhybridisierungen" zurückzuführen. Zu diesen Kreuzhybridisierungen kommt es, wenn

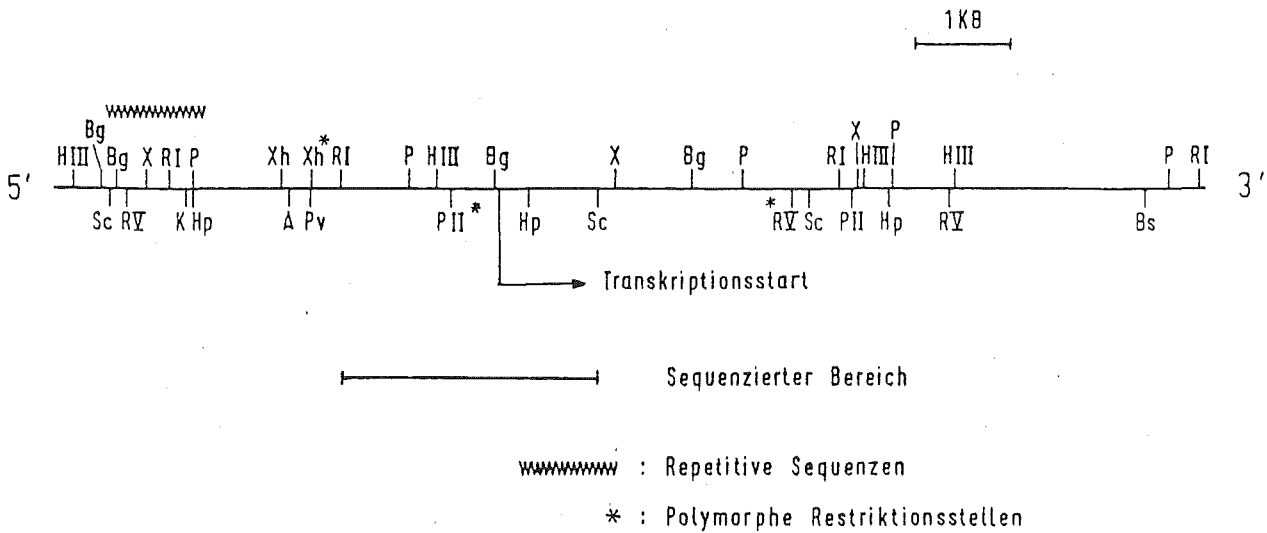
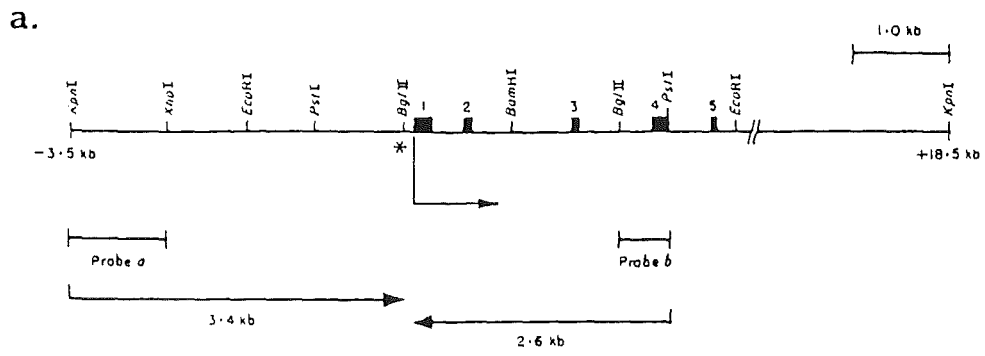
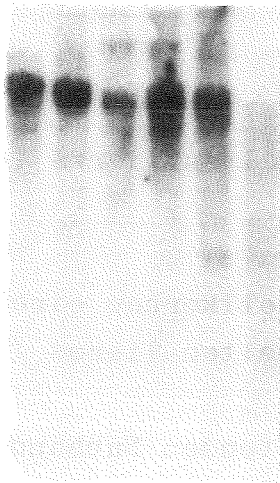


Abb. 2: Kartierung von Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme im 5' flankierenden Bereich und in der 5' Hälfte des Albumin 68 Kd - Gens (Bereich von -4,3 Kb bis +7,2 Kb).
Für die einzelnen Restriktionsenzyme wurden folgende Abkürzungen verwendet: A = Ava I, Bg = Bgl II, Bs = Bst E II, H III = Hind III, Hp = Hpa I, K = Kpn I, P = Pst I, Pv = Pvu I, P II = Pvu II, RI = Eco RI, RV = Eco RV, Sc = Sca I, X = Xba I, Xh = Xho I.
Der sequenzierte Bereich erstreckt sich von -1606 bis +1056 (Schorpp et. al., 1988a).

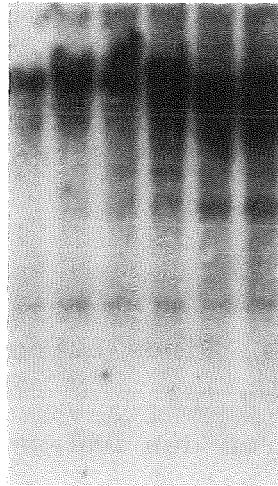


b. 1 2 3 4 5 6



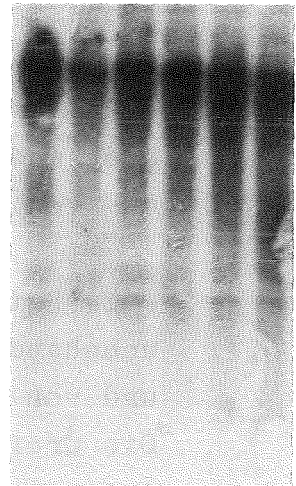
3,4 Kb

c. 1 2 3 4 5 6

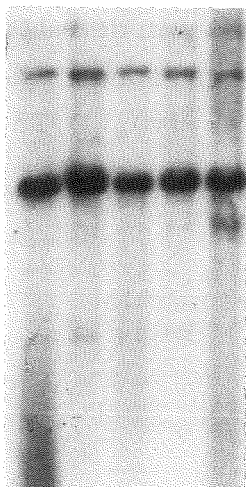


3,4 Kb

d. 1 2 3 4 5 6

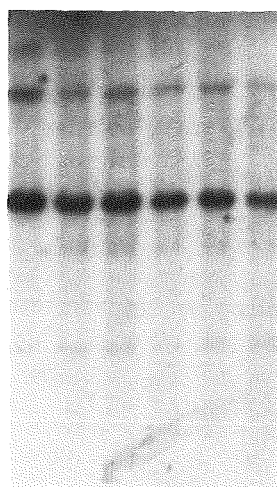


e. 1 2 3 4 5



2,6 Kb

f. 1 2 3 4 5 6



2,6 Kb

g. 1 2 3 4 5 6

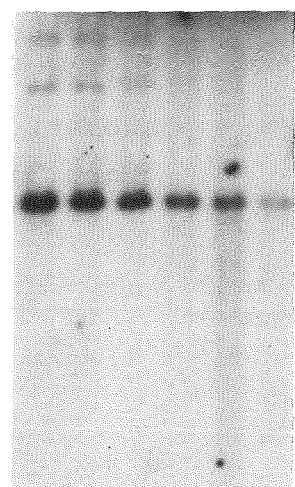


Abb. 3: Lokalisierung eines leberspezifischen DNA-se I hypersensitiven Bereichs im Albumin 68 Kd - Gen.

- a) Darstellung der verwendeten Restriktionsfragmente und Proben. Das 1 Kb Kpn I - Xho I - Fragment (Probe a) wurde als 5' endmarkierende Probe für das 22 Kb Kpn I - Fragment verwendet und das 0,5 Kb Bgl II/Pst I - Fragment als 3' endmarkierende Probe des Pst I - Fragments. Die Größe der durch DNA-se I entstandenen Subfragmente ist durch die Pfeile unten angegeben. Der DNA-se I hypersensitive Bereich ist durch einen Stern gekennzeichnet. Der gewinkelte Pfeil gibt die Position des Transkriptionsstarts an.
- b) - d) Kpn I verdaute Kern-DNA von Leberzellkernen eines unbehandelten (b), eines östrogenbehandelten Tieres (c) und von Blutzellen (d).
- e) - g) Pst I verdaute Kern-DNA von Leberzellkernen eines unbehandelten (e), eines östrogenbehandelten Tieres (f) und von Blutzellen (g).
Die Größe der durch den DNA-se I auftretenden Subbanden ist angegeben.
In der Bahn 1 ist Zellkern-DNA aufgetragen, bei deren Isolierung endogene DNA-sen durch 2 x SET gehemmt wurden. Diese Zellkerne wurden nicht DNA-se I behandelt. Die in den Bahnen 2 - 6 aufgetragene Zellkern-DNA wurden 10 min bei 25 °C mit folgenden DNA-se I - Konzentrationen inkubiert: 0 (Bahn 2, nur endogene DNA-sen aktiv), 0,75 (Bahn 3), 1,5 (Bahn 4), 3,0 (Bahn 5) und 4,5 ug/ml.

die radioaktive Proben-DNA repetitive Sequenzen enthalten. Da repetitive Sequenzen im gesamten Genom vorkommen, hybridisieren auch Fragmente, die keine Albumin 68 Kd - Gensequenzen enthalten, gegen diese Probe. Auf den Röntgenfilmen treten daher zusätzliche Banden auf, die nicht von Albumin 68 Kd - Gen stammen.

Die Anwesenheit von repetitiven Sequenzen in den Xenopus Albumin-Genen ist von Ryffel et. al. (1983) nachgewiesen worden. Kreuzhybridisierungen treten auch auf, wenn die Probe Sequenzen enthält, die in verwandten Genen (in diesem Fall das Albumin 74 Kd - Gen) erhalten geblieben sind.

Kreuzhybridisierungen können von den DNA-se I hypersensitiven Bereichen unterschieden werden, da diese Banden schon in Bahn 1 zu erkennen sind, in der Zellkern-DNA aufgetragen ist, die ohne DNA-se I - Behandlung in Gegenwart von 10 mM EDTA isoliert wurde. Da EDTA DNA-sen hemmt, können die Subbanden nicht durch DNA-se I entstanden sein.

Derselbe DNA-se I hypersensitive Bereich wurde auch in der Leberzellkern-DNA von östrogenbehandelten Fröschen gefunden (s. Abb. 3c, Bahnen 3 - 6). In den Bahnen 3 und 4 taucht eine weitere Subbande von ca. 5 Kb auf. Ein entsprechender DNA-se I hypersensitiver Bereich konnte im Kontrollexperiment (s.u.) nicht gefunden werden. Eventuell handelt es sich um einen DNA-se I hypersensitiven Bereich einer kreuzhybridisierenden Sequenz.

Da die durch die Kreuzhybridisierungen auftretenden zusätzlichen Banden eventuell DNA-se I hypersensitive Bereiche verdecken, wurde das Experiment mit Pst I verdauter DNA wiederholt. Durch diesen Verdau erhält man ein 3,6 Kb langes Pst I - Fragment, das 1,0 Kb 5' flankierende Sequenzen und 2,6 Kb der 5' Region des Albumin 68 Kd - Gens enthält. Die Pst I - verdaute DNA wurde dann gegen eine radioaktive Bgl II/Pst I - Probe (Probe b, s. Abb. 3a) hybridisiert, die das 3' Ende des Pst I - Fragments enthält.

Die Abbildungen 3e (Bahn 5) und 3f (Bahnen 3-5) zeigen, daß sowohl in Leberkernen von unbehandelten als auch von östrogenbehandelten Tieren bei steigender DNA-se I - Konzentration eine spezifische Subbande von 2,6 Kb auftritt. Aus dieser Größe läßt sich errechnen, daß der DNA-se I hypersensitive Bereich nahe am Transkriptionsstart liegt. Damit wird das Ergebnis aus dem Kpn I - Verdau bestätigt. Wie im Kpn I - Verdau sind Kreuzhybridisierungen zu erkennen. Sie können von den durch DNA-se I entstandenen Subbanden nach den oben beschriebenen Kriterien unterschieden werden.

Dieser hypersensitive Bereich konnte in Blutzellen nicht gefunden werden (Abb. 3g). Somit ist dieser DNA-se I hypersensitive Bereich leberspezifisch und östrogenunabhängig.

1.2 Das aktive Vitellogenin A2 - Gen enthält zwei leberspezifische DNA-se I hypersensitive Bereiche.

Für die Kartierung von DNA-se I hypersensitive Bereiche im 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2 - Gens wurde DNA von DNA-se I behandelten Leber- und Blutzellkernen mit Eco RI verdaut. Durch diesen Verdau entsteht ein 2,4 Kb langes Fragment, das 1,0 Kb 5' flankierende Sequenzen und 1,4 Kb der 5' Region des Vitellogenin A2 - Gens enthält. Dieses Fragment wurde dann mit einer BST E II/Eco RI - Probe (s. Abb. 4a) getestet, die das 3' Ende des Eco RI - Fragments enthält.

Abb. 4b zeigt, daß in Leberzellkernen von östrogenbehandelten Tieren mit steigender DNA-se I - Konzentration zwei Subbanden von 1,5 bzw. 1,7 Kb Länge auftreten. Die Position der beiden DNA-se I hypersensitiven Bereiche läßt sich somit bei -300 und -100 berechnen.

Bei der Kartierung von DNA-se I hypersensitiven Bereichen muß berücksichtigt werden, daß die Größe von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen nur mit einer Genauigkeit von ± 100 Bp bestimmt werden kann.

