

KfK 5013
März 1992

Ein mammaspezifisch regulierter Aktivator im Promotor des Maus Mamma- Tumorigen

S. Mink
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5013

**Ein mammaspezifisch regulierter Aktivator
im Promotor des Maus Mamma-Tumorvirus**

Sigrun Mink

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Das Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) ist ein Retrovirus, das bei Mäusen über die Muttermilch weitergegeben wird und die Hauptursache für die Entstehung von Mammatumoren ist. Die Expression des proviralen Genoms von MMTV ist in infizierten Mäusen spezifisch für die differenzierte Milchdrüse während Schwangerschaft und Lactation. In der vorliegenden Arbeit sollten am Modell des Maus Mamma Tumor Virus generelle Regulationsmechanismen aufgeklärt werden, die zu einer spezifischen Expression eines Gens in der Milchdrüse führen.

Im 5' Bereich der LTR Region von MMTV wurde ein einem Enhancer ähnlicher Aktivator identifiziert, der fähig ist, heterologe Gene spezifisch in Mammazellen zu aktivieren. Die durch diesen, als E1 bezeichneten, Aktivator vermittelte Aktivierung ist orientierungsspezifisch. Diese Eigenschaft macht den E1 Aktivator unter anderem zu einem guten Kandidaten für ein regulatorisches Element, das an der durch MMTV ausgelösten Tumorentstehung beteiligt ist.

In der DNA Sequenz des E1 Aktivators wurden verschiedene Bindungsstellen für bekannte und nicht bekannte Transkriptionsfaktoren lokalisiert. Mehrere dieser Transkriptionsfaktoren wirken zusammen, um eine starke mammaspezifische Aktivierung zu erreichen. Der Minimalmodul für diese mammaspezifische Aktivierung besteht aus einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF1 und aus einer Bindungsstelle für den über seine Bindungssequenz neudefinierten Transkriptionsfaktor MAF (Mammazellspezifisch aktivierender Faktor). Multimere Bindungsstellen für diese beiden Faktoren sind ebenfalls in der Lage, einem Promotor eine spezifische Expression in Mammazelllinien zu vermitteln. Eine funktionelle Einheit, die im MMTV Aktivator die durch eine MAF Bindungsstelle und eine NF1 Bindungsstelle vermittelte Aktivierung verstärkt, ist die Sequenz ACAAG. Der Sequenzvergleich hat gezeigt, daß NF1 Bindungsstellen, MAF Bindungsstellen und die ACAAG Sequenz in den Promotoren vieler Milchproteingene auftreten. So zum Beispiel im α -Lactalbuminogen der Ratte oder im WAP (Whey acidic protein) Gen der Maus. Damit haben die über ein Virus definierten regulatorischen Module der mammaspezifischen Genregulation mit großer Wahrscheinlichkeit die gewünschte Generalität für die Expression zellulärer Gene in der Milchdrüse. Im Fall von MMTV ist die gewebespezifische Aktivität dieser Modulkombination durch eine zusätzliche Proteinbindungsstelle, F4, orientierungsspezifisch beeinflusst.

Abstract: A mammary cell specific activator in the mouse mammary tumor virus promoter

The mouse mammary tumor virus (MMTV) is a milk transmitted, murine retrovirus and the major causative agent of mammary tumor formation in mice. The expression of proviral MMTV sequences in infected mice is specific for the differentiated mammary gland during pregnancy and lactation. The aim of this work was to use the expression of the mouse mammary tumor virus as a model for the identification of regulatory elements required for mammary gland specific gene expression.

An "enhancer-like" activator was identified in the 5' portion of the LTR of MMTV, which is able to activate heterologous promoters specific in mammary gland cells. The activation mediated by this element, called E1, is orientation dependent. This property makes the E1 activator a good candidate for a regulatory element involved in mammary tumor formation by MMTV.

Various known and unknown transcription factors were found to bind to the DNA sequences in the E1 element. Several of these factors function together to mediate mammary gland specific transcription. The minimal module for mammary specific activation is a combination of binding sites for an NF1 protein and a new transcription factor MAF (mammary cell specific activating factor), defined from its DNA recognition sequence. Multimers of the binding sites for NF1 or MAF are also able to mediate mammary cell specific activation. A functional unit, which increases the activity of the NF1/MAF combination in the E1 activator of MMTV is the sequence ACAAAG.

NF1 binding sites, MAF binding sites and the sequence ACAAAG are also present in the promoters of several milk protein genes, such as the rat α -lactalbumin gene and the mouse WAP (Whey acidic protein) gene. So it is most likely that the regulatory module of mammary cell specific gene expression defined in the MMTV plays a general role in the mammary cell specific expression of cellular genes. In the case of MMTV the mammary specific activity of this module is modulated in an orientation-specific manner by an additional protein binding site: F4.

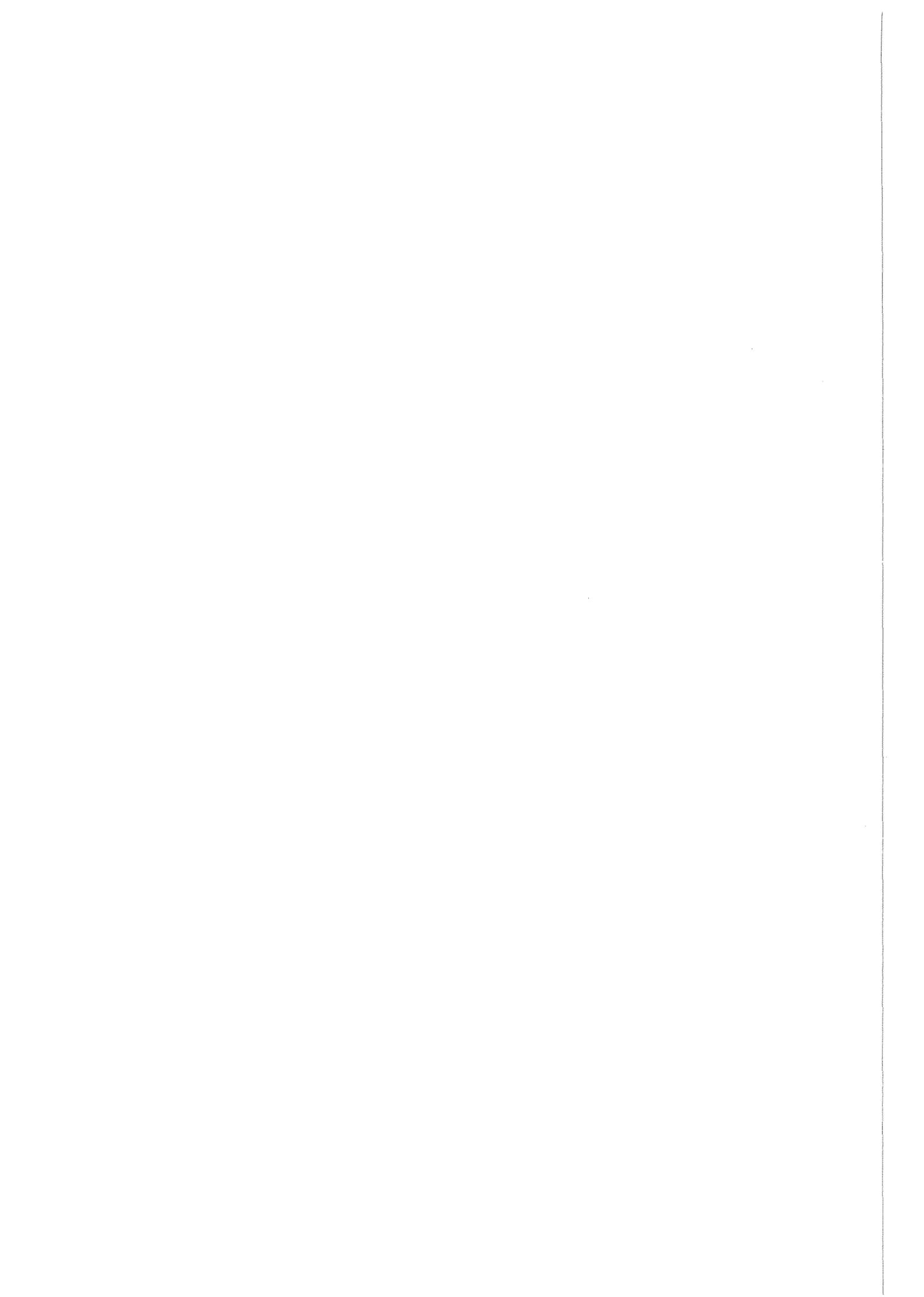
Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	13
2.1. Materialien	13
2.1.1 Bezugsquellen	13
2.1.2. Bakterien und Zellen	14
2.1.3. Kulturmedien	15
2.1.4. Antikörper	16
2.1.5. Oligonukleotide	16
2.2. Methoden	20
2.2.1. Behandlung von Nukleinsäuren	20
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
Phenol/Chloroform Extraktion	20
Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen	20
2.2.2. DNA Präparation	21
Plasmid DNA Präparation	21
Minipräparation von Plasmid DNA	21
2.2.3. Klonierungstechniken	21
Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	21
Dephosphorilierung von DNA	22
Phosphorilierung von Oligonukleotiden und Linkern	22
Auffüllen von 5' Überhängen	22
Bal 31 Exonuklease Verdau	22
Ligation von Restriktionsfragmenten	22
Ligation von Linker DNA an Restriktionsfragmente	22