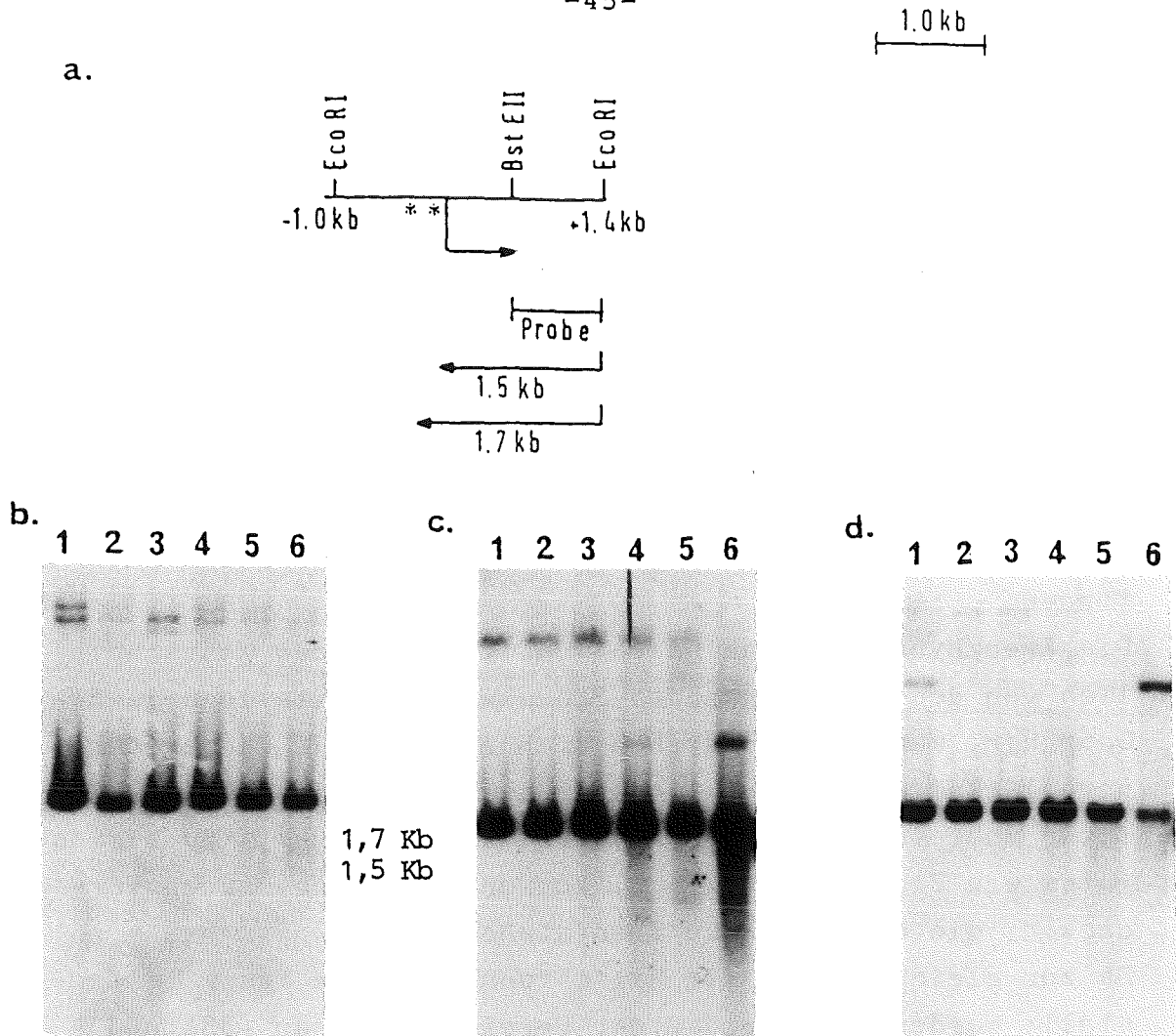


Abb. 4: Lokalisierung von DNA-se I hypersensitiven Bereichen im Vitellogenin A2 - Gen

- a) Darstellung des verwendeten Restriktionsfragments und der Probe. Das 0,86 Kb Bst EII - Fragment wurde als 3' endmarkierende Probe für ein 2,4 Kb Eco RI - Fragment verwendet. Die Größe der durch die DNA-se I entstandenen Subfragmente sind durch die unteren Pfeile angegeben. Die DNA-se I hypersensitiven Bereiche sind durch Sterne angegeben. Der Transkriptionsstart wird durch einen Pfeil angegeben.
- b) - d) Eco RI verdaute Kern-DNA von Leberzellkernen eines östrogenbehandelten (b) und unbehandelten Tieres (c) und von Blutzellen. Die Größe der durch DNA-se I - Behandlung auftretenden Subbanden ist angegeben. In der Bahn 1 ist Zellkern-DNA aufgetragen, die in Anwesenheit von 2 x SET isoliert wurden. Die DNA der Bahnen 2 - 6 wurde, wie in Abb. 3 angegeben, mit DNA behandelt.

Diese beiden hypersensitiven Bereiche sind sehr schwach ausgeprägt, konnten aber in allen drei getesteten Tieren nachgewiesen werden.

In der Leber eines unbehandelten Tieres konnten keine eindeutigen DNA-se I hypersensitiven Bereiche entdeckt werden; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sie durch den Schmier, der durch DNA-se I - Abbau entsteht, verdeckt werden (s. Abb. 4d, Bahn 6).

In den Blutzellen, in denen die Vitellogenine inaktiv sind, sind eindeutig keine hypersensitiven Bereiche zu finden.

Die Kreuzhybridisierungen bei ca. 15 Kb rühren wahrscheinlich von den entsprechenden Sequenzen des Vitellogenin A1-Gens her, zum Teil entstehen auch zusätzliche Banden durch unvollständigen Restriktionsverdau des Vitellogenin A2-Gens (z.B. Abb. 4d, Bahn 6). Da diese Banden größer sind als das getestete Eco RI - Fragment, können sie keine Banden verdecken, die durch DNA-se I entstehen.

Da zur gleichen Zeit mit Hilfe funktioneller Tests festgestellt werden konnte, daß der Bereich zwischen -331 und -87, in dem auch die beiden hypersensitiven Bereiche liegen, sich regulatorische Sequenzen befinden, (Klein-Hitpass et. al., 1986), wurde auf eine Überprüfung der Daten durch eine das 5' Ende markierende Probe verzichtet.

2. Die 5' flankierende Region des Vitellogenin A2 - Gens enthält "curved DNA".

Die DNA einer Zelle liegt zum größten Teil in der sogenannten B-Form vor. Diese B-Form entspricht der von Watson und Crick (1953) beschriebenen Form einer geraden Doppelhelix. Daneben gibt es auch kurze DNA-Bereiche, die von dieser Konformation abweichen, wie z.B. "curved DNA", bei der die Doppelhelix gebogen ist, was eine Veränderung des Wanderungsverhaltens von Restriktionsfragmenten bewirkt, die "curved DNA" enthalten, d. h. diese Fragmente erscheinen größer, als

das nach den Sequenzierungsdaten zu erwarten ist.

Hinweise, daß die 5' flankierende Region des Vitellogenin A2 "curved DNA" enthält, wurden bei der Entdeckung des ERE (estrogen responsive element) des Vitellogenin A2 - Gens erhalten (Klein-Hitpass et. al., 1986). Restriktionsfragmente, die den Bereich von -331 bis -87 enthalten, erschienen bei der Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen 10 - 20 % größer zu sein, als nach den Sequenzierungsdaten zu erwarten war.

Ein abweichendes Wanderungsverhalten, bei dem Restriktionsfragmente zu groß erscheinen, kann auf zwei Arten hervorgerufen werden: Durch "curved DNA" und durch partielle Denaturierung. Bei partieller Denaturierung weichen die einzelnen DNA-Stränge in A-T-reichen Regionen auseinander, während G-C-reiche gepaart bleiben. Zur partiellen Denaturierung kommt es, weil die zwei Wasserstoffbrücken eines A-T-Basenpaares leichter aufzubrechen sind als die drei Wasserstoffbrücken eines G-C-Basenpaares. Die einzelsträngige DNA in den denaturierten Bereichen kann verschiedene Strukturen ausbilden, die die Wanderung von Restriktionsfragmenten verlangsamen können (Hentschel, 1982, Gough und Lilley, 1985). Da der 5' flankierende Bereich des Vitellogenin A2 - Gens zwischen -280 und -160 sehr AT-reich ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß das falsche Wanderungsverhalten der Fragmente, die diesen Bereich enthalten, durch partielle Denaturierung verursacht wird.

Zwischen "curved DNA" und partieller Denaturierung kann leicht unterschieden werden, weil bei niedrigen Temperaturen die DNA-Denaturierung und das durch sie verursachte falsche Wanderungsverhalten abnimmt, während man bei "curved DNA" eine Zunahme des Wanderungsfehlverhaltens bei niedrigen Temperaturen beobachtet hat (Diekmann und Wang, 1985).

Für den Nachweis, daß es sich beim Vitellogenin A2 - Gen tatsächlich um "curved DNA" handelt, wurde das Wanderungsverhalten der Fragmente -331/ -87 und -278/ -87 bei 20 °C und 4 °C getestet. Beide Fragmente sind bei 20 °C ca. 20 %

größer als erwartet. Bei 4 °C nimmt die Abweichung für -331/ -87 auf 38 % und für -278 / -87 auf 35 % zu. Dieses Ergebnis beweist, daß im Vitellogenin A2 - Gen das falsche Wanderungsverhalten durch curved DNA verursacht wird. Zur genauen Kartierung der "curved DNA" wurden 5' und 3' Deletionen vom Bereich zwischen -331 und -87 getestet.

"Curved DNA" kann durch Deletionsmutanten lokalisiert werden, da Restriktionsfragmente, aus denen die "curved DNA" entfernt wurde, wieder ein normales Wanderungsverhalten zeigen.

Die Deletionsmutanten wurden zwischen die Hind III und Bam H I Schnittstelle des Plasmids pBl - CAT 8 + (Klein-Hitpass et. al., 1986) inseriert. PBL - CAT 8 + wurde gewählt, weil mit diesem Plasmid auch der Einfluß der "curved DNA" auf die Genexpression getestet werden kann (siehe folgendes Kapitel).

Für die Kartierung der "curved DNA" wurden die betreffenden Vitellogenin A2 - Sequenzen mit Hind III und Bam H I herausgeschnitten und auf einem 6%igen Polyacrylamidgel getestet.

Wie man aus Abb. 5a ersehen kann, ändert sich das falsche Wanderungsverhalten nicht, wenn die Sequenzen zwischen -331 und -278 entfernt werden. Alle drei getesteten Fragmente (-331/ -87, -317/-87 und -278/-87) erscheinen ca. 20 % zu groß. Dieser Wert verringert sich für den Bereich zwischen -260 und -87 auf 12 %. Dies zeigt an, daß ein Teil der "curved DNA" entfernt worden ist. Folglich muß die 5' Grenze der "curved DNA" zwischen -278 und -260 liegen. Das Fragment zwischen -176 und -87 zeigt noch eine signifikante Abweichung von 4 %, während die Abweichung von 2,7 % des Fragments zwischen -150 und -87 schon im Bereich der Fehlergrenze liegt. Somit liegt die 3' Grenze zwischen -176 und -150.

Da ein Restriktionsfragment ein stärker abweichendes Wanderungsverhalten zeigt, wenn der Bereich der "curved DNA" in der Mitte des Fragments liegt (Wu et.al., 1984), wurden PVU II / Bam H I - Fragmente getestet, die neben den Vitello-

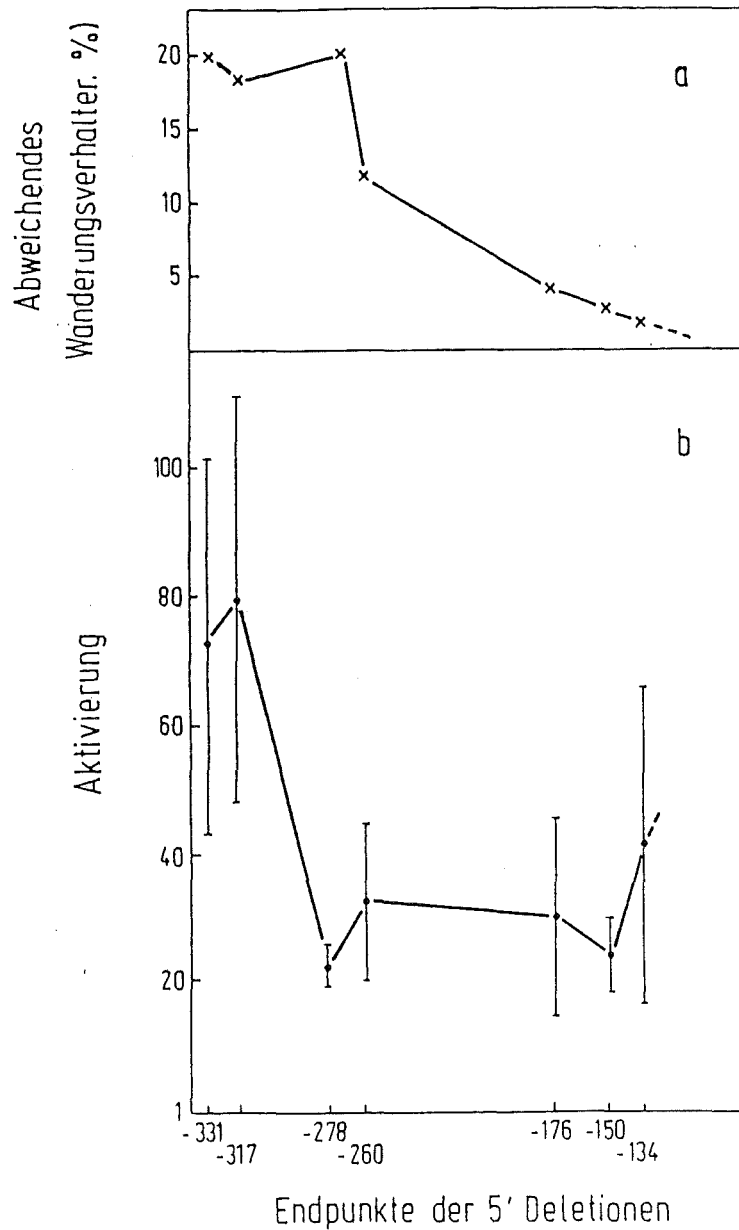


Abb. 5a): Kartierung der "curved DNA" im 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2-Gens durch den Test von verschiedenen 5' Deletionen auf ihr abweichendes Wanderungsverhalten auf Polyacrylamidgelen.

b): Untersuchung der selben 5' Deletionen - wie oben - auf ihre Fähigkeit, die Expression des CAT-Gens zu aktivieren. Das 5' Ende der getesteten Deletionsmutanten ist jeweils auf der X-Achse angegeben, der 3' Endpunkt aller gezeigten Deletionsmutanten ist -87. Die Standardabweichung für jeden Meßpunkt wird durch die vertikalen Balken angegeben. Jede Deletionsmutante wurde in mindestens vier unabhängigen Experimenten getestet.

geninsequenzen zwischen -176 und -87 bzw. -150 und -87 noch weitere benachbarte Vektorsequenzen enthalten. Dadurch kommt die vermutete "curved DNA" zwischen -176 und -150 in der Mitte des Fragments zu liegen. Die 93 Bp Vektorsequenzen selber enthalten keine "curved DNA".

Um den Einfluß der "curved DNA" noch weiter hervorzuheben, wurden die Gele bei 4 °C gefahren, da bei niedrigen Temperaturen das aberrante Wanderungsverhalten zunimmt (s.o.).

Das PVU II / Bam H I - Fragment mit den Sequenzen zwischen -176 und -87 erscheint unter diesen Bedingungen 6,8 % zu groß und zeigt damit eindeutig ein abweichendes Wanderungsverhalten, während das entsprechende Fragment mit den Sequenzen zwischen -150 und -87 nur 3 % zu groß erscheint. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Bereich zwischen -176 und -150 noch "curved DNA" enthält, während 3' von -150 keine "curved DNA" mehr vorhanden ist.

Zur Überprüfung der oben durchgeführten Kartierung wurden drei 3' Deletionen getestet. Die Analyse zeigte, daß die Wanderungsanomalie des Fragments -331/ -191 gegenüber dem Fragment -331/ -87 von 20 % auf 13 % reduziert ist, d.h. es muß noch "curved DNA" 3' von -191 vorhanden sein.

Die Sequenzen zwischen -331 und -254 zeigen eine geringe Wanderungsanomalie (4,3 %), und der Bereich zwischen -331 und -280 enthält keine "curved DNA" mehr.