Mutagenese mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion	23
Transformation von Bakterien	23
2.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	24
Auftrennung auf Agarose Gelen	24
Auftrennung auf Acrylamidgelen	24
Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen	25
2.2.5. Extraktion von DNA Fragmenten aus Gelen	25
2.2.6. Sequenzierung von DNA	25
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	25
Sequenzierung durch basenspezifische Spaltung	25
2.2.7. Aufreinigung von Oligonukleotiden	26
2.2.8. Markierung von DNA mit Radionukliden	27
Kinasierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden	27
Einseitige Markierung von Oligonukleotiden	27
Auffüllen von 5'Überhängen mit α - ³² P-dNTPs	28
Einseitige Markierung von DNA Fragmenten für die DNase I Protektionsanalyse	28
2.2.9. Zellkultur	28
2.2.10. Transfektion von eukaryontischen Zellen	29
DEAE-Dextran Methode	29
Calciumphosphat Methode	29
Induktion der Genexpression durch Hormone	30
Selektion von stabil transfizierten Klonen	30
2.2.11. RNA Präparation	30
2.2.12. S1 Analyse von RNA	31
2.2.13. Präparation von Proteinextrakten	31
Extraktpräparation für Enzymtests	31
Präparation von Kernextrakten für DNA Bindungs-Analysen	31
2.2.14. Proteinbestimmung	32
2.2.15. Enzymtests	32
β -Galaktosidase Aktivitätstest	32
Chloramphenicol Acetyltransferase Aktivitätstest	32
2.2.16. Proteinbindung an DNA	33
DNase I Protektionsanalyse	33
Gelretardationsanalyse	34
Methylierungs Interferenz Analyse	34
2.3. Plasmidkonstrukte	35
2.3.1. Fusionsgene aus MMTV-LTR Sequenzen	

Proteinbindungssequenzen aus dem E1 Fragment	37
Punktmutanten des E1 Fragmentes	38
2.3.3. Fusionsgene aus MMTV-LTR Sequenzen, Globin Promotor und Globin Gen	38
3. Ergebnisse	41
3.1. Der 5´Bereich des MMTV LTR enthält einen transkriptionellen Aktivator	41
3.1.1. Der 5´Bereich des MMTV LTR enthält einen zelltypspezifischen Aktivator, der Einfluß auf die Hormoninduzierbarkeit hat	41
3.1.2. Der isolierte 5´Bereich aktiviert heterologe Promotoren in zelltypspezifischer und orientierungsabhängiger Weise	45
3.2. Identifizierung der für die spezifische Funktion des E1 Aktivators benötigten Regulationseinheiten	48
3.2.1. Mehrere Proteine binden an den Aktivator in vitro	50
3.2.2. Die funktionelle Deletionsanalyse spricht für mehrere beteiligte Regulationseinheiten	54
3.2.3. Im 3´Bereich des E1 Fragmentes liegen zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP1	58
3.2.4. Eine der im 5´Bereich des E1 Aktivators lokalisierten Bindungs- regionen ist eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF1	62
3.2.5. Eine der Proteinbindungsregionen im mittleren Teil des Aktivators zeigt ein spezifisches Proteinbindungsmuster in Mammazellen	69
3.2.6. Die Regionen F12 und F2 binden dasselbe Protein: MAF	74
3.2.7. Ausschaltung von einzelnen Bindungsregionen im Gesamtkontext	79
3.2.8. NF1 und MAF stellen einen Minimalmodul für mammasspezifische Aktivierung dar	83
4. Diskussion	87
5. Literaturverzeichnis	97
Abkürzungen	105



1. Einleitung

Eine der wichtigsten Problemstellungen der molekularen Genetik ist die Aufklärung der Mechanismen, die zur regulierten Abrufung genetischer Information führen. Die zeitlich und örtlich regulierte Genaktivität ist die Basis für die Differenzierung und Spezialisierung von Zellen innerhalb eines vielzelligen Organismus. Obwohl in jeder Zelle eines Vielzellers in der Regel die gleiche genetische Information vorhanden ist, wird in jedem Gewebe nur ein bestimmter Satz von Genen exprimiert. Ein Modellfall einer solchen gewebespezifischen Expression ist Thema der vorliegenden Arbeit.

Auch die Expression von viralen Genomen hängt zum großen Teil vom Transkriptionsapparat der Wirtszelle ab und kann gewebespezifisch sein. So ist die Expression des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) spezifisch für die differenzierte Milchdrüse von infizierten Weibchen. MMTV war eines der ersten Tumoviren, die entdeckt wurden. Bereits 1936 konnte Bittner nachweisen, daß ein in der Muttermilch weitergegebener Faktor an der Ausbildung von Mammacarcinomen bei Mäusen beteiligt ist. Wie andere Retroviren hat MMTV ein RNA Genom, das nach dem Eindringen in die Zelle in DNA umgeschrieben wird (Übersichten: Varmus, 1983, Michalides und Nusse, 1981). Dieses DNA Molekül integriert unspezifisch in das Genom der Wirtszelle und wird dort als Provirus bezeichnet. Die Expression dieser proviralen Sequenzen kann gut mit der Expression eines zellulären Gens verglichen werden. Die Expression des MMTV kann deshalb als Modellfall einer gewebespezifischen Genregulation in der Milchdrüse betrachtet werden.

Der wichtigste Angriffspunkt für die Regulation der Genexpression ist die Initiation der Transkription (Übersicht: Darnell, 1982). Die Kontrolle dieser Initiation beruht auf der spezifischen Wechselwirkung von Proteinfaktoren, den sogenannten Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen Sequenzen auf der DNA (Übersicht: Mitchell und Tjian, 1989). Voraussetzung für eine basale Transkriptionsrate und die korrekte Initiation der Transkription ist bei den meisten proteincodierenden Genen höherer Eukaryonten die Bindung eines TFIID genannten Proteins an die sogenannte TATA Box, ein Adenin und Thymin reiches Sequenzmotiv das sich meist 25-30 Basenpaare stromaufwärts der Startstelle der Transkription befindet. Diese Bindung ist die Voraussetzung für die Ausbildung eines Initiationskomplexes, der neben anderen Proteinen auch die RNA Polymerase II enthält (Nakajima et al., 1988). Reguliert wird die Aktivität dieses Komplexes durch Transkriptionsfaktoren, die in einem Bereich von mehreren hundert

Basenpaaren stromaufwärts vom Transkriptionsstart, dem sogenannten Promotorbereich, an spezifische Erkennungssequenzen binden. Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren ist gereinigt worden und die für sie codierenden Gene sind kloniert. Einer der ersten gereinigten Faktoren war der Transkriptionsfaktor SP1, der spezifisch eine GC reiche Sequenz von zehn Basenpaaren erkennt, die sich im Promotorbereich des Tumovirus SV40 oder im Herpes simplex Thymidin Kinase Promotor befindet. Diese Bindung führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsrate (Briggs et al., 1986). Ein anderes spezifisches Erkennungsmotiv, das sich im Promotorbereich vieler eukaryontischer Gene befindet ist die sogenannte GCCAAT Box. An diese Sequenz können verschiedene Transkriptionsfaktoren binden, die ihrerseits in verschiedene Familien eingeordnet werden (Santoro et al., 1988). Der Mechanismus mit dem Transkriptionsfaktoren die Transkriptionsrate beeinflussen ist nicht vollständig verstanden. Oft scheint es sich um einen Einfluß auf die Aktivität des Initiationskomplexes durch Protein-Protein Interaktionen zu handeln, wobei auch zusätzliche nicht DNA bindende Proteine beteiligt sein können (Dynlacht et al. 1991, Übersicht: Ptashne, 1988) In manchen Fällen scheint aber auch eine Veränderung der Chromatinstruktur durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Bedeutung zu haben (Pina et al., 1990).

Die Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren können sich als Promotorelemente in direkter Nachbarschaft der Startstelle der Transkription befinden oder sie sind Teile von komplexen Elementen, die nach dem englischen Wort für Verstärker als Enhancer bezeichnet werden. Diese Elemente zeichnen sich dadurch aus, daß sie über Entfernungen von mehreren tausend Basenpaaren und unabhängig von ihrer Orientierung die Transkriptionsrate eines Gens beeinflussen können (Übersichten: Serfling et al., 1985, Sassone-Corsi und Borrelli, 1986). Enhancer können mehrere hundert Basenpaare lang sein und enthalten Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren. Die spezifische Funktion des Enhancers kommt durch das Zusammenspiel dieser Faktoren zustande. Man spricht von einer modularen Struktur, weil individuelle Bindungsstellen sich gegenseitig funktionell ersetzen können und als Bausteine von verschiedenen Enhancern oder auch als Promotorelemente auftreten. Besonders gut untersuchte Enhancer sind der Enhancer des Tumor Virus SV40 (Herr und Clarke, 1986, Fromental et al., 1988) oder der Immunoglobulin Enhancer (Picard und Schaffner, 1984). Für den Mechanismus, mit dem Enhancer über weite Strecken die Transkriptionsrate eines Promotors beeinflussen können, wird eine Schleifenbildung der DNA diskutiert, die dadurch zustande kommt, daß im Promotorbereich gebundene und im Enhancer gebundene Proteine miteinander wechselwirken (Übersicht: Müller und Schaffner, 1990). Neben regulatorischen Sequenzen und Transkriptionsfaktoren, die die Transkriptionsrate erhöhen gibt es auch solche Elemente und Faktoren, die diese Transaktivierung reprimieren. Dies kann dadurch geschehen, daß

ein positiv wirkender Transkriptionsfaktor an der Bindung seiner spezifischen Erkennungssequenz oder an der Aktivierung des Polymerase Komplexes gehindert wird. In anderen Fällen haben negative Transkriptionsfaktoren selbst einen Einfluß auf den Initiationskomplex (Übersicht: Renkawitz, 1990).

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, ob sie nun an einfache Promotorelemente binden oder innerhalb von komplexen Enhancern ihre Wirkung entfalten, kann durch äußere Signale beeinflusst sein. So bindet der durch Phorbolster induzierte Transkriptionsfaktor AP1 an eine spezifische Erkennungssequenz, die sich zum Beispiel im Promotorbereich des menschlichen Kollagenase Gens oder im Enhancer des Tumovirus SV40 befindet (Angel et al., 1987, Angel et al., 1988, Lee et al., 1987). Ein anderes Beispiel sind die Rezeptoren der Steroidhormone. Diese Transkriptionsfaktoren werden erst nach Bindung ihres spezifischen Liganden aktiviert (Übersicht: Beato, 1989). Das Maus Mamma Tumor Virus enthält einen Enhancer, in dem sich neben den Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren vier Bindungsstellen für Glucocorticoidrezeptoren befinden (Scheidereit et al., 1983, Payar et al., 1983).

Im Fall von gewebespezifisch transkribierten Genen muß man voraussetzen, daß die beteiligten Regulationselemente mit Transkriptionsfaktoren interagieren, die in gewebespezifischer Verteilung vorliegen. So ist die Expression einiger muskelspezifisch exprimierter Gene an die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors MyoD gebunden. Dieser Faktor ist in der Lage ein muskelspezifisches Differenzierungsprogramm in noch undifferenzierten Fibroblasten zu induzieren (Weintraub et al., 1991). Ein weiterer gut untersuchter Fall von gewebespezifischer Regulation ist die Expression in der Leber. Die Albumingene und einige weitere leberspezifisch exprimierte Gene enthalten Bindungsstellen für den in der Leber vorkommenden Transkriptionsfaktor HNF-1. In vitro wurde gezeigt, daß die Anwesenheit der Bindungssequenz für diesen Faktor ausreicht, um einem Gen eine spezifische Expression mit Kernextrakt aus Leberzellen zu vermitteln (Kugler et al., 1988, Lichtensteiner und Schibler, 1989). In der Regel kommt aber die gewebespezifische Expression eines Gens durch die Überlagerung des Einflusses von ubiquitär verbreiteten, induzierbaren und gewebespezifischen Transaktivatoren und auch durch negative Regulationsmechanismen zustande. Eine zusätzliche negative Kontrolle ist oft notwendig, um die Expression eines Gens, in Geweben in denen es stumm sein sollte, vollständig zu unterdrücken (Baniahmad et al., 1987, Larsen et al., 1986). Wie es zur gewebespezifischen Verteilung der Transkriptionsfaktoren selbst kommt, ist eine Frage ihrer differentiellen Expression während der Embryonalentwicklung. Für MyoD ist bekannt, daß seine Expression durch Mesoderm induzierende Faktoren angeschaltet werden kann (Rupp et al., 1991), aber für die meisten gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren ist die Verbindung

zu der übergeordneten Kontrolle der embryonalen Musterbildung völlig unklar .

Die Milchdrüse der Säugetiere ist ein Gewebe, dessen Funktion in der Produktion und Sekretion der Muttermilch besteht. Hier werden Proteine synthetisiert, die in keinem anderen Gewebe synthetisiert werden. So zum Beispiel die verschiedenen Caseine, das α -Lactoalbumin oder das saure Molkeprotein WAP (Whey Acidic Protein), das bei den Rodentia den Hauptanteil der Molke ausmacht (Henninghausen und Sippel, 1982). Die Milchdrüse wird während der Embryonalentwicklung als wenig verzweigtes Kanalsystem von Epithelzellen angelegt, das in einen Fettkörper eingebettet ist. Bei Erreichung der Geschlechtsreife vergrößert sich die Milchdrüse unter dem Einfluß von Östrogen und Wachstumshormon. Seine eigentliche Differenzierung erfährt das Mammaepithel aber erst während der Schwangerschaft unter dem Einfluß von Hormonen, wie Prolaktin und Hydrocortison. Die Drüsengänge verzweigen sich, die Endstücke erweitern sich zu Alveoli und die Produktion der Milchproteine und der Zucker- und Fettanteile der Milch beginnt. Schon in der undifferenzierten Milchdrüse sind die Epithelzellen aber als Mammazellen determiniert. Explantate von embryonalen Milchdrüsen können zum Beispiel unter dem Einfluß von lactogenen Hormonen Casein produzieren. Dies reflektiert nicht nur die Präsenz der entsprechenden Hormonrezeptoren. Auch Leberzellen haben Rezeptoren für Insulin, Glucocorticoide und Prolactin, produzieren aber im Gegensatz zu den Mammaepithelzellen kein Casein als Antwort auf diese Hormone. Das heißt, daß in der Milchdrüse von der Embryonalentwicklung an gewebespezifische, regulatorische Proteine vorhanden sein müssen, die in den differenzierten Zellen das spezifische hormonregulierte Expressionsmuster ermöglichen (Übersicht: Topper und Freeman, 1980).

Die gewebespezifische und hormonelle Regulation der Expression der Milchproteine findet zum großen Teil auf Transkriptionsebene statt. Die Transkription des Milchproteins WAP (Whey acidic Protein) wird durch Prolaktin und Glucocorticoide reguliert, wobei die Glucocorticoide wahrscheinlich den größeren Beitrag liefern (Hobbs et al., 1982, Doppler et al., 1991). Etwa 2500 Basenpaare der 5' flankierenden Sequenz des WAP Gens können die gewebespezifische und hormonelle Regulation auf andere Testgene in transgenen Tieren übertragen (Andres et al., 1987). Die Expression des Milchproteins β -Casein unterliegt wie die des WAP Proteins der transkriptionellen Regulation durch Glucocorticoide und Prolactin. Seine Expression steigt aber während der Schwangerschaft schneller an als die des WAP Gens (Hobbs et al., 1982). Im Gegensatz zum WAP Promotor ist beim β -Casein Promotor die Anwesenheit von Prolaktin für eine Glucocorticoidantwort unbedingt notwendig (Ball et al., 1989). Die gewebespezifische und die hormonelle Regulation sind bei Milchproteinen schwer zu trennen. Beim β -Casein Gen wurden die für die gewebespezifische und für die hormonelle Regulation notwendigen Sequenzen auf den

Bereich von einigen hundert Basenpaaren eingegrenzt. Innerhalb dieses Bereiches konnte die Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor lokalisiert werden, der für die Vermittlung der Hormonantwort benötigt wird und der nur in Mammagewebe vorzukommen scheint (Schmitt-Ney et al., 1991). Ein ausgesprochener mammaspezifischer Transkriptionsfaktor, der für die gewebespezifische Expression mehrerer Gene verantwortlich ist, konnte aber bis jetzt nicht identifiziert werden. Deshalb bietet es sich an, in weiteren Modellsystemen nach solchen mammaspezifischen Transkriptionsfaktoren zu suchen.

Die Expression des integrierten proviralen Genoms des Maus Mamma Tumor Virus ist ebenfalls spezifisch für die Milchdrüse. In anderen Geweben wie der Speicheldrüse oder im Hoden wurde nur eine geringe MMTV Expression gefunden. Die Expression in der lactierenden Milchdrüse liegt etwa fünfhundertmal höher (Henrard und Ross, 1988). Die MMTV Expression in der Milchdrüse steigt während der ersten Hälfte der Schwangerschaft langsam an und erhöht sich gegen Ende der Schwangerschaft rapide auf ein Niveau, das über Geburt und Lactation beibehalten wird (Munos und Bolander, 1989). Dieses Expressionsmuster wird durch die LTR (Long Terminal Repeat) genannte Region des proviralen Genoms vermittelt, die auch den viralen Promotor enthält. Das MMTV LTR kann sowohl die gewebespezifische als auch die entwicklungspezifische Regulation auf andere Testgene in transgenen Tieren übertragen (Ross und Solter, 1985).