Dieses Ergebnis bestätigt die obige Kartierung der "curved DNA" zwischen -270 und -160.

Die Sequenzanalyse der 5' flankierenden Region des Vitellogenin A2 - Gens zeigt, daß der Bereich zwischen -270 und -160 kurze 3 - 9 Bp lange A- oder T-Blöcke enthält, die sich alle 10 - 11 Bp wiederholen (Walker et. al., 1984). Da solche Blöcke Voraussetzung für "curved DNA" sind, bestätigen diese Sequenzdaten die oben vorgenommene Kartierung.

Wenn die "curved DNA" im 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2 - Gens eine wichtige Sequenz wäre, so müßte sie in den 5' flankierenden Bereichen der anderen Xenopus-Vitellogenin-Gene (A1, B1, B2) und des Hühnchen-Vitellogenin-Gens erhalten geblieben sein.

Diese Annahme wurde überprüft, indem die 5' flankierenden Regionen des Hühnchen-Vitellogenin-Gens und der übrigen Xenopus-Vitellogenin-Gene auf kurze A- oder T-Blöcke untersucht wurden, die sich alle 10 - 11 Bp wiederholen. Die Analyse zeigte, daß alle diese Gene zwischen -270 und -150 solche A- bzw. T-Blöcke enthalten. Der direkte Test eines Fragments des Hühnchen-Vitellogenin-Gens, das den Bereich zwischen -257 und -73 umfaßte, zeigte, daß dieser Bereich "curved DNA" enthält, da dieses Fragment 14,5 % größer erschien, als zu erwarten war. Somit wäre dann die "curved DNA" in diesem Bereich seit der Aufspaltung der Linien von Xenopus und Huhn erhalten geblieben. Dabei ist bemerkenswert, daß nicht die Sequenz selbst, sondern lediglich die Anwesenheit von A- und T-Blöcken erhalten geblieben ist.

3. Charakterisierung eines zellspezifischen Aktivators im 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2 - Gens durch funktionelle Tests

Klein-Hitpass et. al. (1986) konnten in transient transfizierten MCF-7-Zellen (Brusttumorzelllinie) nachweisen, daß die 5' flankierende Region des Vitellogenin A2-Gens zwischen -260 und -87 einen Aktivator enthält.

Die aktivierende Wirkung von DNA-Sequenzen auf die Genexpression wird mit Hilfe von Fusionsgenen untersucht, die sich aus der 5' flankierenden Region des zu untersuchenden Gens und der proteinkodierenden Sequenz eines Indikator-Gens zusammensetzen. Die Indikator-Gene ist leicht transfizierbar und leicht nachzuweisen. Für die Untersuchung der

5' flankierenden Bereiche des Vitellogenin A2 - Gens wurde das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (= CAT-Gen) verwendet, dessen Aktivität in einem einfachen Enzymtest nachweisbar ist. Als CAT-Expressionsvektor wurde pBl-CAT 8 + (Klein-Hitpass et. al., 1986) verwendet. Dieser Vektor enthält ein CAT-Gen, dem der Thymidinkinase (= tk)-Gen-Promotor vorgeschaltet ist. Für den funktionellen Test wurden die Vitellogenin A2 - Sequenzen vor den tk-Promotor des CAT-Gens gesetzt (s. Abb. 6a, S. 54) und diese Konstrukte in MCF-7-Zellen transfiziert.

Die Aktivierung durch die Vitellogenin-Gensequenzen wurde bestimmt, indem die CAT-Aktivität der Vitellogenininfusionsgene mit der des Vektors pBl - CAT 8 + verglichen wurde.

3.1 Die "curved DNA" ist nicht der Aktivator.

Die Region von -260 bis -87, die den Aktivator enthält, überschneidet sich mit dem Bereich der "curved DNA" (-270 bis -160). Deshalb habe ich untersucht, ob die "curved DNA" mit dem Aktivator identisch ist. Wenn dies der Fall wäre, dann sollte die Deletierung der "curved DNA" mit dem Verlust der Aktivierung einhergehen.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die selben 5' Deletionsmutanten, die für die Kartierung der "curved DNA" verwendet wurden, in pBl - CAT 8 + kloniert (s.o.) und auf ihre Aktivierungsfähigkeit untersucht.

Abb. 5b zeigt, daß die Aktivierung von 70 - 80-fach auf 20 - 40-fach abfällt, wenn die Sequenzen von -317 bis -278 deletiert werden. Dieser Bereich enthält jedoch keine "curved DNA" (s. das vorhergehende Kapitel und Abb. 5a). Die 25 - 40-fache Aktivierung bleibt auch erhalten, wenn die "curved DNA" vollständig entfernt worden ist (s. die 5' Deletionen -150/-87 und -134/-87 in Abb. 5a und 5b). Somit liegen die aktivierenden Sequenzen außerhalb der "curved DNA". Die "curved DNA" selber hat dagegen keinen Einfluß auf die Aktivierung.

Die folgenden Untersuchungen beschränkten sich nun auf den Bereich von -134 bis -87, weil dieser Bereich einen stärkeren Einfluß auf die Genexpression hat (20 - 40-fach) als der Bereich von -317 bis -278, der die Aktivierung lediglich um einen Faktor 2 - 3 (von 20 - 40-fach auf 70 - 80-fach) erhöht. Die aktivierende Sequenz, die innerhalb des Bereiches von -134 und -87 liegt, wird im folgenden Text als Aktivator bezeichnet.

3.2 Der Aktivator liegt zwischen -121 und -87 und besteht aus mehreren Elementen.

Die Ergebnisse des letzten Kapitels zeigen, daß der Aktivator zwischen -134 und -87 liegen muß. Zur genauen Bestimmung seiner Position wurden weitere von -134 ausgehende 5' Deletionen untersucht.

Abb. 7 (schraffierte Säulen) zeigt, daß die Sequenzen zwischen -121 und -87 die stärkste Aktivierung bewirken.

Daraus ist zu schließen, daß dieser Bereich den vollständigen Aktivator enthält. Weitergehenden Deletionen bis Position -97 führen zu einer schrittweisen Reduktion der Aktivierung. Die Sequenzen zwischen -97 und -87 können die CAT-Genexpression nicht mehr aktivieren.

3' Deletionen, die von -121/ -87 ausgingen, führten ebenfalls zu einer schrittweisen Reduktion der Aktivierung. So reduziert sich die Aktivierung für -121/ -97 auf ca. 60-fach und für -121/ -109 auf 7,5-fach (s. Abb. 7).

Zwei Teilbereiche des Aktivators, nämlich -121/-109 und -108/-97 bewirken für sich allein eine 7,5-fache bzw. 3,3-fache Aktivierung. Aus dieser Tatsache habe ich geschlossen, daß der Aktivator aus mehreren Elementen besteht. Die Sequenzen zwischen -121 und -109 bilden das Element 1 (7,5-fache Aktivierung, s.o.) und der Bereich zwischen -108 und -97 das Element 2 (3,3-fache Aktivierung). Beide Elemente

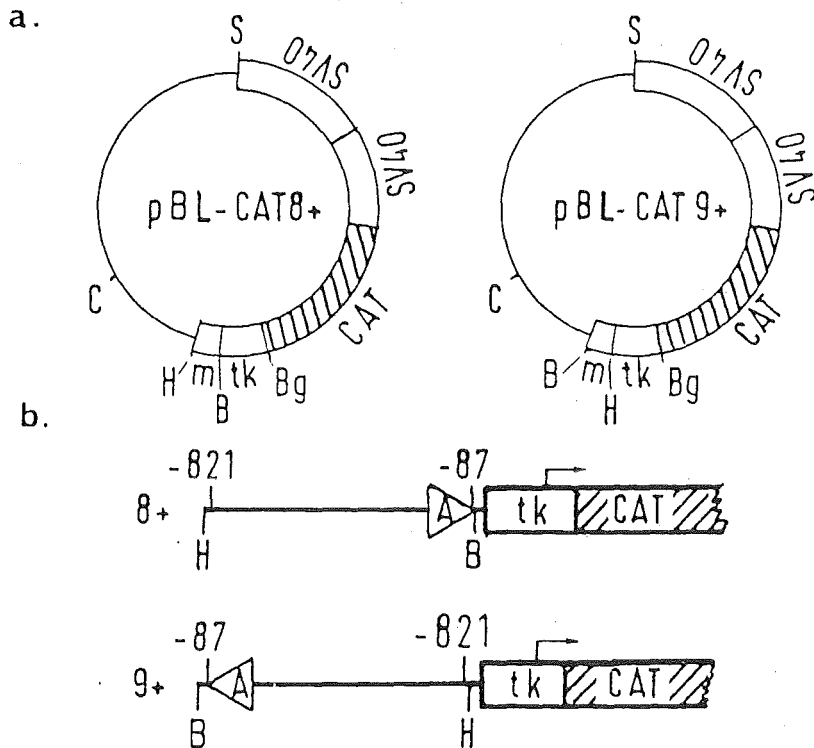


Abb. 6a): Karte der Vektoren pBl-CAT 8 + und pBl-CAT 9+.

Die für die Vermehrung in Bakterien notwendigen Sequenzen sind durch eine einfache Linie gekennzeichnet, m (multiple Cloning site) steht für eine Polylinkerregion, die mehrere Restriktionsstellen enthält, tk = tk - Promotor. Die Region des CAT-Gens ist schraffiert, die SV 40-Sequenzen sind für die Prozessierung der CAT-m-RNA in Eukaryontenzellen notwendig. Restriktionsschnittstellen: H = Hind III, B = Bam HI, Bg = Bgl II, S = Sma I, C = ClaI.

b) Die Position und Orientierung des Aktivators und weiterer 5' flankierender Vitellogenin A2 - Sequenzen im Plasmid pA2 (-821/-87) mit pBl - CAT 8 + als Vektor (5' → 3' Orientierung der Vitellogenin A2 - Sequenzen) und im Plasmid pA2 (-87/-821) mit pBl - CAT 9+ als Vektor (3' → 5' Orientierung der Vitellogenin A2 - Sequenzen). Der Aktivator ist durch das Dreieck gekennzeichnet, weitere Beschriftung wie in a).

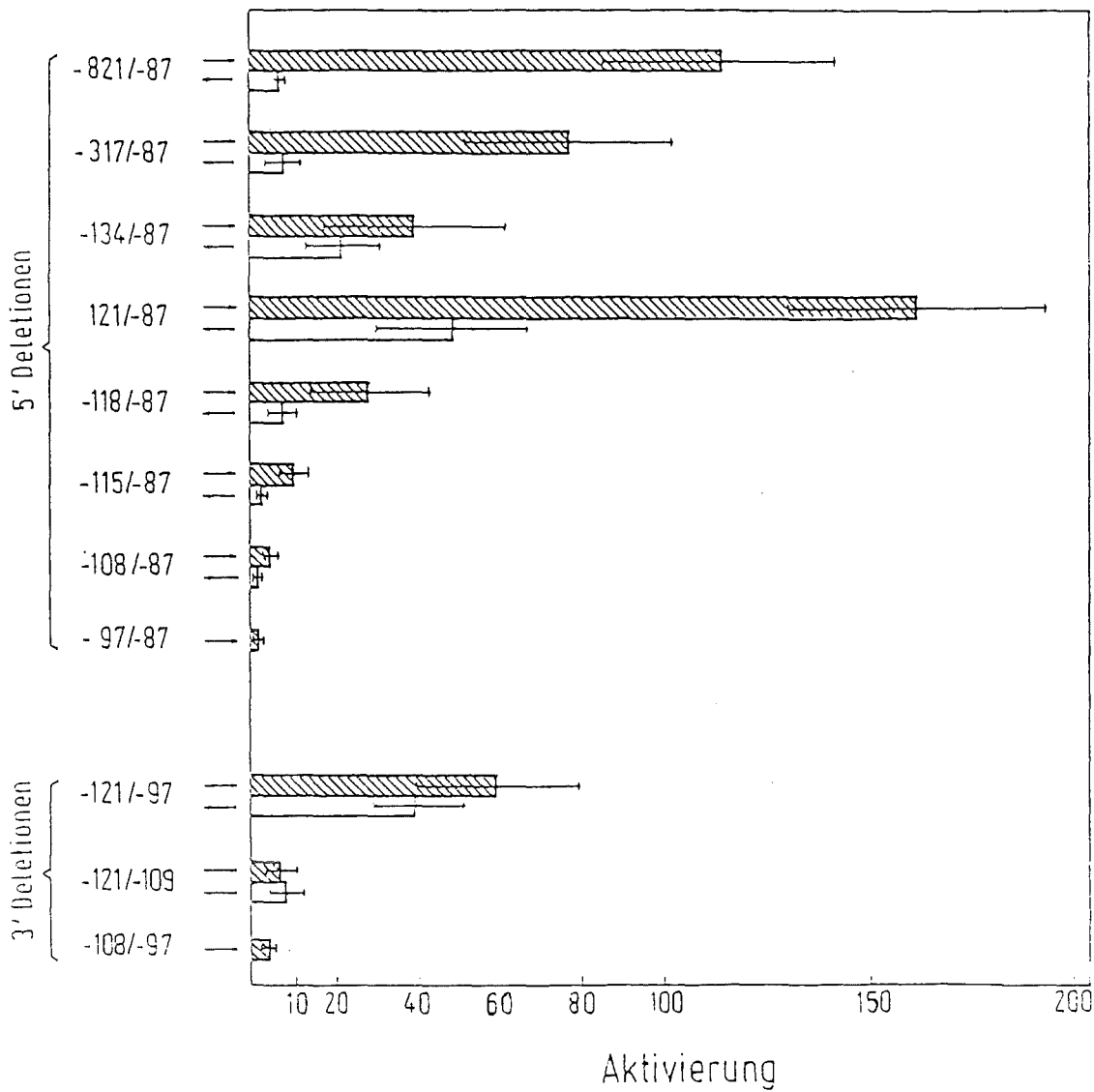


Abb. 7: Die Position und Enhancereigenschaften des Aktivators.

Die schraffierten Säulen geben die Aktivierungsfaktoren der Konstrukte an, die den Aktivator in der ursprünglichen Orientierung enthalten. Die Aktivierungsfaktoren der Plasmide, die den Aktivator in umgekehrter Orientierung enthalten, werden durch die nicht schraffierten Säulen angegeben. Die Zahlen geben jeweils die Endpunkte der getesteten Vitellogenin-Sequenzen an; die Orientierung wird durch die Pfeile angezeigt. Die Aktivierungsfaktoren und die Standardabweichung wurden durch mindestens 4 Transfektionsexperimente mit MCF-7-Zellen bestimmt. Die CAT-Aktivität der Vektoren pBl-CAT 8+ (→ Orientierung) und pBl-CAT 9+ (← Orientierung) diente als Referenzpunkt zur Bestimmung der Aktivierungsfaktoren.

kooperieren miteinander und bewirken zusammen eine ca. 60-fache Aktivierung (= -121/ -97 in Abb. 7).