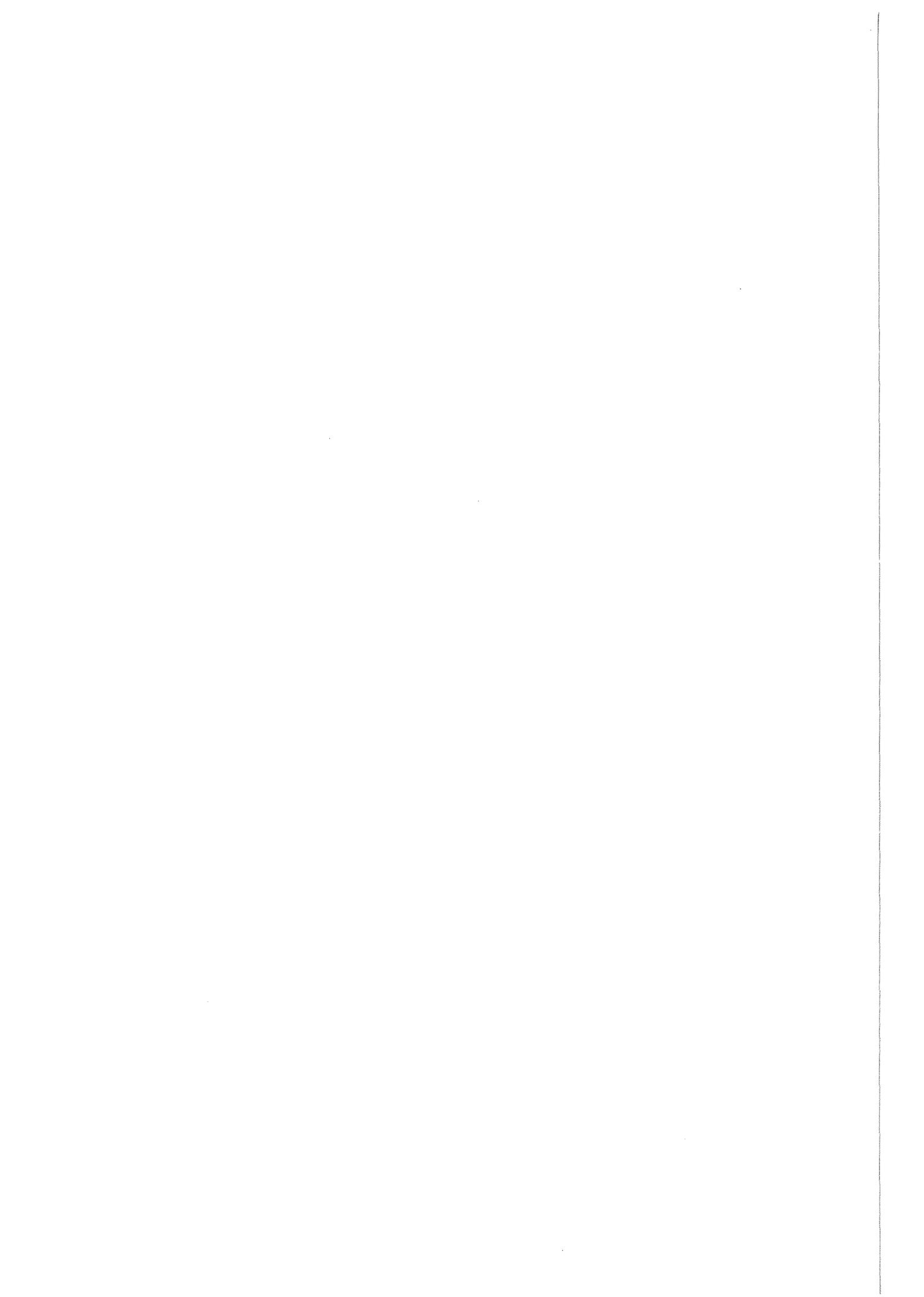
Die ansteigende MMTV Expression während der Schwangerschaft ist abhängig von Steroidhormonen, zunächst wahrscheinlich von Progesteron, nach der Geburt von Hydrocortison. MMTV hat sich deshalb als fruchtbares Modell für die hormonelle Regulation der Genexpression erwiesen. Schon 1975 konnten Ringold und Mitarbeiter zeigen, daß die Transkription dieses Virus durch Glucocorticoide reguliert wird. Nachdem rekombinante Klone des Virus isoliert waren, konnten die für die Hormonregulation benötigten Sequenzen eingegrenzt werden (Fasel et al., 1982, Hynes et al., 1983, Ponta et al., 1985). Der die Hormonantwort vermittelnde Enhancer befindet sich zwischen Position -202 und -59 stromaufwärts vom Transkriptionsstart und wird als HRE (Hormonresponsives Element) bezeichnet. Das HRE enthält mehrere Bindungsstellen für Hormonrezeptoren (Scheidereit et al., 1983, Payar et al., 1983, von der Ahe et al., 1985). Außer Glucocorticoiden können auch Progesteron, Androgen und Mineralocorticoide die Transkription am MMTV Promotor über dieses Element erhöhen (Cato et al., 1986, Cato et al., 1987, Cato und Weinmann, 1988a). Prolaktin und der Wachstumsfaktor EGF (Epidermal Growth Factor), der während Schwangerschaft und Lactation in erhöhten Mengen vorliegt, können ebenfalls zu einer hohen MMTV Expression beitragen, aber nur in der Anwesenheit von Steroidhormonen (Munos und Bolander, 1989, Cato et al. 1988b, Krusekopf et al., 1991). Das HRE enthält zusätzlich zu den Rezeptorbindungsstellen auch

regulatorische Elemente, die eine zelltypspezifische Regulation vermitteln können. Bestimmte Zelllinien, die aus MMTV induzierten Mammakarzinomen isoliert wurden, zeigen eine effiziente durch das HRE vermittelte Expression auch in Abwesenheit von Hormonen (Mink et al., 1990, Härtig et al., eingereicht).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß das MMTV LTR zusätzlich zu dem gut untersuchten HRE weitere regulatorische Sequenzen enthält. Im mittleren Teil des LTR wurden Elemente lokalisiert, die daran beteiligt sind, die Expression des Virus in anderen Geweben als der Milchdrüse zu unterdrücken (Morley et al., 1987, Hsu et al., 1988, Mink et al., 1990, Ross et al., 1990). Außerdem konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, daß der 5' Bereich des LTR eine wichtige Rolle in der effizienten, gewebespezifischen Expression des MMTV spielt (Stewart et al., 1988, Yanagawa et al., 1991, Lefebvre et al., 1991).

Eine weitere interessante Eigenschaft des MMTV ist seine Fähigkeit Tumoren auszulösen. Das MMTV Genom enthält im Gegensatz zu vielen anderen Retroviren kein eigenes Onkogen. Das tumorogene Potential des Virus beruht vielmehr auf der Aktivierung von bestimmten zellulären Onkogenen, den "int Genen", in deren weitere Nachbarschaft er durch Amplifikation und zufällige Integration in der Milchdrüse gerät. Durch cis wirkende, virale Sequenzen, die nicht näher lokalisiert sind, wird die Transkriptionsrate am Promotor des jeweiligen int Gens erhöht und diese deregulierte Expression wirkt auslösend für die Tumorentstehung (Moore et al., 1986, Nusse, 1986). Seit langem wurde ein cis wirkendes Enhancerelement auf dem MMTV Genom postuliert, das fähig ist, den int Promotor über weite Distanzen zu aktivieren. Als Kandidat dafür wurde unter anderem das im 5' Bereich des MMTV LTR lokalisierte regulatorische Element diskutiert, dessen Bedeutung für die gewebespezifische Regulation des MMTV schon erwähnt wurde (Lefebvre et al., 1991).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den im 5' Bereich des MMTV LTR lokalisierten Aktivator einzugrenzen und näher zu charakterisieren. Hierdurch sollten grundsätzliche Mechanismen der mammaspezifischen Genregulation aufgeklärt werden. Ein wichtiges Ziel der Arbeit war, Bindungsstellen für mammaspezifische Transkriptionsfaktoren zu charakterisieren und damit die Voraussetzung für die Aufreinigung der entsprechenden Proteine und die Klonierung der für sie codierenden Gene zu schaffen.



2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Bezugsquellen

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

Acetyl-Coenzym A, Li-Salz	Pharmacia, Freiburg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Appligene, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienschalen (9 cm)	Greiner, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
DEAE-Membran, NA45	Schleicher&Schuell, Dassel
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dexamethason	Sigma, München
Dialyseschläuche	Bender & Hobein, Karlsruhe
Dimethylchlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	BRL Inc., Neu-Isenburg
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DNase I	Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
G418	Gibco, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Bio Rad, München
HEPES	Sigma, München
Hydrazin	Fluka, Neu-Ulm
Insulin (aus Rinder Pankreas)	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Macherey-Nagel, Düren
Lachs-Spermien-DNA Typ III, Na-Salz	Sigma, München
Linker	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
NACS-Prepac-Säulen	Gibco, Karlsruhe
N-Broth	Difco Laboratories, Detroit

N,N'-Methylen-bisacrylamid
Nonidet P-40
Oligo-dT-Cellulose Typ VII
Penicillin/Streptomycin
Piperidin
Proteaseinhibitoren
Proteinase K
Quiagen-tip-500-Säulen
Quicxszint
Röntgenfilme (HyperfilmMP)
RPMI 1640
SDS
Sephadex G-50
Taq-Polymerase
TEMED
TPA
transfer-RNA (aus Kalbsleber)
Transformations-Chemikalien
Tris-HCl, Tris-Base
TritonX-100
Trypsin
Whatman 3MM-Papier
Zellkulturschalen

Bio Rad, München
Bio Rad, München
Collaborative Research Inc.
Gibco, Karlsruhe
Fluka, Neu-Ulm
Sigma, München
Merck, Darmstadt
Diagen, Düsseldorf
Zinsser, Frankfurt
Amersham, Braunschweig
Gibco, Karlsruhe
Serva, Heidelberg
Pharmacia, Freiburg
Amersham, Braunschweig
Bio Rad, München
Sigma, München
Boehringer, Mannheim
Fluka, Buchs Schweiz
Sigma, München
Bio Rad, München
Gibco, Karlsruhe
Bender & Hobein, Karlsruhe
Greiner, Nürtingen

Radiochemikalien:

γ -³²P-dATP (370MBq/ml)
 α -³²P-dCTP (370MBq/ml)
D-threo-(dichloroacetyl-1-¹⁴C)-
Chloramphenicol (7.4MBq/ml)

Amersham, Braunschweig
Amersham, Braunschweig
Amersham, Braunschweig

2.1.2. Bakterien und Zellen:

E. coli DH5 α :

F⁻, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, l⁻, recA1, gyrA96, relA1

GR

Mammacarcinom Zelllinie aus GR-Mäusen, erhalten von Nurul Sarkar, Augusta, Georgia. (Ringold et al., 1975)

C57B1

Epithelzellen aus normalem Mammagewebe, erhalten von Nurul Sarkar, Augusta, Georgia.

T47D

Menschliche Mammacarcinom Zelllinie (Horwitz et al., 1978), aus der Zellbank des Instituts für Genetik des Kernforschungszentrums Karlsruhe.

HC11

Murine Mammaepithelzellen , erhalten von Wolfgang Doppler, Innsbruck (Ball et al., 1988)

RAC-10-P

Adenocarcinom Zelllinie aus dem Mammaepithel von Balb/c Mäusen, erhalten von Arnoud Sonnenberg, Netherlands Cancer Institute Amsterdam (Sonnenberg et al., 1986).

NIH-3T3

Murine Fibroblasten, entsprechend den 3T3 Zellen der American Type Culture Collection, aus der Zellbank des Instituts für Genetik des Kernforschungszentrums Karlsruhe.

HepG2

Menschliche Hepatomzellen mit fötalem Status, aus der Zellbank des Instituts für Genetik des Kernforschungszentrums Karlsruhe.