Obwohl die Sequenzen von -97 bis -87 allein die CAT-Gen-Expression nicht aktivieren können, so steigern sie doch die Aktivität der Elemente 1 + 2 (-121 bis -97) ca. 2,5-fach. Wegen dieses Effekts habe ich diesen Bereich des Aktivators als Element 3 bezeichnet.

Der vierfache Anstieg der Aktivierung durch die Deletion der Sequenzen zwischen -134 und -121 ist wahrscheinlich auf das Entfernen eines negativ wirkenden regulatorischen Elements zurückzuführen, denn dieser Anstieg kann nicht durch statistische Schwankungen erklärt werden (s. Standardabweichungen).

3.3 Der Aktivator besitzt Enhancereigenschaften.

Enhancer sind durch ihre Eigenschaft definiert, sowohl in umgekehrter Orientierung als auch in großer Entfernung wirksam zu sein.

Um festzustellen, ob der Aktivator des Vitellogenin A2 - Gens ein Enhancer ist, wurde er an beiden Eigenschaften getestet. Aus Abb. 7 (unschraffierte Säulen) läßt sich ersehen, daß der Aktivator auch in umgekehrter Orientierung (-87/ -121) funktionstüchtig ist. Die Wirksamkeit ist jedoch um den Faktor 3 reduziert. Da der Bereich zwischen -121 und -97 (Elemente 1 und 2) in beiden Orientierungen praktisch die gleiche Aktivierung zeigt (60-fach für -121/ -97 gegenüber 40-fach für -97/ -121) und damit orientierungsunabhängig ist, ist die Reduktion wahrscheinlich auf die Orientierungsabhängigkeit von Element 3 (-97/ -87) zurückzuführen.

Um die Entfernungsabhängigkeit des Aktivators testen zu können, ist es notwendig, den Abstand von Aktivator und tK-Promotor zu vergrößern.

Dies wurde dadurch erreicht, daß Vitellogenin A2 - Fragmente, die den Aktivator und weitere 5' flankierende Sequenzen enthalten (z.B. -821/ -87), vor dem tK-Promotor umgedreht wurden. Durch diese Inversion erhält man Konstrukte, in denen der umgedrehte Aktivator durch die zusätzlichen Vitellogenin-Sequenzen vom tK-Promotor getrennt wird (s. Abb. 6b).

Diese Inversion wurde durch Umklonierung der Vitellogenin A2 - Fragmente in pB1 - CAT 9 + (Klein-Hitpass et al., 1988) erreicht. Da die Positionen der Hind III- und Bam H I - Schnittstellen in pB1 - CAT 9 + genau umgekehrt wie in pB1 - CAT 8 + angeordnet sind, können die Hind III/ Bam H I - Fragmente, die Vitellogenin A2 - Sequenzen enthalten, nur in umgekehrter Orientierung vor dem tK - Promotor inseriert werden (s. Abb. 6b). Mit Ausnahme der vertauschten Positionen der Restriktionsschnittstellen sind pB1 - CAT 8 + und pB1 - CAT 9 + völlig identisch.

Abb. 7 (unschraffierte Säulen) zeigt, daß die Effektivität des Aktivators mit zunehmender Entfernung abnimmt. So ist der Aktivator z.B. im Plasmid pA2(-87/ -821), indem er ca. 700 Bp vom tK - Promotor getrennt ist, ca. 8 mal weniger aktiv als in pA2 (-87/ -121), indem er direkt am tK - Promotor angrenzt. Dieses Experiment zeigt, daß der Aktivator auch in größeren Entfernungen wirksam ist, allerdings ist er nicht völlig entfernungsunabhängig, da seine Wirksamkeit mit steigender Entfernung abnimmt.

3.4 Der Aktivator ist c - AMP unabhängig.

Die Positionen -118 bis -111 des Aktivators (TGAGGTAA) sind der c - AMP - Rezeptorbindestelle des Phosphoenolpyruvatcarboxinkonase (PEPCK) - Gens der Ratte (TGACGTAA) sehr ähnlich (Short et. al., 1986, die identischen Nukleotide sind unterstrichen).

Um herauszufinden, ob der Aktivator durch c - AMP beeinflusst wird, wurden transient transfizierte MCF-7-Zellen mit 1 mM

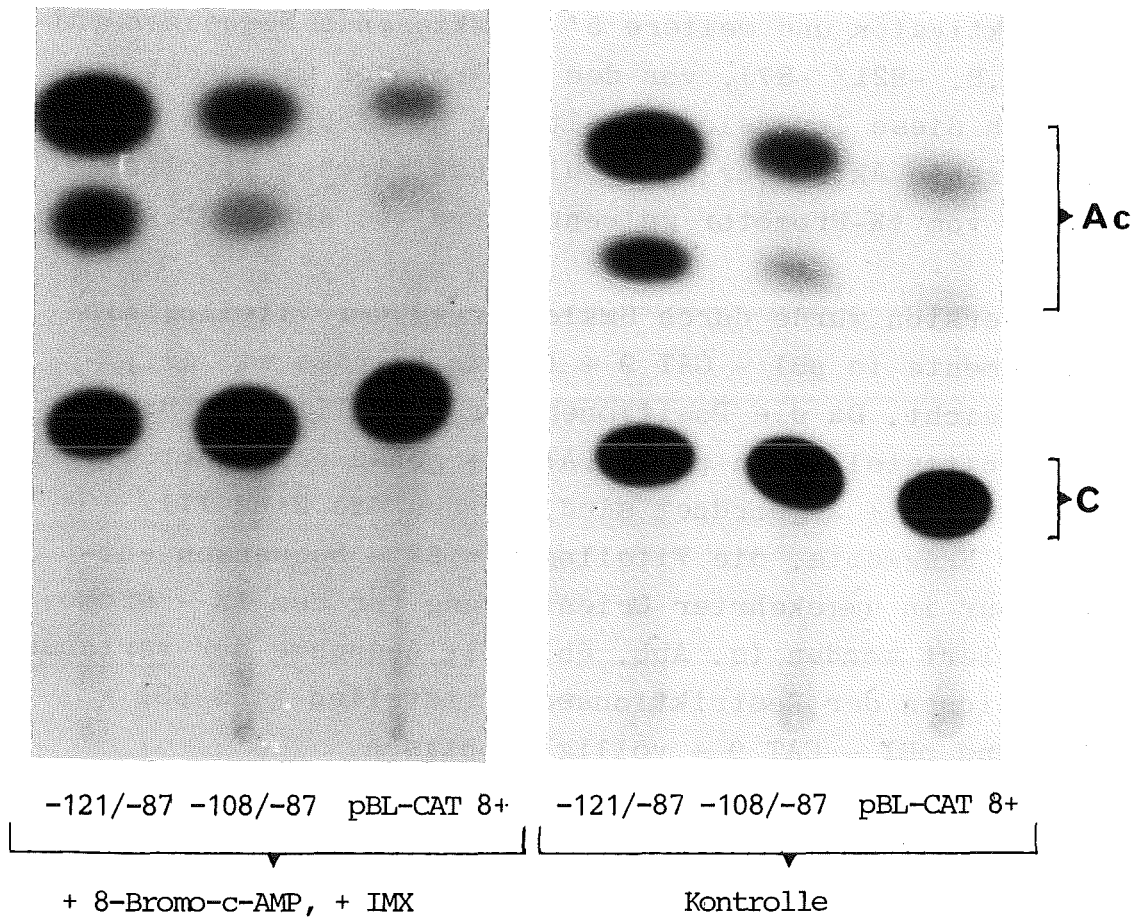


Abb. 8: Der Aktivator wird nicht durch c - AMP stimuliert.

Die Plasmide pA2 (-121/-87), pA2 (-108/-87) und pBl-CAT 8+ wurden in Anwesenheit (links) und Abwesenheit von 8-Bromo-c-AmP(Kontrolle) und IMX transient in MCF-7-Zellen transfiziert. Nach 40h wurde die Expression des CAT-Gens mit 100 ug Zellextrakt untersucht. Das nicht umgesetzte Chloramphenicol ist mit C, die beiden acetylierten Formen sind mit Ac bezeichnet.

8 - Bromo - c - AMP behandelt. Dieses Derivat kann im Gegensatz zu c - AMP die Zellmembran leicht durchdringen und entfaltet in der Zelle die gleiche Wirkung wie c - AMP. Zusätzlich wurde 0,5 mM IMX (3 - isobutyl, 1 - methyl - Xanthin) zugegeben, um die endogene c - AMP abbauende Phosphodiesterase zu hemmen. In den anschließenden CAT - assays konnte bei keinem der getesteten Plasmide eine Stimulierung durch c - AMP nachgewiesen werden (s. Abb. 8). Sowohl mit als auch ohne 8 - Bromo - c - AMP wurde für die beiden Plasmide eine Aktivierung von 120 - 170-fach (pA2 (-121/ -87) bzw. 3 - 5-fach (pA2(-108/ -87)) nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Aktivator nicht durch c - AMP beeinflußt wird.

3.5 Der Aktivator ist zellspezifisch.

In den vorhergehenden Experimenten wurde der Aktivator nur in MCF-7-Zellen (Brusttumor-Zelllinie) getestet. Da die Vitellogeningene in der Leber exprimiert werden, ist zu erwarten, daß der Aktivator auch in Hepatomzelllinien aktiv ist. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde eine Reihe von Plasmiden, die den Aktivator oder ein bzw. zwei seiner Elemente enthalten, transient in die Hepatomzelllinien HepG2 (Mensch) und BW1J (Maus) transfiziert und wie bei den MCF-7-Zellen durch den CAT-assay getestet, ob der Aktivator die CAT-Genexpression in diesen Zellen erhöhen kann. Neben diesen beiden Hepatomzelllinien wurden auch LtK - (Mausfibroblastenzelllinie), NFB - München (menschliche Normalfibroblasten) und HeLa-Zellen (menschliches, endotheliales Cervixkarzinom) getestet, um festzustellen, ob der Aktivator, wie z.B. der SV 40 enhancer, in vielen Zelltypen wirkt, oder ob seine Funktion auf wenige Zelltypen beschränkt ist.

Tab. 1 zeigt, daß der Aktivator nur in MCF-7-Zellen und in den beiden Hepatomzelllinien (HepG2 und BW1J) wirksam ist, wobei die Effektivität des Aktivators in den Hepatom-

Tabelle 1: Die Zellspezifität des Aktivators

Zelllinie	Getestete Aktivatorsequenzen					
	-121/-87 (1,2,3)	-121/-97 (1,2)	-108/-87 (2,3)	-121/-109 (1)	-108/-97 (2)	-97/-87 (3)
MCF-7	163 ± 37	60 ± 18	4,5 ± 2,5	7,5 ± 4,1	3,3±2,0	1,6±0,7
HepG2	61 ± 9	39 ± 18	2,9 ± 1,4	5,2 ± 2,6	2,8±2,7	2,7±0,8
BWLJ	11,5±0,6		2,5 ± 0,4	5,3 ± 2,6	1,6±0,8	1,6±0,2
LtK ⁻	1,5±0,5	0,4±0,3	0,8 ± 0,6	0,7 ± 0,5	0,4±0,2	0,2±0,1
NFB-Mü	2,1±0,4	0,6±0,3	1,0 ± 0,9	0,5 ± 0,3	0,2±0,1	0,7±0,1
HeLa	1,7±0,8	1,9±1,5	1,4 ± 0,8	0,7 ± 0,1	0,7±0,1	0,8±0,1

In der Tabelle sind die Aktivierungsfaktoren der verschiedenen, getesteten Konstrukte und die jeweiligen Standardabweichungen angegeben (s. Abb. 7 und 9). Die Zahlen in Klammer zeigen an, welche Elemente des Vitellogenin A2 - Aktivators in den betreffenden Konstrukten enthalten sind.

Jedes Konstrukt wurde für jede Zelllinie in mindestens 4 unabhängigen Transfektionsversuchen getestet. Die CAT - Aktivität von pBl - CAT 8 + wurde als Referenzpunkt zur Berechnung der Aktivierungsfaktoren genommen.

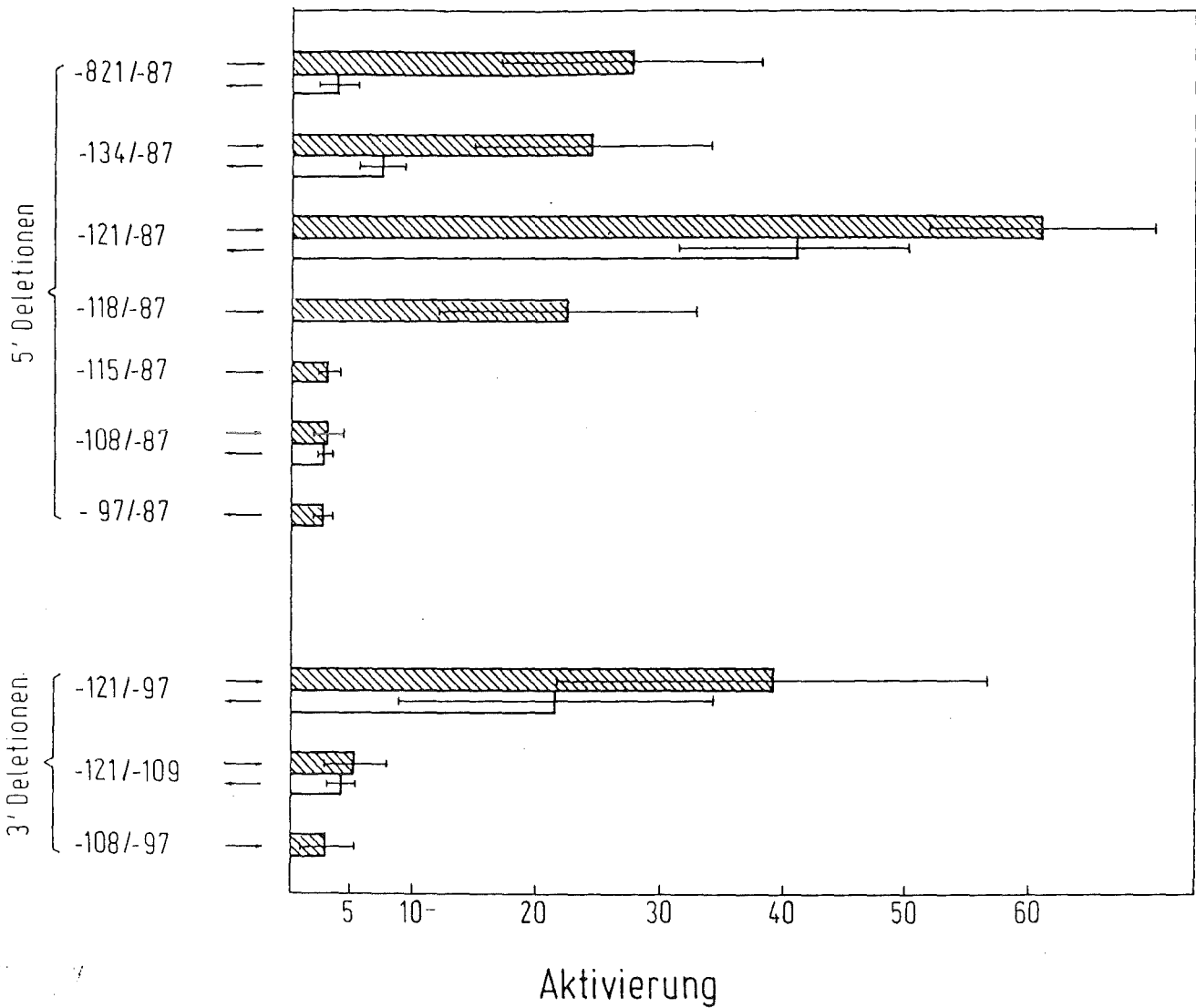


Abb. 9: Untersuchung des Aktivators auf Enhancereigenschaften in HepG2-Zellen.

Schraffierte Säulen: Aktivierungsfaktoren der Konstrukte, die den Aktivator in der ursprünglichen Orientierung enthalten. Nicht schraffierte Säulen: Aktivierungsfaktoren der Konstrukte, die den Aktivator in umgekehrter Orientierung enthalten. Die Vitellogenin-Sequenzen und ihre Orientierung sind wie in Abb. 7 bezeichnet.

Die Aktivierungsfaktoren und Standardabweichungen wurden durch 4 Transfektionsexperimente bestimmt. pB1 - CAT 8+ und pB1-CAT 9+ wurden als Referenzen zur Bestimmung der Aktivierungsfaktoren verwendet.

zellen geringer ist. In den anderen Zelllinien ist dagegen keine signifikante Aktivierung zu beobachten.

Tab. 1 und Abb. 9 zeigen auch, daß der Aktivator in den Hepatomzellen die selben Eigenschaften besitzt wie in den MCF-7-Zellen: Er kann in drei Elemente eingeteilt werden, und diese Elemente können miteinander kooperieren. So bewirkt z.B. Element 1 (-121/-109) in HepG2-Zellen eine ca. 5-fache Aktivierung, die zusammen mit Element 2 (-108/-97) auf 39-fach (-121/-97) gesteigert wird.

In den HepG2-Zellen wurde auch getestet, ob sich der Aktivator in Bezug auf Orientierungs- und Entfernungsabhängigkeit genauso verhält wie in MCF-7-Zellen.

Abb. 9 zeigt, daß der Aktivator in HepG2-Zellen auch in umgekehrter Orientierung funktionstüchtig ist und daß seine Wirksamkeit mit zunehmender Entfernung abnimmt. Er verhält sich damit genauso wie in MCF-7-Zellen.

3.6 Der Aktivator wird von DNA-bindenden Proteinen erkannt.

Die Regulation von Genen erfolgt durch Bindung von genregulierenden Proteinen an Enhancer oder Aktivatoren. Diese Bindung kann durch die sogenannte "Band shift" - Analyse nachgewiesen werden. Hierbei wird ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid, das eine Regulationssequenz enthält, mit dem Kernextrakt einer Zelllinie oder eines Gewebes inkubiert. Enthält der betreffende Kernextrakt nun ein Protein, das diese Sequenz bindet, so bildet sich ein DNA-Protein-Komplex, der sich auf einem Polyacrylamidgel leicht identifizieren läßt, da er bei der Elektrophorese langsamer wandert als das ungebundene Oligonukleotid. Durch Zugabe von Poly IC kann zwischen sequenzspezifischer und unspezifischer DNA-Bindung unterschieden werden.

Poly IC ist ein Nukleinsäuremolekül, das aus Cytosin und Inosin, dem gemeinsamen Vorläufer von Adenin und Guanin, besteht. Dieses Molekül besitzt die Sequenz ICICIC... und ähnelt so den Sequenzen ACACAC bzw. GCGCGC. Da der Aktivator und andere Enhancer- und Promotorsequenzen keine solche Basenfolge enthalten, besteht keine Gefahr, daß die sequenzspezifischen DNA-bindenden Proteine des Aktivators von Poly IC gebunden werden. Daher kann es als Kompetitor für unspezifische DNA - bindende Proteine verwendet werden.

Da der Aktivator aus drei Elementen besteht und durch die Bindung mehrerer Faktoren ein unübersichtliches Bild entstehen könnte, habe ich jeweils die einzelnen Elemente analysiert. Die den einzelnen Elementen entsprechenden, radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden mit dem Kernextrakt von MCF-7-Zellen inkubiert, in denen der Aktivator am wirksamsten ist.

Abb. 10a zeigt, daß Element 1 (-121/-109) zwei DNA-Protein-Komplexe (C_1 und C_2) bildet. Die leichte Schwärzung unterhalb von C_1 ist wohl durch Abbauprodukte von C_1 entstanden. Komplexe von entsprechender Größe werden auch mit Element 2 (-108/-97) gebildet. Für Element 2 kann noch ein zusätzlicher Komplex (C_3) gefunden werden (s. Abb. 10b).

Der C_1 entsprechende Komplex von Element 2 ist jedoch weniger spezifisch, da er durch niedrigere Konzentrationen an Poly IC kompetitiert wird als der C_1 - Komplex von Element 1. C_1 und C_2 entsprechende Komplexe werden auch mit Element 3 gebildet, wobei C_1 weniger spezifisch ist als C_2 (Abb. 10c).

Diese Experimente zeigen, daß alle drei Elemente des Aktivators mit MCF-7-Zellkernextrakt DNA - Proteinkomplex bilden können.

Für mehrere gewebespezifische Gene konnte nachgewiesen werden, daß gewebespezifische Proteine an Regulationssequenzen binden (Staudt et. al., 1986, Scheidereit et. al., 1987, De Simone et. al., 1987, Courtois et. al., 1987, Schorpp et. al., 1988b).

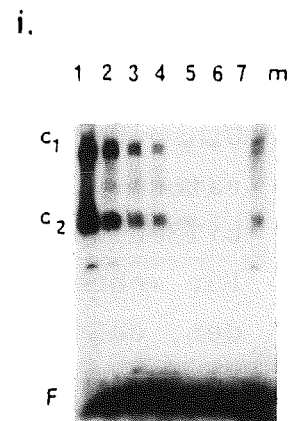
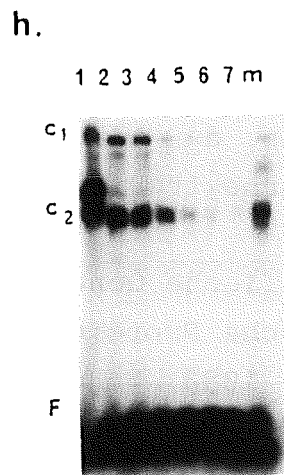
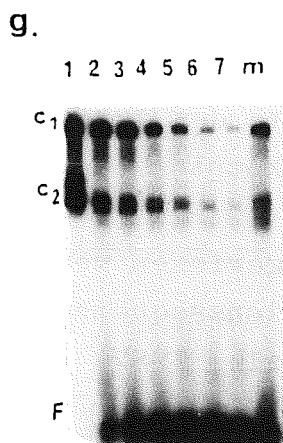
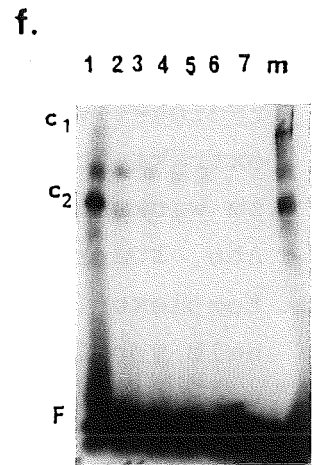
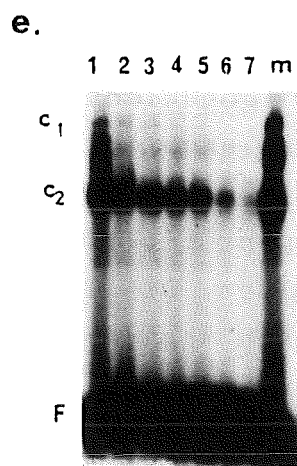
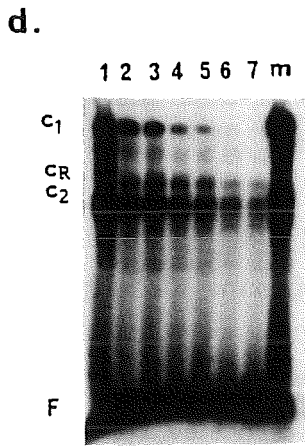
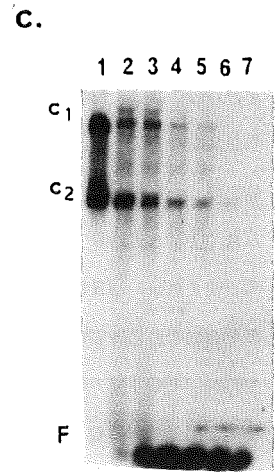
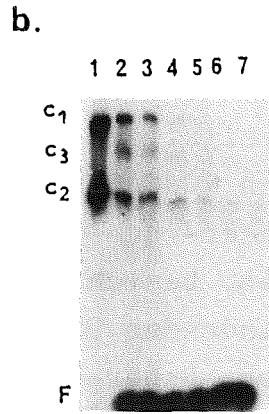
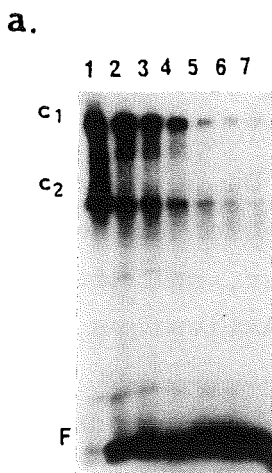


Abb. 10: "Band shift" - Analyse der Aktivatorelemente

Jeweils 5 ug MCF-7-(a-c), Rattenleber-(d-f) und HeLa-Zellkernextrakt (g-i) wurden mit 10^4 cpm markiertem Oligonukleotid inkubiert und auf einem 4 % Polyacrylamidgel analysiert. In a, d und g wurden Element 1, in b, e und h; Element 2 und in c, f und i Element 3 getestet. Die entstandenen DNA-Protein-Komplexe wurden mit C_1 , C_2 , C_3 und C_R bezeichnet. F zeigt die Position des freien, nicht proteingebundenen Oligonukleotids an.

Die Bahnen 1 - 7 enthalten steigende Mengen von Poly IC als Kompetitor für nicht sequenzspezifische DNA-bindende Proteine, für jeden Versuch jeweils 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0; und 4,0 ug Poly IC.

In der Bahn m ist jeweils eine Reaktion von 5 ug MCF-7-Zellkernextrakt mit dem entsprechenden Oligonukleotid in Anwesenheit von 0,5 ug Poly IC aufgetragen, um die Größe und Spezifität der mit den verschiedenen Zellextrakten auftretenden Komplexe miteinander vergleichen zu können.

Die Gele mit MCF-7- und HeLa-Zellextrakt wurden über Nacht, die Gele mit Rattenleberextrakt 40 h exponiert.

Um festzustellen, ob die den Aktivator bindenden Proteine ebenfalls zellspezifisch sind, wurden "Band shifts" mit Rattenleber- und HeLa - Kernextrakt durchgeführt. Dabei war von besonderem Interesse, ob mit Kernextrakten von MCF-7-Zellen und Rattenleber, in denen der Aktivator wirksam ist, andere Komplexe gebildet werden als mit den Kernextrakten von HeLa-Zellen, in denen der Aktivator wirkungslos ist.

Wie in Abb. 10 zu sehen ist, werden mit den Elementen 1 und 2 sowohl in Rattenleber (Abb. 10d,e) als auch in HeLa-Extrakt (Abb. 10g,h) zwei Komplexe gebildet, die den Komplexen C_1 und C_2 der MCF-7-Zellen größenmäßig entsprechen. Der Komplex C_1 ist in der Rattenleber allerdings nur sehr schwach ausgeprägt. Mit Rattenleberextrakt wird mit Element 1 noch ein weiterer Komplex (C_R , s. Abb. 10d) gebildet.

Der C_1 -Komplex von Element 2 ist in allen drei Extrakten weniger spezifisch als der von Element 1, da er durch niedrigere Poly IC-Konzentrationen kompetitiert wird. Die diffuse Schwärzung unterhalb von C_1 im Rattenleberextrakt ist nur bei längerer Exposition zu sehen und daher als unspezifisch anzusehen. Da der Rattenleberextrakt anscheinend weniger von den komplexbildenden Proteinen enthält, wurde die Gele einen Tag länger exponiert.

Mit Element 3 erhält man mit den Kernextrakten von MCF-7- und HeLa-Zellen Komplexe, die C_1 und C_2 entsprechen (s. Abb. 10c und 10i). Mit dem Rattenleberextrakt kann man keinen C_1 oder C_2 entsprechenden Komplex (s. Abb. 10f) finden.

Diese Versuche zeigen, daß die Aktivatorelemente mit allen drei getesteten Kernextrakten Komplexe bilden. Es werden jedoch keine zellspezifischen Komplexe gebildet, die mit der Funktion des Aktivators korrelieren. So werden die Komplexe C_1 und C_2 mit allen drei Kernextrakten gebildet, d.h. auch mit HeLa-Kernextrakt, obwohl der Aktivator in HeLa-Zellen inaktiv ist. Die Komplexe C_3 (MCF-7) und

C_R (Rattenleber) kommen jeweils nur bei einem Element und nur einem Zelltyp vor, in dem der Aktivator wirksam ist.

Da auch Elemente, die keinen C_3 - oder C_R - Komplex bilden, als Aktivator wirken (z. B. Element 1 in MCF-7-Zellen), können die Komplexe nicht mit der Aktivierung korreliert werden.

DISKUSSION

1. Die DNA - se I hypersensitiven Bereiche des Albumin 68 Kd - und Vitellogenin A2 - Gens korrelieren mit genregulatorischen Sequenzen

Im Albumin 68 Kd - Gen konnte in der Nähe des Transkriptionsstarts ein leberspezifischer DNA-se I hypersensitiver Bereich gefunden werden. Ein entsprechender Bereich wurde auch im Albumin-Gen der Ratte identifiziert (Babiss et. al., 1986, Nahon et. al., 1987). Für das Ratten-Albumin-Gen wurden noch zwei weitere hypersensitive Bereiche, nämlich 3 Kb und 5 Kb vor Transkriptionsstart gefunden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese hypersensitiven Bereiche auch im Xenopus-Albumin 68 Kd-Gen vorhanden sind, denn der Bereich von -5 Kb liegt außerhalb des untersuchten Bereichs, und ein hypersensitiver Bereich bei -3 Kb läge sehr nahe an der 5' Grenze des untersuchten KpnI - Fragments (ca. bei -3,4 Kb). Ein hypersensitiver Bereich bei -3,0 Kb hatte dann ein sehr kurzes Subfragment von 0,4 Kb ergeben, das nicht identifiziert werden kann, weil DNA-Fragmente, die kleiner als 0,5 Kb sind, nur sehr schlecht an Nitrozellulosefiltern haften (s. Methoden) und dieses Subfragment nur gegen 0,4 Kb der 1,0 Kb großen KpnI - Xho I - Probe (Probe a in Abb. 3a) hybridisieren kann.