CV1

Nierentumorzellen von Affen, aus der Zellbank des Instituts für Genetik des Kernforschungszentrums Karlsruhe.

Hela

Menschliche Cervix-Karzinoma-Zelle, aus der Zellbank des Instituts für Genetik des Kernforschungszentrums Karlsruhe.

2.1.3. Kulturmedien:**Bakterien-Selektionsmedium**

N-Broth (1% N-Broth, 0,5% Hefeextrakt)) mit 100µg/ml Ampicillin

Selektivagar

1,5% Bacto-Agar, 1% Bactotrypton, 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 100 µg/ml Ampicillin

Standard-Kulturmedium für eukaryontische Zellen

Dulbeccos Modified Essential Medium (DMEM) mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium für T47D und HC11

RPMI mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 5 µg/ml Insulin.

2.1.4. Antikörper

anti CTF

gerichtet gegen Peptid 4 von CTF1 (CHLNPQDPLKDLVSLACD), erhalten von Nick Mermood, Lausanne.

anti c-fos

Kaninchenserum gegen β-Gal-cFos-Fusionsprotein (Aminosäuren 150-293 aus cFos), gekauft bei Medac, Hamburg.

anti c-jun

Kaninchenserum gegen Aminosäuren 47-59 von cJun, erhalten von Peter Angel und Allen Darling.

2.1.5. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden auf einem Gene Assembler der Firma Pharmacia synthetisiert oder von der Firma Biomol, Berlin bezogen. Die Einzelstränge wurden über Gelelektrophorese gereinigt, zu Doppelsträngen hybridisiert und nochmals über NACS Säulen gereinigt.

In der hier vorliegenden Darstellung sind zusammengehörende, komplementäre Einzelstränge ohne Zeilenabstand angegeben, fortlaufende Einzelstränge mit Zeilenabstand. Anfang und Ende der Herkunftssequenz sind durch kleine Schrägstriche abgehoben, bei den zusätzlichen Basen handelt es sich um Linkersequenzen. Basenaustausche im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypsequenzen sind durch Konturschrift markiert. Die MMTV Sequenzen wurden nach Fasel et al. (1982) abgeleitet.

F1b, MMTV-LTR, -786/-753

AGCT`TAGGTCGATTATTAGTCACTATGTTAAGAAATG`
`ATCCAGGTAATAATCAGTGATACAATTCTTTAC`CTAG

F1a, MMTV-LTR, -769/-742

`ACTATGTTAAGAAAATGAATCATTATCTTT`
`TGATACAATTCTTTTACTTAGTAATAGAAA`

F1am, MMTV-LTR, -769/-742, mit zwei Basenaustauschen

`ACTATGTTAAGAAAATTAATAATTATCTTT`
`TGATACAATTCTTTTAAATTAATTAATAGAAA`

Coll, menschliches Kollagenase Gen, -72/-65 (Angel et al., 1987a)

AGCTTG`TGAGTCAG`CCG
AC`ACTCAGTC`GGCCTAG`

F2, MMTV-LTR, -909/-880

GATC`CTTCCTCTTGGGGCAAGGACCACAGCCA`A
`GAAGGAGAACCCCGTTCCTGGTGTGCGGT`TTCGA

F2m, MMTV-LTR, -902/-872, mit drei Basenaustauschen

`CTTGGGGCAAGCAAAACAGCCAACTTCCTC`
`GAACCCCGTTCGTTTGTGCGGTTGAAGGAG`

F3, MMTV-LTR, -1046/-1018

AGCTT`CAAACCTGGCATAGCTCTGCTTTGCCTG
A`GTTTGAACCGTATCGAGACGAAACGGACC`TAG

F3m, MMTV-LTR, -1046/-1020, mit drei Basenaustauschen

`CAAACCTAAGATAGCTCTGCTTTGCCT`
`GTTTGAATTCTATCGAGACGAAACGGA`

MMTV-NF1, MMTV-LTR, -78/-59

AGC`TTTTGGAATCTATCCAAGTC`G
AAACCTTAGATAGGTTTCAG`CCTAG`

F4, MMTV-LTR, -945/-917

AGCT`TGCAAGATTACAATCTAAACGATTCTGGAG`
`ACGTTCTAATGTTAGATTGCTAAGCCTC`CTAG

F4m1, MMTV-LTR, -950/--921, mit drei Basenaustauschen

`TTCTGTGCAA**A**ATTAC**CC**TCTAAACGATTC`
`AAGACACGTT**T**TAATG**GG**GAGATTGCTAAG`

F4m2, MMTV-LTR, -950/--921, mit fünf Basenaustauschen

`TTCTGTGCAC**CC**ATTAC**CC**ACTAAACGATTC`
`AAGACACGT**GG**TAATG**GG**TGATTGCTAAG`

F5, MMTV-LTR, -924/-902

AGCTT`ATTCGGAGA**ACT**CGACCTTCCTC`G
A`TAAGCCTCTTGAGCTGGAAGGAG`CCTAG

F11, MMTV-LTR, - 1076/-1051

AGCTT`ATCAGACAAAGACATACTCATTCTCT`G
A`TAGTCTGTTTCTGTATGAGTAAGAGA`CCTAG

F11m, MMTV-LTR, -1082/-1053, mit sechs Basenaustauschen (BstE II Schnittstelle)

`GAGCCCATCAG**GGTT**ACC**CC**CATACTCATTCT`
`CTCGGGTAGT**CCCA**AT**GG**GTATGAGTAAGA`

F12, MMTV-LTR, -1017/-991

AGCTT`GGCTATTGGGGGAAGTTGCGGTTTCGTG`
A`CCGATAACCC**CC**TTCAACGCCAAGCAC`CTAG

F12m, MMTV-LTR, -1017/-991, mit zwei Basenaustauschen

AGCTTGGCTATTGGG**TT**AAGTTGCGGTTTCGTG
ACCGATAACCC**AA**TTCAACGCCAAGCACCTAG

F13, WAP Gen der Maus (Lubon et al. 1987), -117/-92

AGCTT`TGGCCAAGAAGGAAGTGTTGTAGCCC`G
A`ACCGGTTCTTCCTTCACAACATCGGG`CCTAG

F14, Lactalbumin Gen der Ratte (Quasba et al. 1984), -134/-108

AGCTT`CAGGATGGAGGGAAGTTGGCAGGCTCG`
A`GTCCTACCTCCCTTCAACCGTCCGAGC`CTAG

OVEC (Westin et al. 1987)

CGTCCCGTCGACGACGAATGTGAACGAAAAGTGTGTTGACACAAATGAACGTT
AGGGGGTTTTGTCTGTCTTACCACGTAGACAGGTCACTCC

1212 Universal-Sequenzierungsprimer (Messing et al. 1981)

CAGCACTGACCCTTTTG

CAT Primer, Chloramphenicolacetyltransferase Gen +188/+208 (Alton et al. 1979)

AGGAGCTAAGGAAGCTAAAA

K7 MMTV-LTR, -1056/-991

AGCT`TCTCTGCTGCAAAGTGGCATAGCTCTGCTTTGCCTAGGGCTATTGGG
`AGAGACGACGTTTGAACCGTATCGAGACGAAACGGATCCCGATAACCC

GGAAGTTGCGGTTTCGT`G
CCTTCAACGCCAAGCA`CCTAG

K6 MMTV-LTR, -1075/-978

G`ATCTATCAGACAAAGACATACTCATTCTCTGCTGCAAAGTGGCATAGCTC
`TAGATAGTCTGTTTCTGTATGAGTAAGAGACGACGTTTGAACCGTATCGAG

TGCTTTGCCTAGGGCTATTGGGGGAAGTTGCGGTTTCGTGCTCGCAGGGCT`A
ACGAAACGGATCCCGATAACCCCTTCAACGCCAAGCACGAGCGTCCCGA`TCTAG

2.2. Methoden

2.2.1. Behandlung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure wurde in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Das Verhältnis E_{260} zu E_{280} sollte etwa 1:1,8 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

$$E_{260} \times 50 = \mu\text{g/ml DNA}$$

$$E_{260} \times 40 = \mu\text{g/ml RNA}$$

$$E_{260} \times 24 = \mu\text{g/ml Oligonukleotide}$$

Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäurelösung von Proteinen wurde mit Wasser auf mindestens 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1xTNE gesättigt, 1xTNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wieder gut geschüttelt. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren wieder getrennt. Die Oberphase wurde abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol auf die gleiche Weise extrahiert.

Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die Nukleinsäure Lösung wurde in einem geeigneten Volumen mit NaAcetat, pH 4,8 zu einer Endkonzentration von 0,3 molar versetzt. Bei kleineren Fragmenten wurde 1 μg tRNA als Fällungshilfe zugegeben. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol wurde 30 min bei -80°C oder 2 Stunden bei -20°C gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde der Niederschlag mit 80% Ethanol gewaschen.

Bei der Präparation großer Mengen Plasmid DNA wurde die Ethanolfällung durch eine Isopropanolfällung ersetzt. Zur wässrigen Nukleinsäurelösung wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und der Niederschlag sofort abzentrifugiert.

2.2.2. DNA Präparation

Plasmid DNA Präparation

200 ml einer über Nacht inkubierten Bakterien Suspension wurden 10 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 10 ml Puffer 1 (100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und anschließend 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml 2,55 M KAc, pH 4,8 hinzugefügt und sofort für 30 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0, 15% Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-tip-500 Säule gegeben. Nach Durchfluß dieses Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0) gewaschen und die Plasmid DNA mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8,2) eluiert.

Minipräparation von Plasmid DNA

Die Bakterien wurden in 2 ml Nährmedium mit 100µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1 ml dieser Bakterienkultur wurden 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100 µl LysozymbLösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 7,8, 25 mM Tris pH 8, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurde zunächst weitere 5 min auf Eis inkubiert und weitere 30 min nach Zugabe von 150 µl 3 M NaAcetat. Anschließend wurde 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand in neue Röhrchen überführt und die DNA mit Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde in 200 µl 50 mM Tris pH8, 3M NaAcetat resuspendiert und die DNA erneut mit Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser aufgenommen.

2.2.3. Klonierungstechniken

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

1 µg DNA wurde in dem von der Firma mitgelieferten Puffer mit 2 Enzymeinheiten des entsprechenden Restriktionsenzym 2h inkubiert. Bei mit RNA verunreinigter Plasmid DNA aus Minipräparationen wurden der Reaktion 0,5 µg/ml RNase A zugesetzt. Die Reaktion wurde mit 4x Glycerin-Probenpuffer (1x: 10mM EDTA pH 8, 10% Glycerin, 0,1 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau) abgestoppt.

Dephosphorilierung von DNA

Die DNA wurde mit einer Enzymeinheit alkalischer Phosphatase in einem Endvolumen von 100 µl 1x CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin) 1h inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine weitere Stunde bei 68°C inkubiert, anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion.

Phosphorilierung von Oligonukleotiden und Linkern

Etwa 1 µg Oligonukleotide oder Linker wurden mit 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl) in einem Endvolumen von 10 µl 1xLinker-Kinase-Puffer (66mM Tris pH 7,6, 10mM MgCl₂, 15 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 200 µg/ml BSA) versetzt. Die Reaktion wurde nach einer Stunde bei 37°C durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt.

Auffüllen von 5' Überhängen

Die DNA wurde mit 5 Enzymeinheiten DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) und 2 µl 2mM dNTP-Mix (2mM dATP, 2mM dCTP, 2 mM dTTP, 2mM dGTP) in einem Endvolumen von 20 µl 1x Polymerasepuffer (500 mM Tris pH 7,2, 100 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 500 µg/ml BSA) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Phenolextraktion abgestoppt.

Bal 31 Exonuklease Verdau

25 µg geschnittene und gereinigte Plasmid DNA wurden in 300 µl Bal 31 Puffer (12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 1mM EDTA) mit 6 Einheiten Bal31 bei 37°C inkubiert. In 30 sec Abständen, beginnend nach 30 sec Inkubationszeit, wurden dem Reaktionsgemisch je 75 µl entnommen und mit EGTA zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt. Die DNA Fragmente wurden anschließend durch eine Phenol/Chloroform Extraktion und nachfolgende Ethanol-fällung gereinigt.

Ligation von Restriktionsfragmenten

Die zu ligierenden DNA Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis, mit fünf- bis zehnfachem Überschuß des zu inserierenden Fragmentes mit 2 Einheiten T4 DNA Ligase in einem Endvolumen von 50 µl Ligationspuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 5 mM ATP) über Nacht bei 15°C inkubiert.

Ligation von Linker DNA an Restriktionsfragmente

5 µl eines Linker Kinasierungsansatzes wurden zu 1-10 µg geschnittener Vektor DNA gegeben und mit zwei Einheiten T4 DNA Ligase in einem Endvolumen von 20 µl Linker-Ligationspuffer (0,7 mM ATP, 7 mM MgCl₂, 70 mM Tris pH 7,5) bei 15°C über Nacht

inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 10 min Erhitzen auf 68°C inaktiviert. Die Linkerketten wurden durch das entsprechende Restriktionsenzym "getrimmt". Hierzu wurde die Reaktionslösung auf das fünffache Volumen und mit konzentriertem Enzym-Reaktionspuffer auf den notwendigen Salzgehalt gebracht. Die Reaktion erfolgte mit einem Überschuß des Restriktionsenzym 2h bei 37°C.

Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Ho et al., 1989)

100 ng eines Restriktionsfragmentes, das den zu mutierenden Bereich enthielt wurde in zwei Ansätzen mit 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und 200 µM dNTPs (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP) in einem Endvolumen von 100 µl Taq-Inkubationspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatin) mit 1 µM Konzentration folgender Primer inkubiert:

Ansatz 1 enthielt den CAT-Primer und das zum unteren Strang der zu mutierenden Sequenz komplementäre mutierte Oligonukleotid. Ansatz 2 enthielt den Universal Sequenzierungsprimer und das zum oberen Strang der zu mutierenden Sequenz komplementäre, mutierte Oligonukleotid.

Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und in einem Thermocycler (Fröbel, Lindau) dreißigmal einem Zyklus von folgenden Temperaturen ausgesetzt: 2 min 94°C, 3min 45°C und 3 min 72°C. Danach wurde die Reaktionsphase auf einem 2% Agarose Gel aufgetrennt und die gewünschten amplifizierten DNA Fragmente isoliert. Die Produkte aus Reaktion 1 und 2 wurden zusammen wie oben beschrieben einer weiteren Amplifikation ausgesetzt. Als Primer wurden nur noch CAT-Primer und Universal Sequenzierungsprimer zugesetzt, im mutierten Bereich konnte ein Produkt dem anderen als Primer dienen. Das Reaktionsprodukt wurde wiederum über ein Agarose Gel gereinigt und anschließend mit Restriktionsenzymen passend zur Klonierung in einen Vektor geschnitten. Nach der Klonierung wurde die Basensequenz mit Hilfe einer Sequenzierung nach Sanger überprüft.

Transformation von Bakterien

Eine Kolonie E.coli DH5α wurde in 10 ml SOC-Medium (0,5% Hefeextrakt, 2% Bactotrypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 50 ml SOC-Medium wurden mit 500 µl der Übernacht-Kultur angeimpft und in einem 200 ml Kolben solange geschüttelt bis die E₅₅₀ etwa 0,4 betrug (nach ca. zwei Stunden). Viermal 10 ml dieser Bakteriensuspension wurden für 10 min bei 2500 Upm und 4°C abzentrifugiert, der Niederschlag in je 3,3 ml TFB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 3 mM HAcOCl₃, 10 mM K-MES pH 6,3, 15% Glycerin) aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Niederschlag in 800 µl TFB aufgenommen und 28 µl DMSO zugegeben. Die DMSO Zugabe wurde nach 5 min Inkubation auf Eis wiederholt. Die

Bakterien wurden nun direkt transformiert oder in Portionen von 600 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zu 200 µl kompetenten Bakterien wurden 5-10 µl Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid DNA gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C und mindestens 60 sec auf Eis wurde 1ml SOC-Medium zugegeben und der Ansatz 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei Raumtemperatur für 10 min bei 2500 Upm abzentrifugiert und der Niederschlag in 200 µl SOC resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Präparation von Plasmid DNA wurde jeweils eine Kolonie mit einem Glasstab gepickt und Selektionsmedium damit angeimpft.

2.2.4. Elektrophoretisch Auftrennung von Nukleinsäuren

Auftrennung auf Agarosegelen

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente, wurden 0,8-2% Agarose in 50 ml TBE (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Der Gellösung wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt, bevor sie in Plastikschaalen der Größe 8,5x 12 x 0,5 cm gegossen wurde. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen für die aufzutragen Proben ausgespart. Nach dem Aushärten und Entfernen des Kammes wurde das Gel über zwei Elektrodenkammern gelegt und mit Wasser befeuchtet. Die Verbindung zum Elektrodenpuffer (1x TBE) wurde mit angefeuchteten Papiertüchern hergestellt. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V.

Auftrennung auf Acrylamidgelen

30 ml einer 6-10% Acrylamidlösung in 1x TBE (aus 30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung, 10xTBE und Wasser) wurde mit 200 µl 10% Ammoniumperoxydisulfatlösung und 15 µl TEMED versetzt. Diese Lösung wurde zwischen zwei durch 1 mm dicke Abstandshalter getrennte und durch Klebeband abgedichtete 14x15 cm Glasplatten gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt. Nach der Polymerisierung wurden Klebeband und Kamm entfernt und das Gel senkrecht in einer Gelapparatur fixiert. Der Spalt zwischen Kammer und Glasplatte wurde mit 1% Agarose abgedichtet und die Pufferkammern mit 1x TBE aufgefüllt. Die Auftrennung der Proben erfolgte über 1h bei 100 V. Danach wurde die obere Glasplatte entfernt und das Gel für 10 min in 200 ml TBE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Banden wurden unter UV sichtbar gemacht.

Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen

Die Proben wurden in Sanger Probenpuffer (20 mM EDTA, 99% deionisiertes Formamid, 0,03% Xylencyanol, 0,03% Bromphenolblau) aufgenommen, 3 min gekocht, auf Eis abgekühlt und unverzüglich auf ein Gel aufgetragen, das folgendermaßen vorbereitet war:

40 ml einer 6, 8, 12 oder 20% Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30:0,8) mit 8,3 M Harnstoff in 1xTBE (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) wurden nach Zugabe von 30 µl TEMED und 300 µl einer 10% Ammoniumperoxydisulfat Lösung zwischen zwei Glasplatten von 20x40 cm Größe mit 0,4 mm Abstandshaltern gegossen. Die Abdichtung erfolgte durch Klebeband, beide Glasplatten waren mit Dimethyldichlorsilan beschichtet. Nach einem Vorlauf von 30 min wurden die Proben in die 0,4 cm breiten Taschen aufgetragen und bei 1000 V über 1,5-4 h aufgetrennt. Danach wurde die obere Glasplatte entfernt und das Gel auf ein Whatman Papier entsprechender Größe abgezogen, getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert. 20% Gele dieser Dicke wurden feucht auf der Glasplatte exponiert.

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wurden 1mm dicke 20% Gele mit 2 cm breiten Taschen benutzt. Sie wurden anschließend in TBE mit 20 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt.