DNA-se I hypersensitive Bereiche sind im Albumin 68 Kd - Gen in der Region von -3 Kb und -5 Kb sehr schlecht zu kartieren, weil dieser Bereich repetitive DNA-Elemente enthält (Ryffel et. al., 1983, s. Abb. 2).

Die Tatsache, daß es sowohl im Albumin 68 Kd - Gen als auch im Rattenalbumin einen DNA-se I hypersensitiven Bereich in der Nähe des Transkriptionsstarts gibt, deutet darauf hin, daß dieser Bereich wichtige Regulationssequenzen enthält.

Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, daß dieser Bereich Sequenzen enthält, die für die konstitutionelle Expression in Oocyten (-50 bis +19, Schorpp et. al., 1988a) und die leberspezifische Expression (-65 bis -53, Schorpp et. al., 1988b) der Albumin-Gene notwendig sind.

Die Reprimierung der Albumin-Synthese durch Östrogen geht nicht mit der Unterdrückung des leberspezifischen DNA-se I hypersensitiven Bereichs einher. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten von Kazmaier et. al. (1985), Wolffe et. al. (1985) und Riegel et. al. (1986), wonach die Reduktion der Albuminsynthese durch Östrogen posttranskriptionell erfolgt, d.h. auch während der Repression der Albuminsynthese ist die Transkription ähnlich hoch wie während der nicht reprimierten Albuminsynthese.

Im 5' flankierenden Bereich des Vitellogenin A2 - Gens konnten in den Zellkernen von östrogenbehandelten Tieren zwei DNA-se I hypersensitive Bereiche entdeckt werden, die sich ca. 300 Bp bzw. 100 Bp vor dem Transkriptionsstart befinden. Diese beiden Bereiche konnten in Blutzellkernen nicht gefunden werden. Damit wären diese Bereiche leberspezifisch. Ob diese beiden hypersensitiven Bereiche östrogenabhängig sind, konnte nicht nachgewiesen werden, da Versuche mit Leberzellkernen von unbehandelten Tieren keinen klaren Nachweis für das Vorhandensein oder Fehlen dieser beiden hypersensitiven Bereiche erbrachten.

Bei der Untersuchung der Chromatinstruktur des Hühnchen-Vitellogenin-Gens wurden drei DNA-se I hypersensitive Bereiche gefunden, die sich in der Nähe des Transkriptionsstarts, bei ca. -300 und ca. -700 befinden, (Burch und Weintraub, 1983).

Der DNA-se I hypersensitive Bereich des Vitellogenin A2 - Gens bei -100 könnte dem entsprechen, der beim Hühnchen-Vitellogenin-Gen in der Nähe des Transkriptionsstarts, (d.h. bei +1) gefunden wurde. Da die Position von DNA-se I hypersensitiven Bereichen aus technischen Gründen nur auf ± 100 Bp genau bestimmt werden kann, läßt sich nicht eindeutig entscheiden, ob diese beiden hypersensitiven Bereiche einander entsprechen oder ob es sich um zwei verschiedene Bereiche handelt.

Der DNA-se I hypersensitive Bereich des Vitellogenin A2 - Gens bei -100 liegt in der Nähe des Aktivators (-121 bis -87) und der TATA - box (bei -30). Da das Hühnchen-Vitellogenin-Gen zwischen -101 und -81 einen Bereich enthält, der den Aktivator-Elementen 2 und 3 sehr ähnelt (16 von 21 Bp sind identisch) und auch bei -30 eine TATA - box besitzt, ist es durchaus möglich, daß dieser DNA-se I hypersensitive Bereich in beiden Genen durch die gleichen genregulatorischen Faktoren verursacht wird.

Der DNA-se I hypersensitive Bereich bei -300 liegt bei beiden Genen in der Nähe von Sequenzen, die die Östrogenregulation vermitteln (Klein-Hitpass et. al., 1986, Burch et. al., 1988).

Der hypersensitive Bereich des Hühnchen-Vitellogenin-Gens bei -0,7 Kb liegt ebenfalls in der Nähe eines Östrogenregulationselementes. Dieses Östrogenregulationselement und ein entsprechender DNA-se I hypersensitiver Bereich fehlen im Vitellogenin A2 - Gen.

2. Die "curved DNA" des Vitellogenin A2 - Gens

Durch die Untersuchung des abweichenden Wanderungsverhaltens von Deletionsmutationen konnte in der Region zwischen -270 und -160 ein Bereich von "curved DNA" identifiziert werden. Der entsprechende Bereich des Hühnchen-Vitellogenin-Gens enthält ebenfalls "curved DNA". Demnach wäre die "curved DNA" ein Merkmal, das in der Evolution seit der Aufspaltung der Linien von Xenopus und Huhn erhalten geblieben ist. Diese Tatsache legt eine wichtige Rolle der "curved DNA" nahe. Es konnte jedoch in den Transfektionsexperimenten kein Einfluß der "curved DNA" auf die Genexpression festgestellt werden. Demnach sollte die "curved DNA" Eigenschaften besitzen, die entweder die Genexpression nicht beeinflussen oder deren Einfluß durch die transiente Transfektion nicht gemessen werden kann. Möglicherweise beeinflußt "curved DNA" den Aufbau des Chromatins. So konnten Satchwell et. al. (1986) zeigen, daß Nukleosomen bevorzugt an DNA-Sequenzen binden, die AA- oder TT-Dinukleotide enthalten, die sich alle 10,5 Bp wiederholen. Gemäß der Hypothese von Satchwell et. al. (1986) sollte ein Nukleosom bevorzugt an den Bereich von -280 bis -135 des Vitellogenin A2 - Gens binden. Die Regulationssequenzen des Vitellogenin A2 - Gens, ERE und Aktivator, würden dann in sogenannten Linkerregionen liegen, die die einzelnen Nukleosomen verbinden. Dieser Umstand würde dann auch erklären, warum die DNA-se I hypersensitiven Bereiche des Vitellogenin A2 - Gens so schwach ausgeprägt sind. Da aktive Gene in der sogenannten Perlenkettenstruktur vorliegen (s. Abb. 1), wären die in den Linkerregionen liegenden Regulationssequenzen ERE und Aktivator für genregulatorische Proteine frei zugänglich und es müßte kein Nukleosom von der DNA entfernt werden, wie es bei einem stark ausgeprägten DNA-se I hypersensitiven Bereich der Fall ist (Saragosti et. al., 1980). Die DNA-se I hypersensitiven Bereiche des Hühnchen-Vitellogenin-Gens sind vielleicht deshalb stärker ausgeprägt,

(Burch und Weintraub, 1983), weil die nukleosomenfreien Bereiche größer sind. So würde man nach den Sequenzdaten erwarten, daß beide Gene im Bereich von -280 bis -135 ein Nukleosom binden. Da das Östrogenregulationselement des Hühnchen-Vitellogenin-Gens sich bis -358 erstreckt, (Burch et. al., 1988), während das ERE des Vitellogenin A2 - Gens nur bis -331 reicht, (Klein-Hitpass et. al., 1986), könnte der nukleosomenfreie Bereich des Hühnchen-Vitellogenin-Gens ca. 30 Bp größer sein. Die Unterschiede in der Intensität der DNA-se I hypersensitiven Bereiche von Hühnchen-Vitellogenin-Gen und Xenopus-Vitellogenin A2 - Gen sind wahrscheinlich nicht auf technische Gründe zurückzuführen, da mit den gleichen Zellkernpräparationen ein deutlicher leberspezifischer DNA-se I hypersensitiver Bereich im Albumin 68 Kd - Gen nachgewiesen werden konnte (s.o.).

Bei der "curved DNA" kann es sich auch um eine Bindestelle der DNA in der Gerüststruktur des Chromosoms handeln, wie von Cockerill und Garrard (1986) und Gassner und Lämmler (1986) beschrieben worden ist. Diese Bindestellen enthalten mehrere A- bzw. T-reiche Blöcke (A- bzw. T-boxen) mit den Consensus-Sequenzen $AATAAA\frac{T}{C}AAA$ bzw. $TT\frac{A}{T}T\frac{A}{T}TT\frac{T}{A}TT$ sowie ein oder mehrere Topoisomerase-II-Erkennungsstellen mit der Consensus-Sequenz $GTN\frac{A}{T}A\frac{A}{C}ATTNATNN\frac{A}{C}$ (Sander und Hsieh, 1985), - N steht für eine beliebige Base. Topoisomerase II ist eine der Hauptkomponenten des Chromosomengerüsts (Earnshaw et. al., 1985, Berrios et. al., 1985).

Die "curved DNA" des Vitellogenin A2 - Gens enthält fünf Sequenzen, die der A- bzw. T-box sehr ähnlich sind (8 Übereinstimmungen in 10 Bp bei -262, -244, -228, -215 und -185) und eine Sequenz, die der Topoisomerase II - Erkennungsstelle ähnelt (14 Übereinstimmungen in 15 Bp bei -203). Die anderen Vitellogenin-Gene von Xenopus und Huhn enthalten ebenfalls Sequenzen, die der A- und T-box bzw. der Topoisomerase II - Erkennungsstelle entsprechen.

Die Anwesenheit dieser Sequenzen würde jedoch nicht die für "curved DNA" typische Verbiegung der DNA-Helix bewirken, da sie sich nicht alle 10 - 11 Bp wiederholen. Die Tatsache, daß gerade die DNA-Konformation der "curved DNA" und nicht die DNA-Sequenz erhalten geblieben ist, spricht eher gegen die Annahme, daß es sich bei der "curved DNA" um eine Bindestelle am Chromosomengerüst handelt. Die Sequenzähnlichkeiten könnten Zufall sein, da der Bereich der "curved DNA" sehr A-T-reich ist.

Die Effekte, die die Bindung an das Chromosomengrundgerüst bewirken, können durch transiente Transfektionen nicht gemessen werden, da die transfizierte Plasmid-DNA in der Zelle als sogenanntes "Mini-Chromosom" vorliegt, für das noch keine Gerüststrukturen wie die "echten" Chromosomen der Zelle gefunden werden konnten.

3. Der Aktivator des Vitellogenin A2-Gens

3.1 Der Aktivator besteht aus drei Elementen.

Durch die Analyse von Deletionsmutanten konnte der Aktivator im Bereich von -121 bis -87 lokalisiert werden. Dabei wurde festgestellt, daß der Aktivator aus drei Elementen besteht. So können auch noch einzelne Teilbereiche des Aktivators, wie Element 1 (-121/-109) und Element 2 (-108/-97) allein die Transkription des CAT-Gens erhöhen (7,5- bzw. 3,3-fach). Die Elemente 1 und 2 (-121/-97) können miteinander kooperieren, d.h. die Aktivierung durch -121/-97 (ca. 60-fach) ist höher als nach der Addition der Aktivierungsfaktoren der Einzelelemente (7,5-fach + 3,3-fach = 10,8 fach) zu erwarten ist. Tritt zu diesen beiden Elementen noch Element 3 (-97/-87) hinzu, erhöht sich die Aktivierung auf ca. 160-fach. Überraschenderweise existiert keine Kooperation zwischen den Elementen 2 und 3 (-108/-87), da der Aktivierungsfaktor von Element 2 (3,3-fach) durch

Element 3 nur unwesentlich auf 4,2-fach angehoben wird. Vergleicht man die Standardabweichungen, die für die Versuche mit Element 2 (-108/-97) und Element 2 und 3 (-108/-87) erhalten wurden, so sieht man, daß dieser Unterschied nicht signifikant ist (s. Tab. 1).

3.2 Der Aktivator besitzt Enhancereigenschaften

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der Aktivator Enhancereigenschaften besitzt. So ist er in umgekehrter Orientierung und auch in größerer Entfernung wirksam. Allerdings ist die Wirkung des Aktivators in umgekehrter Orientierung um den Faktor 3 reduziert. Diese Reduktion ist auf die Orientierungsabhängigkeit von Element 3 zurückzuführen, da die Elemente 1 und 2 (-121/-97) in beiden Orientierungen gleich aktiv sind (s. Abb. 7).

Der Aktivator ist zwar auch in größerer Entfernung wirksam, jedoch nimmt seine Effektivität mit zunehmender Entfernung ab. Der Aktivator entspricht somit nicht vollständig der Definition eines Enhancers, nach der Orientierung und Entfernung keinerlei Einfluß auf die Enhancerwirkung haben. Da der Aktivator relativ nahe am Transkriptionsstart liegt (-121 bis -87), entspricht er eher einem Komplex von mehreren sogenannten UPEs (= upstream promotor elements - s. Einleitung) als einem Enhancer. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß diese Entfernungsabhängigkeit dadurch zustande kommt, daß bei der Konstruktion der Abstandsmutanten durch Inversion der zusätzlichen flankierenden Vitellogenin A2 - Sequenzen von -821/-87, -317/-87 und -134/-87 künstlich negativ wirkende Sequenzen entstanden sind, die den Aktivator hemmen.

Neben den bisher beschriebenen Regulationselementen ERE (Klein-Hitpass et.al., 1986) und dem Aktivator enthält der 5' flankierende Bereich noch weitere Sequenzen, die die Transkription beeinflussen. So sinkt z.B. der Aktivierungs-

faktor von ca. 75-fach auf ca. 25-fach, wenn die Sequenzen zwischen -317 und -278 entfernt werden, d.h. dieser Bereich enthält Sequenzen, die die Aktivierung um den Faktor 3 erhöhen (s. Abb. 5). Werden die Sequenzen zwischen -134 und -121 entfernt, so erhöht sich die Aktivierung um den Faktor 4 (von 40-fach auf 160-fach). Daher muß der Bereich zwischen -134 und -121 ein negativ wirkendes Element enthalten.

3.3 Der Aktivator ist zellspezifisch.

Der Aktivator ist zellspezifisch, da er nur in MCF-7- (Brusttumorzelllinie) und Hepatomzelllinien (HepG2, BW1J) wirksam ist. In Fibroblasten von Mensch (NFB - München) und Maus (Ltk⁻) sowie in Cervixkarzonomzellen (HeLa) ist er wirkungslos. Die Leberspezifität des Aktivators wird durch Ergebnisse von Weimar-Ehl (unveröffentlicht) und Döbbeling et. al. (zur Veröffentlichung eingereicht) bestätigt, die zeigen, daß der Aktivator in FTO-2B (Rattenhepatomzellen) und in einem Rattenleber-in vitro - System wirksam ist. Die unterschiedliche Effektivität des Aktivators in MCF-7, HepG2 und BW1J-Zellen ist wohl auf zellspezifische Eigenschaften, wie z.B. Anzahl der Transkriptionsfaktoren pro Zelle oder Transfizierbarkeit, zurückzuführen.

Es mag auf den ersten Blick erstaunlich erscheinen, daß sich Brustkarzonomzellen in Bezug auf den Aktivator ähnlich verhalten wie in Hepatomzellen. Froschleber und die Brustdrüse der Säuger haben jedoch eine gemeinsame Aufgabe, nämlich die Bereitstellung von Nährstoffen für die Nachkommen. Die Froschleber stellt mit dem Vitellogenin Dotterproteine her, während die Brustdrüse die Milch liefert. Man kann sich daher vorstellen, daß die Expression der Vitellogenin- und Milchproteine durch die selben Faktoren reguliert wird.