2.2.5. Extraktion von DNA Fragmenten aus Gelen

Bei Agarose Gelen wurde die gewünschte Bande unter UV lokalisiert und mit dem Skalpell ein Schnitt direkt unter der Bande eingeführt. In diesen Schnitt wurde ein Stück DEAE-Membran geschoben. Die Elektrophorese wurde solange fortgesetzt bis sich die Bande vollständig in der Membran befand. Anschließend wurde die DNA mit 500 µl DEAE-Elutions-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA, 1M NaCl) für 30 min bei 65°C aus der Membran eluiert und nach einer Phenolextraktion mit Ethanol ausgefällt.

Bei Acrylamidgelen wurde die gewünschte Bande unter UV ausgeschnitten, die DNA in 500 µl 0,2M NaCl über Nacht bei 50°C eluiert und mit Ethanol ausgefällt.

2.2.6. Sequenzierung von DNA

Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977)

Plasmid DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit dem "T7-Sequense-Kit" der Firma USB, Cleveland, Ohio, entsprechend dem mitgelieferten Protokoll sequenziert. 3µg Plasmid DNA wurden in einem Volumen von 20 µl in Anwesenheit von 0,2 mM EDTA, 0,2 M NaOH denaturiert, mit 2 µl 3M NH₄Acetat neutralisiert und mit 60 µl

Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde gewaschen und getrocknet. Nach Zugabe von 1 µl Universal-Primer (0,5 pmol/ml), 2 µl Sequenase Puffer (200 mM Tris pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) und 7 µl Wasser wurde die Mischung für 2 min auf 65°C erhitzt und langsam, innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung in Anwesenheit von α-³⁵S-dATP erfolgte die eigentliche Kettenabbruchreaktion mit den vier dideoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Sanger-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7,8, 99% Formamid, 0,03% Xylencyanol, 0,03% Bromphenolblau) und 3 min Kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Acrylamid/8,3 M Harnstoff Gel aufgetrennt.

Sequenzierung von DNA Fragmenten durch basenspezifische Spaltung (Maxam und Gilbert 1980)

Etwa 20 pMol eines einseitig markierten DNA Fragmentes wurden zunächst folgendermaßen chemisch modifiziert:

G-Reaktion: Die DNA wurde in 200 µl G-Reaktionspuffer (50 mM NaCacodylat pH 8, 1 mM EDTA) mit 1 ml DMS für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl G-Stopplösung (1,5 M NaAcetat pH 7, 1 M β-Mercaptoethanol, 100 µg/ml tRNA) und Ethanol fällung wurde die Reaktion beendet.

C/T-Reaktion: Die DNA wurde in 20 µl Wasser mit 30 ml Hydrazin versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Hydrazin-Stopplösung (0,3 M NaAcetat pH 7, 0,1 mM EDTA, 25 µg/ml tRNA) und Ethanol fällung wurde die Reaktion beendet.

Die ausgefällten DNA-Proben wurden in 250 µl 0,3 M NaAcetat pH 7 resuspendiert und erneut mit Ethanol ausgefällt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben in 100 µl 1 M Piperidin aufgenommen und 30 min auf 90°C erhitzt (Piperidinspaltung). Anschließend wurden 200 µl 0,3 M NaAcetat zugegeben und die DNA mit Ethanol ausgefällt. Die Proben wurden in Sanger Probenpuffer aufgenommen und auf denaturierende Acrylamid/Harnstoff Gele aufgetragen.

2.2.7. Aufreinigung von Oligonukleotiden

Soweit die Oligonukleotide auf einem Gene Assembler der Firma Pharmacia synthetisiert waren, wurden sie aus der Kasette durch 16h Inkubation bei 50°C mit konzentriertem Ammoniak herausgelöst und anschließend eingetrocknet. Wie die käuflich erworbenen Oligonukleotide, die von der Firma Biomol, Berlin bezogen wurden, wurden sie anschließend in Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt. 250 µg wurden

eingetrocknet und in 60 µl Formamid Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7,8, 99 % Formamid, 0,03% Xylenyanol, 0,03% Bromphenolblau) resuspendiert. Die Reinigung erfolgte über ein 20% Acrylamid/ 8,3 M Harnstoff Gel für 3h bei 1000V mit 1xTBE als Laufpuffer. Nach 10 min Anfärben in 1xTBE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid wurde unter UV die Oligonukleotid Bande ausgeschnitten, die dem vollständig synthetisierten Produkt entsprach. Das Acrylamid wurde zerkleinert und mit 1 ml Wasser über Nacht eluiert. Die Oligonukleotidlösung wurde über Glaswolle abfiltriert und die Konzentration bestimmt. Zur Hybridisierung komplementärer Einzelstränge wurden gleiche Mengen zusammengegeben und mit 4M NH₄Acetat auf eine Endkonzentration von 0,25 M eingestellt. Eine Nacs-Prepac Säule wurde mit 4M NH₄Acetat gewaschen und mit 0,25 NH₄Acetat äquilibriert. Die Oligonukleotide wurden auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen mit 0,25 NH₄Acetat wurde mit 400 µl 4M NH₄Acetat eluiert. Das nun doppelsträngige Oligonukleotid wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dazu war es notwendig das zunächst zähe Pellet immer wieder in Wasser aufzunehmen.

2.2.8. Markierung von DNA mit Radionukliden

Kinasierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Etwa 2 pmol Oligonukleotid wurden mit 5 µl γ-³²P-ATP und 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/ml) in einem Endvolumen von 20 µl Kinasepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) versetzt. Die Reaktion erfolgte 1 h bei 37°C. Die Probe wurde dann mit 0,2 M NaCl in 1xTE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) auf 100 µl aufgefüllt. Eine Nacs-Prepac Säule wurde dreimal mit 1 ml 1 M NaCl in 1x TE gewaschen und fünfmal mit 1 ml 0,2 M NaCl in 1x TE äquilibriert. Nach Aufladen der Probe wurde fünfmal mit je 1 ml 0,2 M NaCl in 1x TE gewaschen und die kinasierte Probe mit 300 µl 1 M NaCl in 1xTE eluiert. Zur Fällung wurden 5 µg tRNA und 0,25 M NaAcetat zugegeben.

Einseitige Markierung von Oligonukleotiden

10 ng eines einzelsträngigen Oligonukleotids wurden wie oben für die Doppelstränge beschrieben kinasiert und aufgereinigt. Vor der Fällung wurden 10 ng des komplementären Einzelstranges zugegeben. Die gefällte und getrockneten Einzelstränge wurden in 50 µl Hybridisierungspuffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 30 mM NaCl) aufgenommen, für 3 min auf 68°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Auffüllen von 5'Überhängen mit α -³²P-dNTPs

Etwa 20 ng Oligonukleotid wurden in einem Endvolumen von 20 μ l 1x Polymerasepuffer (7 mM Tris pH 7,5, 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) mit 5 μ l der geeigneten α -³²P-dNTPs und 2 μ l einer 2 mM Lösung der restlichen dNTPs 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde anschließend wie oben beschrieben über eine Nacs-Prepac Säule gereinigt.

Einseitige Markierung von DNA Fragmenten für die DNase I Protektionsanalyse

Für die DNase I Protektionsanalyse wurden DNA Fragmente von 200-400 bp Länge einseitig markiert. Zu diesem Zweck wurden 10 μ g des den fraglichen Abschnitt enthaltenden Vektors auf der einen Seite des gewünschten Fragmentes mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten. Die entstehenden überhängenden Enden wurden durch Auffüllen mit Nukleotiden radioaktiv markiert und durch Phenolextraktion und Gelfiltration über Sephadex-G-50 gereinigt. Für die Gelfiltration wurden kleine Säulchen mit Sephadex-G-50 in 1xTE bepackt, mit 20 μ g Lachs-Spermien-DNA gesättigt, gewaschen und die Probe in 100 μ l 1xTE aufgetragen. Die markierte Probe wurde in einem Volumen von 100 μ l aufgefangen und anschließend mit Ethanol ausgefällt. Die DNA wurde in Wasser resuspendiert und mit einem Restriktionsenzym das auf der anderen Seite des gewünschten Fragmentes schnitt, inkubiert. Der Verdauansatz wurde auf einem 2% Agarose Gel aufgetrennt, das fragliche Fragment durch Exposition auf Röntgenfilm auf dem Gel lokalisiert und über DEAE Membran aus dem Gel isoliert.

2.2.9. Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 95% relativer Feuchte inkubiert. Vor Erreichung der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst und mit geringerer Dichte wieder ausgesät (Passagieren). Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und anschließend 1 ml 0,25% Trypsinlösung mit 2mM EDTA zugegeben. Nach 30 sec Einwirkzeit wurde die Trypsinlösung wieder abgesaugt. Die Zellen wurden nach 1-10 min zusätzlicher Einwirkzeit in 6 ml Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert und der Niederschlag in kaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) zu 1x10⁶ Zellen pro ml aufgenommen. Je 1 ml wurde in Einfriereröhrchen abgefüllt und 30 min auf Eis

gestellt. Nach 12 h bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurde das Einfrierröhrchen in einem 37°C Wasserbad erwärmt und die Zellsuspension in eine Kulturschale mit 10 ml warmem Medium gegeben. Nach dem Anhaften der Zellen wurde das Medium gewechselt.

Bei GR, HC11 und NIH-3T3 Zellen wurden nach Überschreitung von 25 Passagen die in Kultur befindlichen Zellen verworfen und eine in früherer Passage eingefrorene Portion Zellen aufgetaut

2.2.10. Transfektion von eukaryontischen Zellen

DEAE- Dextran Methode (Kawai und Nishizawa, 1984)

HeLa Zellen und T47D Zellen wurden mit 1×10^6 Zellen pro 9 cm Petrischale 24 h vor der Transfektion angesetzt. Für die Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml 1xTBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,4, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,6 mM Na_2HPO_4) gewaschen. Danach wurde 1 ml DNA-DEAE-Dextran Mischung (10 μg DNA, 500 mg/ml DEAE-Dextran in 1xTBS) auf die Zellen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur dort belassen. Alle 5 min wurden die Kulturschalen geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml 1xTBS gewaschen und 8 ml frisches Medium zugegeben. Nach 36 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 2,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) gewaschen und durch Abschaben geerntet.