3.4 Der Aktivator wird von DNA-bindenden Proteinen erkannt.

In der "Band shift" - Analyse konnte kein DNA-Proteinkomplex gefunden werden, der für die Zellen spezifisch wäre, in denen der Aktivator aktiv ist. So werden die Komplexe C_1 und C_2 (s. Abb. 10) auch mit HeLa-Zellextrakt gebildet, obwohl der Aktivator in HeLa-Zellen nicht aktiv ist.

Auch die Komplexe C_3 und C_R (s. Abb. 11 b,d) können nicht mit der Aktivierung korreliert werden, da z.B. Element 1 in MCF-7 - Zellen die Transkription des CAT-Gens aktivieren kann, aber mit MCF-7-Kernextrakt keinen dieser beiden Komplexe bildet (s. Abb. 10a).

Es kann allerdings nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, ob die mit C_1 und C_2 bezeichneten Komplexe jeweils immer vom gleichen Protein gebildet werden, weil in der "Band shift" - Analyse nur die Wanderungseigenschaften von DNA-Proteinkomplexen untersucht werden. Das Wanderungsverhalten dieser Komplexe wird nicht nur durch das Molekulargewicht des bindenden Proteins, sondern auch durch die negativen Ladungen des Oligonukleotids beeinflusst. Für das Wanderungsverhalten ist auch entscheidend, ob das Protein die Sequenzen am Rande oder in der Mitte des Oligonukleotids bindet, (Wu et.al., 1984). Da die getesteten Oligonukleotide relativ kurz und nahezu gleich groß sind (nur 1 Bp Unterschied), ist es relativ wahrscheinlich, daß zumindest die C_1 - bzw. C_2 - Komplexe eines Zelltyps von den gleichen Proteinen gebildet werden.

Die DNA-bindenden Proteine der Rattenleber, die den C_1 - und C_2 - Komplex bilden, unterscheiden sich von dem der MCF-7- und HeLa-Zellen, weil mit Rattenleberkernextrakt nur mit den Elementen 1 und 2, aber nicht mit Element 3 ein C_1 - bzw. C_2 -Komplex gebildet wird (s. Abb. 10 d-f). Mit MCF-7- und HeLa-Kernextrakt erhält man dagegen mit allen drei Elementen C_1 - und C_2 - Komplexe. Hierbei kann nicht entschieden werden, ob es sich um das unterschiedliche DNA-Bindungsverhalten von

gewebe- oder artspezifischen (Mensch, Ratte) - Varianten homologer Genprodukte handelt, oder ob in den Rattenleberzellen völlig andere Proteine die C_1 - und C_2 - Komplexe bilden .

In Bezug auf den C_1 - Komplex muß jedoch berücksichtigt werden, daß alle mit Rattenleberkernextrakt gebildeten DNA-Proteinkomplexe weniger stark ausgeprägt sind (vgl. jeweils die Bahnen m (MCF-7-Kernextrakt, 0,5 ug Poly-IC und 4 - Rattenleberkernextrakt, 0,5 ug Poly-IC) der Abbildungen 10 d,e und f miteinander) . Durch die Rattenleber-spezifischen Effekte könnte der schon in MCF-7- und HeLa-Zellen schwach ausgeprägte C_1 - Komplex von Element 3 in seiner Intensität soweit reduziert worden sein, daß er nicht mehr entdeckt werden kann.

Die Tatsache, daß der Aktivator zellspezifisch wirkt, aber keine zellspezifischen DNA-Proteinkomplexe gefunden werden können, kann folgende Gründe haben:

- 1.) Die Bedingungen, bei denen die Inkubation der Oligonukleotide mit den Kernextrakten erfolgt, entspricht nicht den Bedingungen im Zellkern, und aus diesem Grunde erfolgt keine Bindung des zellspezifischen Aktivatorproteins.
- 2.) Die Gene, die für die Aktivator-bindenden Proteine codieren, werden in allen Geweben exprimiert, aber nur gewisse, gewebespezifisch modifizierte (z.B. durch Phosphorylierung) Varianten können in vivo an den Aktivator binden. Möglicherweise können unter den künstlichen Inkubationsbedingungen (in vitro) der "Band shift" - Analyse auch die nicht modifizierten Varianten an den Aktivator binden.
Dieses Phänomen ist schon für Regulationssequenzen des leberspezifischen Tyrosin-Aminotransferase-Gens beobachtet worden (Becker et. al., 1987).

3.) Die Bindung der Aktivatorsequenz allein reicht nicht aus, um eine Genaktivierung zu bewirken. Hierzu müssen die an den Aktivator gebundenen Proteine durch weitere, zellspezifische Faktoren, die nicht an die DNA binden, modifiziert werden, z.B. durch Phosphorylierung (Ninfa und Magasanik, 1986) oder durch Bindung eines zusätzlichen Proteins (Tsai et. al., 1987). Möglicherweise sind die Protein-Protein-DNA-Komplexe zu groß oder zu instabil, um auf einem Polyacrylamidgel identifiziert werden zu können.

Die Vermutung, daß ein gewebespezifischer Faktor an eine die einzelnen Aktivatorelemente überlappende Sequenz bindet, kann ausgeschlossen werden, da die einzelnen Elemente des Aktivators die gleiche Gewebespezifität zeigen wie der gesamte Aktivator (s. Tab. 1).

Aus den "Band-shift" - Experimenten (s. Abb. 10) geht hervor, daß die Aktivatorelemente mit den getesteten Kernextrakten DNA-Proteinkomplexe bilden können (C_1 und C_2), die das gleiche Wanderungsverhalten zeigen. Eine Ausnahme bildet lediglich Element 3 mit dem Rattenleberkernextrakt. Für die Elemente 1 und 2 ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da sie beide zusammen ein unvollständiges Palindrom bilden (s. Abb. 11).

Bei der Sequenzanalyse des Aktivators konnte gefunden werden, daß alle drei Elemente Ähnlichkeit mit zwei regulatorischen Sequenzen besitzen: Mit der sogenannten Oktamersequenz und der EBP-20-Bindestelle (EBP = enhancer binding protein). Die Octamersequenz kommt in den Regulationssequenzen der Immunglobulin-Gene (Falkner und Zachau, 1984) V-Gene (Krol et. al., 1985) und des Histon 2 B - Gens (Harvey et. al., 1982) vor. Varianten dieser Sequenz wurden im SV40 - Enhancer (Falkner et. al., 1986) und im Adenovirus 2 - Genom gefunden (Pruijn et. al., 1987). Das EBP - 20 - Protein bindet an

Sequenzen der Enhancer von SV 40, MSV (Maus-Sarkomvirus) und Polyoma Virus (Johnson et. al., 1987).

Ein Sequenzvergleich des Aktivators mit einer Octamer-Consensussequenz der U-Gene, der Adenovirus 2 - Octamer-variante und der EBP-20-Bindestelle ist in Abb. 11 gezeigt.

Der in Abb. 11 vorgenommene Vergleich zeigt, daß es durchaus möglich ist, daß die einzelnen Aktivatorelemente ähnliche DNA-Proteinkomplexe wie C_1 oder C_2 bilden können. Eventuell werden diese beiden Komplexe durch Oktamer-Bindungsfaktoren und EBP - 20 gebildet. Vielleicht gibt es auch andere Faktoren, die eine ähnliche Bindestelle besitzen wie ein Oktamer-Bindungsfaktor oder EPB-20.

Da der Aktivator nur in Säugerzellen getestet wurde, kann man einwenden, daß der Aktivator im Xenopus selber für die Vitellogenin-Gen-Expression nicht relevant ist. Der Aktivator konnte nicht im homologen System, d.h. in Xenopus-Hepatoma-Zellen, durch transiente Transfektion getestet werden, weil es vom Xenopus keine etablierten Leberzelllinien gibt.

Wenn der Aktivator in der Xenopus-Leber wirksam ist, so sollte er von Kernproteinen der Xenopus-Leber erkannt werden. Die resultierenden DNA-Proteinkomplexe sollten mit Hilfe der "Band shift" - Analyse nachweisbar sein.

Der hohe DNA-sen- und Proteinasengehalt der Xenopus-Leberzellen verhinderte jedoch diesen Nachweis.

Es gibt jedoch mehrere Argumente und indirekte Hinweise dafür, daß der Aktivator in der Xenopus-Leber physiologisch wichtig ist.

Die Vitellogenin-RNA macht bis zu 70 % der von der DNA-Polymerase II transkribierten m-RNA einer Leberzelle aus.

Eine so hohe Transkriptionsrate setzt die Anwesenheit von stark aktivierenden Promotorelementen voraus. Da der Aktivator die Genaktivität bis zu 160-fach erhöhen kann, ist er geradezu prädestiniert für ein stark exprimiertes Gen.

Im 5' flankierenden Bereich der Vitellogeningene von *Xenopus* und dem Huhn gibt es mehrere Homologieblöcke, in denen die DNA-Sequenz dieser Gene sehr ähnlich ist (Walker et. al., 1984). Der Aktivator ist mit den ersten zwei Dritteln des Homologieblockes - 2 identisch (s. Abb. 12).

Da für die Genregulation wichtige Sequenzen in der Evolution stärker konserviert wurden als Sequenzen, die die Genregulation nicht beeinflussen, ist die Konservierung der Aktivatorsequenz in den anderen Vitellogeningenen ein Hinweis dafür, daß der Aktivator auch im *Xenopus* ein wichtiges Regulations-element ist. Diese Vermutung konnte vor kurzem von unserer Gruppe bestätigt werden, als gezeigt werden konnte, daß dem Aktivator entsprechende Vitellogenin A1 - Sequenzen in einem Rattenleber - *in vitro* - Transkriptionssystem ebenfalls als Aktivator wirken (Ross , unveröffentlicht).

Es konnte schon mehrfach nachgewiesen werden, daß regulatorische Sequenzen von *Xenopus*-Genen auch in Säugerzellen wirksam sind, so z.B. für die Oktamersequenz der U-Gene (Krol et. al., 1985, 1987), das ERE (= estrogen responsive element) der Vitellogenin-Gene (Klein-Hitpass et. al., 1986, Seiler-Tuyns et. al., 1986), das SRE (= serum responsive element) des fos-Gens (Mohun et. al., 1987) und das leberspezifische Promotorelement HP1 der Albumin-Gene von *Xenopus* (Schorpp et. al., 1988b). Es ist daher durchaus wahrscheinlich, daß der Aktivator auch in *Xenopus*- und Säugerzellen wirksam ist.

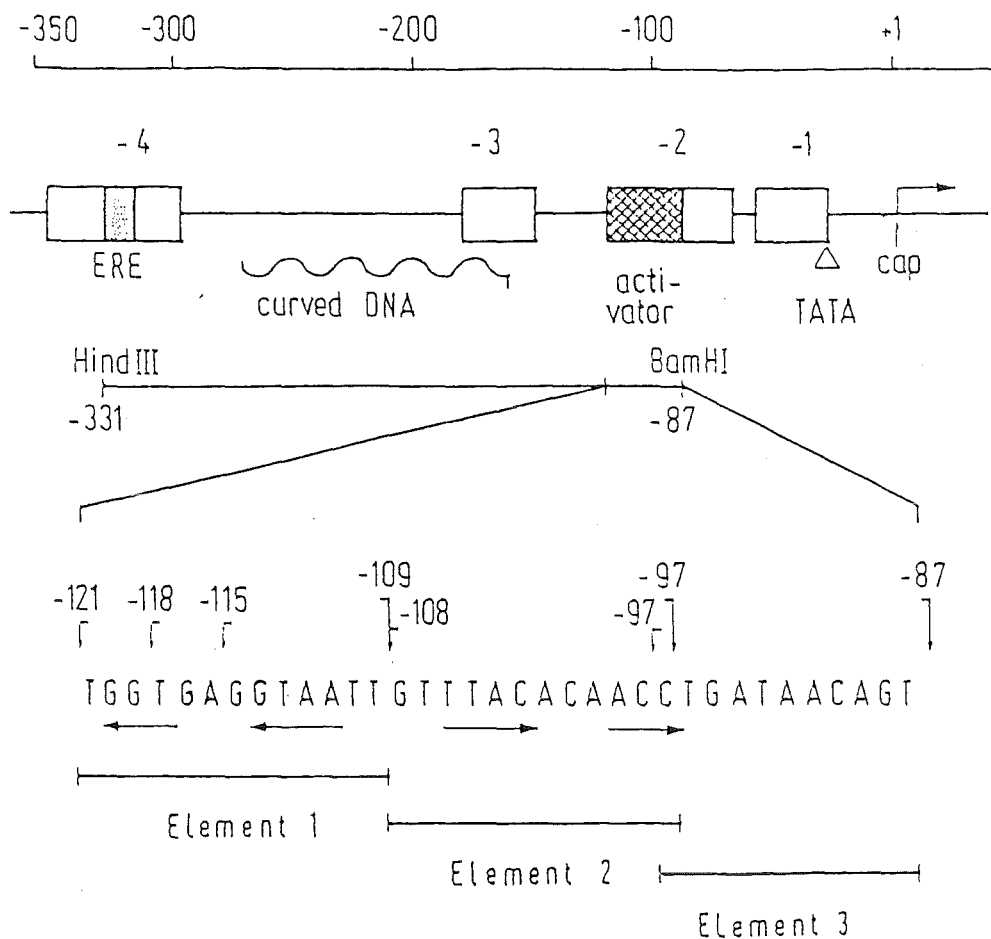


Abb. 12: Die regulatorischen Elemente des Vitellogenin A2 - Gens.

Die vier konservierten Homologieblöcke der Vitellogenin-Gene von *Xenopus* und Huhn sind als Boxen dargestellt; die Position der "curved DNA" wird durch die Wellenlinie angegeben. Die Skala oben gibt den Abstand zum Transkriptionsstart bei +1 (cap) an. Der Homologieblock -4 enthält das ERE (estrogen responsive element - dunkler Bereich -) - (Klein-Hitpass et.al., 1986, 1988a). Der Block - 2 enthält den Aktivator (schraffiert) und der Block - 1 die TATA-Region (Dreieck). Für Homologieblock - 3 ist keine Funktion bekannt. Das Hind III / Bam HI - Fragment, das das ERE und den Aktivator enthält, ist darunter dargestellt. Die nach links zeigenden Pfeile oberhalb der Aktivatorsequenz bezeichnen die 5' Endpunkte der getesteten 5' Deletion, während die nach rechts zeigenden Pfeile die Endpunkte der 3' Deletionen anzeigen. Die Position des unvollständigen Palindroms ist durch die Pfeile unterhalb der Sequenz angegeben. Die Position der Elemente wird durch die Querbalken unterhalb der Sequenz angegeben.

Ausblick

Die Klonierung der Gene der Faktoren, die über den Aktivator wirken, ermöglicht es, die Mechanismen der gewebe-spezifischen Genregulation weiter zu erforschen und die Frage zu beantworten, wie genregulatorische Gene reguliert werden. Da die Vitellogenin-Gene nur im erwachsenen Weibchen exprimiert werden und die Kompetenz für die Vitellogeninsynthese durch Thyroxin induziert wird, kann man untersuchen, ob die Gene der Aktivator-bindenden Faktoren durch Thyroxin induziert werden und ob die Gene für diese Faktoren nur im erwachsenen Tier aktiv sind.

Mit Hilfe dieser Gene könnten somit auch Fragen der Entwicklungsbiologie beantwortet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Babiss, L.E., Bennett, A., Friedman, J.M. und Darnell, J.E. (1986). DNA-se I hypersensitive sites in the 5' flanking region of the rat albumin gene: Correlation between chromatin structure and transcriptional activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6504 - 6508.
- Barberis, A., Superti-Furga, G. und Busslinger, M. (1987). Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promotor.
Cell 50, 347 - 359.
- Becker, P.B., Ruppert, S. und Schütz, G. (1987) Genomic footprinting reveals cell-type specific DNA-binding of ubiquitous factors. Cell 51, 435-443.
- Berrios, M., Osheroff, N. und Fisher, P. (1985) In situ localisation of DNA-topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 4142 - 4146.
- Birnboim, C. und Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. 7, 1513 - 1523.
- Burch, J.B.E. und Weintraub, H. (1983) Temporal order of chromatin changes associated with activation of the major chicken vitellogenin-gene.
Cell 33, 65 - 76.

- Burch, J.B.E., Evans, I.E., Friedman, T.M. und O'Malley, P.J. (1988). Two functional estrogen responsive elements are located upstream of the major chicken vitellogenin-gene.
Mol. Cell. Biol. 8, 1123 - 1131.
- Cassio, D. und Weiss, M.C. (1979).
Somatic Cell Genetics 5, 719 - 738.
- Chen, E.Y. und Seeburg, P.H. (1985).
Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA.
DNA 4, 165 - 170.
- Cockerill, P.N. und Garrard, W.T. (1986).
Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin-gene-occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II - sites.
Cell 44, 273 - 282.
- Cohen, S., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972).
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of E.coli by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 - 2114.
- Coon, H.G. und Weiss, M.C. (1969).
A quantitative comparison of formation of spontaneous and virus produced viable hybrids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 852 - 860.
- Courtois, G., Morgan, J.G., Campbell, L.A., Fourel, G. und Crabtree, G.R. (1987).
Interaction of a liverspecific nuclear factor with the fibrinogen and alpha₁ antitrypsin promoters.
Science 238, 688 - 692.

- Dente, L., Cesarini, G. und Cortese, R. (1983).
pEMBl, a new family of single stranded plasmids.
Nucl. Acids Res. 11, 1645 - 1655.
- De Simone, V., Ciliberto, G., Hardon, E., Paonessa, G,
Palla, F., Lundberg, L. und Cortese, R. (1987).
Cis- and transacting elements responsible for the
cell-specific expression of the human α_1 -
antitrypsin gene.
EMBO J. 6, 2759 - 2766.
- Diekmann, S. und Wang, J.C. (1985).
On the sequence determinants and flexibility of
the kinetoplast DNA - fragment with abnormal gel
electrophoretic mobilities.
J. Mol. Biol. 186, 1 - 11.
- Diekmann, S. (1986).
Sequence specificity of curved DNA.
FEBS Lett. 195, 53 - 56.
- Earnshaw, W.C., Halligan, B., Cooke, C., Heck, M.M.F.
und Liu, L.F. (1985). Topoisomerase II is a
structural component of mitotic chromosome scaffolds.
J. Cell. Biol. 100, 1716 - 1725.
- Falkner, F.G. und Zachau, H.G. (1984).
Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene
requires an upstream fragment containing conserved
sequence elements.
Nature 310, 71 - 74.
- Falkner, F.G., Mocikat, R. und Zachau, H.G. (1986).
Sequences closely related to an immunoglobulin gene
promoter/enhancer - element occur also upstream of
other eukaryotic and of prokaryotic genes.
Nucl. Acids Res. 14, 8819 - 8827.

- Fletcher, C., Heintz, N. und Roeder, R.G. (1987).
Purification and characterization of OTF-1 a
transcription factor regulating cell cycle expression
of a human histone H2b gene.
Cell 51, 773 - 781.
- Fried, M. und Crothers, D.M. (1981).
Equilibria and kinetics of lac-repressor-operator
interactions by polyacrylamide gel electrophoresis.
Nucl. Acids Res. 9, 6505 - 6525.
- Gasser, S.M. und Lämml, U.K. (1986).
Cohabitation of scaffold binding regions with
upstream enhancer elements of three developmentally
regulated genes of D. - melanogaster.
Cell 46, 521-530.
- Gasser, S.M. und Lämml, U.K. (1987).
A glimpse at chromosomal order.
Trends in Genetics 3, 16 - 22.
- Gilbert, W. und Müller-Hill, B. (1967).
The lac operator is DNA.
Proc.Natl. Acad. Sci USA 58, 2415 - 2421.
- Gorman, C.M., Moffat, L.M. und Howard, B.H. (1982).
Recombinant genoms which express chloramphenicol
acetyltransferase in mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. 2, 1044 - 1051.
- Gough, G.W. und Lilley, D.M.J. (1985).
DNA bending induced by cruciform formation.
Nature 313, 154 - 156.

- Graham, F. und van der Eb, A. (1973).
A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology 52, 456 - 457.
- Harvey, R.P., Robins, A.J. und Wells, J.R.E. (1982).
Independently evolving chicken histone H2B - genes: identification of an ubiquitous H2B-specific 5' element.
Nucl. Acids Res. 10, 7851 - 7863.
- Hentschel, C.C. (1982).
Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S₁ nuclease.
Nature 295, 714 - 716.
- Hsieh, C.-H. und Griffith, J.D. (1988).
The terminus of SV 40 replication and transcription contains a sharp sequence directed curve.
Cell 52, 535 - 544.
- Huber, S., Ryffel, G.U. und Weber, R. (1979).
Thyroid hormone induces competence for estrogen-dependent vitellogenin-synthesis in developing *Xenopus laevis* liver.
Nature 278, 65 - 67.
- Johnson, P.F., Landschulz, W.H. Graves, B.J. und Mc. Knight, S.L. (1987).
Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses.
Genes and Development 1, 133 - 146.
- Jonstra, J., Reudelhuber, T.L., Oudet, P., Benoist, C., Chi-Bom-Chae, Jeltsch, J.M., Mathis, D.J. und Chambon, P. (1984). Induction of altered chromatin structure by SV 40 - enhancer and promoter-elements.
Nature 307, 708 - 714.

- Kazmaier, M., Brüning, E. und Ryffel, G.U. (1985).
Post-transcriptional regulation of albumin gene
expression in *Xenopus* liver.
EMBO J. 4, 1261 - 1266.
- Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U. und Ryffel, G.U.
(1986). An estrogen responsive element derived from
the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin
A2 gene functions in transfected human cells.
Cell 46, 1053 - 1061.
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Heitlinger, E. und
Cato, A.C.B. (1988).
A 13 Bp palindrome is a functional estrogen
responsive element and interacts specifically with
estrogen receptor.
Nucl. Acids Res. 16, 647 - 663.
- Koo, H-S., Wu, H-M und Crothers, D.M., (1986).
DNA bending at adenine thymidine tracts.
Nature 320, 501 - 506.
- Król, A., Lund, E. und Dahlberg, J.E., (1985).
The two embryonic U1 - RNA genes of *Xenopus laevis*
have both common and gene-specific transcription
signals.
EMBO J. 4, 1529 - 1535.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. und Randall, R. (1951).
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
- Maniatis, T., Fritsch, E. und Sambrook, J. (1982).
Molecular cloning - a laboratory manual pp. 96 -94.
Cold Spring Harbour Lab., New York.

- Maniatis, T., Goodburn, S. und Fischer, J.A. (1987).
Regulation of inducible and tissue-specific gene.
expression.
Science 236, 1237 - 1244.
- Marini, J.C., Levene, D.S., Crothers, D.M. und Englund, P.T.
(1982).
Bent helical structure in kinetoplast DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7664 - 7668.
- Marini, J.C., Effran, P.N., Goodman, T.C., Singleton, C.K.,
Wells, R.D., Wartell, R.M. und Englund, R.T. (1984).
Physical characterization of a kinetoplast DNA-frag-
ment with unusual properties.
J.Biol.Chem. 259, 8974 - 8979.
- May, F.E.B., Ryffel, G.U., Weber, R. und Westley, B.R. (1982).
Estrogen dramatically decreases albumin m-RNA levels
and albumin synthesis in *Xenopus laevis* liver.
J. Biol.Chem. 257, 13919 - 13923.
- Messing, J. (1983).
New M 13 vectors for cloning.
Method. Enzymol. 101, 20 - 79.
- Mohun, T., Garrett, N. und Treisman, R. (1987).
Xenopus cytoskeletal and human c-fos gene promoters
share a conserved protein-binding site.
EMBO, J. 6, 667 - 673.
- Nahon, J.-L., Venetianer, A. und Sala-Trepat, J.M. (1987).
Specific sets of DNA-se I hypersensitive sites are
associated with the potential and overt expression
of the rat albumin and alpha-fetoprotein genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2135 - 2139.

Ninfa, A.J. und Magasanik, B. (1986).

Covalent modification of the gln G product, NR I, by the gln L product, NR II, regulates the transcription of the gln ALG operon in *E. coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5909 - 5913.

Pruijn, G.M.J., van Driel, W., van Miltenburg, R.T. und van der Vliet, P. (1987).

Promoter and enhancer elements containing a conserved sequence motif are recognized by nuclear factor III, a protein stimulating adenovirus DNA replication.
EMBO J. 6, 3771 - 3778.

Ptashne, M. (1967).

Nature 214, 232 - 234.

Reeves. R. (1984).

Transcriptional active chromatin.
Biochem. Biophys. Acta 782, 343 - 393.

Riegel, A.T., Martin, M. und Schönberg, D.R. (1986).

Mol. Cell. Endocrinol 44, 201 - 209.

Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977).

Labeling DNA to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113, 237 - 251.

Ryffel, G.U., Müllener, D.B., Gerber, Huber S., Wyler, T. und Wahli, W. (1983).

Scattering of repetitive DNA sequences in the albumin and vitellogenin gene loci of *Xenopus laevis*.
Nucl. Acids Res. 11, 7701 - 7716.

Sander, M. und Hsieh, T. (1985).

Drosophila topoisomerase II DNA-double-strand cleavage: analysis of DNA-sequence homology at the cleavage sites.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 - 5467.
- Saragosti, S., Moyne, G. und Yaniv, M. (1980).
Absence of nucleosomes in a fraction of SV 40
chromatin between the origin of replication coding
for the late leader RNA.
Cell 20, 65 - 73.
- Satchwell, S.C., Drew, H.R. und Travers, A.A. (1986).
Sequence periodicities in chicken nucleosome core
DNA.
J. Mol. Biol. 191, 659 - 675.
- Scheidereit, C., Heguy, A. und Roeder, R.G. (1987).
Identification and purification of a human lymphoid-
specific octamer binding protein (OTF - 2), that
activates transcription of an immunoglobulin-promoter
in vitro.
Cell 51, 783 - 793.
- Schorpp, M., Döbbeling, U., Wagner, U. und Ryffel, G.U.
(1988a).
5' flanking and 5' proximal exon-regions of the
two Xenopus albumin genes.
J. Mol. Biol. 199, 83 - 93.
- Schorpp, M., Kugler, W., Wagner, U. und Ryffel, G.U. (1988b).
The hepatocyte specific promoter element HP1 of the
Xenopus albumin genes interacts with transcriptional
factors of mammalian cells.
J.Mol. Biol. - im Druck -.
- Short, J.M., Wynshaw - Boris, A., Short, P.H. und Hanson, R.W.
(1986).
Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxy-
genase (GTP) promoter-regulatory region.
J.Biol.Chem. 261, 9721-9726.

Southern, P. (1975).

Detection of specific sequences among DNA-fragments separated gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503 - 517.

Staudt, L.M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, A. und Baltimore, D. (1986).

A lymphoid specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes.

Nature 323, 640 - 643.

Szpirer, C. und Szpirer, J. (1975).

Differentiation 4, 85 - 91.

Thoma, F., Koller, T. und Klug, A. (1979).

Involvement of histone 1 in the organization of the nucleosome and the salt dependent superstructure of chromatin.

J.Cell, Biol. 83, 403 - 427.

Tratner, I., Nahon, J.L., Sala-Trenat, J.M und Venetianer, A. (1987).

Albumin and alpha fetoprotein gene transcription in rat hepatoma cell lines is correlated with specific DNA-hypomethylation and altered chromatin structure in the 5' region.

Mol. Cell. Biol. 7, 1856 - 1864.

Tsai, S., Sagami, I., Wang, H., Tsai, M.-J. und O'Malley, B., (1987).

Interactions between a DNA binding transcription factor (COUP) and a non-DNA binding factor (S 300 - II).

Cell 50, 701 - 709.

- Ulanowski, L.E. und Trifonov, E.N. (1987).
Estimation of wedge components in curved DNA.
Nature 326, 720 - 722.
- Wahli, W. und Ryffel, G.U. (1985).
Xenopus vitellogenin genes. Oxford survey on
eukaryotic genes 2, 96 - 120.
Maclean ed. Oxford University press.
- Walker, P., Germond, J.-E., Brown-Luedi, M., Givel, F.
und Wahli, W. (1984).
Sequence homologies in the region preceding the
transcription initiation site of the liver estrogen-
responsive vitellogenin and apo - V1 D1 II genes.
Nucl. Acids. Res. 12, 8611 - 8625.
- Watson, J.D. und Crick, F.H.C. (1953).
Molecular structure of nucleic acids: A structure
for deoxyribose nucleic acid.
Nature 171, 737 - 738.
- Weintraub, H. und Groudine, M. (1976).
Chromosomal subunits in active genes have an altered
conformation.
Science 193, 848 - 856.
- Wells, R.D. (1988).
Unusual DNA-structures.
J. Biol.Chem. 263, 1095 - 1098.
- Westley, B.R., Wyler, T., Ryffel, G.U. und Weber, R. (1981).
Xenopus laevis serum albumins are encoded in two
closely related genes.
Nucl. Acids Res. 9, 3557 - 3574.

- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R.,
Urlaub, G. und Chasin, L. (1979).
DNA-mediated of the adenin phosphoryboxyl-trans-
ferase locus into mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1373 - 1376.
- Wolffe, A.P., Glover, J.F., Martin, S.C., Tenniswood, P.R.,
Williams, J.L. und Tata, J.R. (1985).
Deinduction of transcription of Xenopus 74 Kd
albumin genes and destabilisation of m - RNA by
estrogen in vivo and in hepatocyte cultures.
Eur. J. Biochem. 146, 489 - 496.
- Wu, C. (1980).
The 5' end of the drosophila heat shock genes in
chromatin are hypersensitive to DNA-se I.
Nature 286, 854 - 860.
- Wu, H.-M. und Crothers, D.M. (1984).
The locus of sequence directed and protein-induced
DNA bending.
Nature 308, 509 - 513.