Calciumphosphat Methode (Graham und van der Eb, 1973)

GR, NIH-3T3, HC11, HepG2, CV1, RAC-10-P, MCF7 und NMuMG Zellen wurden mit 1×10^6 Zellen pro 9 cm Petrischale 24 h vor der Transfektion angesetzt. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Für die Herstellung des Präzipitates wurde zu 10 μg DNA in 475 μl 1xHBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM D-Glucose, 21 mM HEPES, pH 7,1) tropfenweise 25 μl 2,5 M CaCl_2 zugegeben. Das Präzipitat wurde 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen und dann zu 8 ml Medium einer Kulturschale zugegeben. Nach 6 bis 8 h Inkubation des Präzipitates mit den Zellen im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und für 2 min 15% Glycerin in PBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 2,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) gewaschen und 8 ml frisches Medium zugegeben. Bei transienten Transfektionen wurden die Zellen nach 36 h zweimal mit PBS gewaschen und durch Abschaben geerntet.

Induktion der Genexpression durch Hormone

Nach der Glycerinbehandlung der mit Calciumphosphat transfizierten Zellen oder direkt nach der DEAE Transfektion wurde dem Medium 1×10^{-7} M Dexamethason zugesetzt.

Selektion von stabil transfizierten Klonen

Zusätzlich zu 10 µg der gewünschten Reporter DNA wurden 2 µg des Plasmids pSV2neo (Southern et al., 1982) mittransfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen nicht geerntet sondern trypsiniert, auf 3 neue Kulturschalen verteilt und mit Selektionmedium (mit 800 µg G418 pro ml Medium) für etwa zwei Wochen im Brutschrank inkubiert. Alle paar Tage wurde das Medium gewechselt um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Die entstehenden Zellklone wurden, nachdem sie sichtbar waren, trypsiniert und zusammen weiterkultiviert.

2.2.11. RNA Präparation

Für jeden Probenpunkt wurden 5 konfluente 15 cm Kulturschalen verwendet. Jede Kulturschale wurde zweimal mit 20 ml eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen. Die Zellen eines Probenpunktes wurden in insgesamt 10 ml eiskaltem STE (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA pH 7,8) abgeschabt und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 300 mg/ml ProteinaseK und 0,5% SDS wurden die Zellen 30 sek mit einem Ultrathurax bei 50% Leistung homogenisiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 45 min. Der Mischung wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugesetzt und etwa 100 mg Oligo-dT-VII-Cellulose in 1 ml HSB (0,3 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA pH 7,8, 0,1% SDS) zugegeben. Durch Mischen auf einer Rotationsapparatur über Nacht wurde die polyA⁺-RNA an die Oligo-dT-Cellulose adsorbiert. Das Adsorptionsmaterial wurde 4 min bei 2500 Upm zentrifugiert und dreimal mit 10 ml HSB gewaschen. Anschließend wurde die RNA mit dreimal 1ml sterilem Wasser eluiert und das Adsorptionsmaterial zwischendurch immer wieder abzentrifugiert. Die 3 ml RNA-Lösung wurden vereinigt und zur vollständigen Abtrennung des Adsorptionsmaterials nochmals zentrifugiert. 300 µl der Lösung wurden für eine Konzentrationsbestimmung abgenommen. Zu den restlichen 2,7 ml wurden in einem 15 ml Greiner-Röhrchen 10 µg tRNA gegeben und die RNA mit Ethanol ausgefällt.

Das Oligo-dT-VII wurde durch zweimaliges Waschen mit 10 ml 0,1 M NaOH, 5 mM EDTA pH 7,8, fünfmaliges Waschen mit Wasser und zweimaliges Waschen mit HSB regeneriert.

2.2.12. S1 Analyse von RNA

10 µg poly-A⁺ RNA wurden zusammen mit einer endmarkierten DNA-Probe (kinasiertes OVEC Oligo) einer Ethanol-fällung unterzogen und in 10 µl S1-Hybridisierungspuffer (80% Formamid, 400 mM NaCl, 40 mM Pipes pH 6,4, 5 mM EDTA) aufgenommen. Nach 10 min Denaturierung bei 80°C wurden die Proben direkt in ein 45°C Wasserbad überführt und über Nacht hybridisiert. Anschließend wurden die Ansätze 40 min bei 30°C mit 60 Einheiten S1-Nuklease, 2 µg Lachsspermien-DNA in 100 µl S1-Reaktionspuffer (250 mM NaCl, 30 mM NaAcetat, 5 mM ZnSO₄) einem Einzelstrangverdau unterzogen. Die Lösung wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA-RNA Hybride nach Zugabe von 2 µg tRNA mit Ethanol ausgefällt. Das Sediment wurde in 5 µl Sangerprobenpuffer aufgenommen und auf ein 12% Acrylamid/Harnstoff Gel aufgetragen.

2.2.13. Präparation von Proteinextrakten

Extraktpräparation für Enzymtests

Die transfizierten Zellen einer 9 cm Kulturschale wurden zweimal mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde bei 10000 Upm abzentrifugiert und das Sediment in 100 µl 250 mM Tris pH 7,8 resuspendiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch dreimaliges Schockgefrieren und Wiederauftauen im Ethanol/Trockeneisbad und im 37°C Wasserbad für jeweils 10 min. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 10000 Upm abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei -80°C aufbewahrt.

Präparation von Kernextrakten für DNA Bindungs-Analysen

Die Zellen von zehn 15 cm Kulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 10 ml PBS abgeschabt und bei 3000 Upm für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml Lösung IV (0,3 M Sucrose, 400 mM NaCl, 1,5 mM Mg₂Cl, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 5% Glycerol) resuspendiert und nach Zugabe von 20 ml NP40 in einem Glashomogenisator lysiert. Die Kerne wurden bei 8500 Upm für 10 min abzentrifugiert und zweimal mit Lösung IV gewaschen. Zum Aufbrechen wurden die Kerne daraufhin in 1 ml Lösung II resuspendiert und 30 min bei 4°C geschüttelt. Nach 1h Zentrifugation bei 50000 Upm wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und 5 h gegen 500 ml Lösung III (20 mM HEPES pH 7,9, 0,1 mM EDTA, 75 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 20% Glycerol) dialysiert. Der Dialysepuffer wurde nach 1h ausgetauscht. Ausgefällene Proteine wurden bei 8500 Upm abzentrifugiert, der Überstand in Portionen von 30 µl schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Den Lösungen II, III und IV wurden vor Gebrauch folgende

Proteaseinhibitoren zugesetzt: 1 µg/ml Pepstatin (Stock 1 mg/ml in Methanol), 1 mM PMSF (Stock 100 mM in Ethanol), 0,5 µg/ml Leupeptin (Stock 5 mg/ml in Wasser), 1 µg/ml Aprotinin (Stock 5 mg/ml in Wasser) und 50 µg/ml Antipain (Stock 5 mg/ml in Wasser).

2.2.14. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Für die Erstellung einer Eichkurve wurden 5-80 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit Lowry-Reagenz I (2% Na₂CO₃, 0,1 M NaOH) auf 500 µl aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden 1-10 µl auf 500 µl Lowry-Reagenz I verwendet. Nach Zugabe von 1 ml Lowry-Reagenz IV (1 ml 2% NaK Tartrat, 1 ml 1% CuSO₄ auf 100 ml Lowry-Reagenz I) wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden unter sofortigem Mischen 100 µl 50% Folin-Lösung zugegeben. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 300 µl der Proben in Mikrotiterplatten gegeben und die Extinktion bei 600 nm gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt.

2.2.15. Enzymtests

β-Galaktosidase Aktivitätstest

20 µl Proteinextrakt wurden mit 500 µl Puffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-Mercaptoethanol) und 100 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml o-Nitrophenol-β-D-Galaktosid in 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄) 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 µl 1 M Na₂CO₃ beendet. Jeweils 300 µl eines Ansatzes wurden in Mikrotiterplatten umgefüllt und die Extinktion bei 420 nm gegen einen Leerwert ohne Proteinextrakt gemessen.

Die β-Galaktosidase-Aktivität in Enzymeinheiten pro ml Extrakt und Stunde Umsetzung errechnet sich nach folgender Formel:

$$E_{420} \times 100 / n \text{ ml Proteinextrakt} \times n \text{ h}$$

Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Aktivitätstest

Eine Menge an Proteinextrakt, die derselben Proteinmenge oder derselben β-Galaktosidaseaktivität entsprach wurde zu 1,25 µl ¹⁴C-Chloramphenicol gegeben und die Ansätze mit 250 mM Tris pH 7,8 auf 180 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 4 mM Acetyl-Coenzym A (in 250 mM Tris pH 7,8) gestartet und nach 2h bei 37°C durch Zugabe und Untermischen von 1ml Ethylacetat abgestoppt. Die Phasen wurden

durch 3 min Zentrifugieren bei 10000 Upm getrennt und die Oberphase in neue Röhrchen überführt. Das Ethylacetat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und das ¹⁴C haltige Sediment in 20 µl Ethylacetat resuspendiert und punktweise auf eine Kieselgel-Dünnschicht-Chromatographie-Folie aufgetragen. Als Laufmittel für die anschließende Chromatographie wurden 150 ml Chloroform/Methanol (9:1) verwendet. Wenn die Laufmittelfront den oberen Rand der Folie erreicht hatte, wurden die Dünnschichtfolien aus der Laufkammer genommen, 10 min an der Luft getrocknet und über Nacht bei Raumtemperatur auf Röntgenfilm exponiert.

Zur Bestimmung des umgesetzten Anteils an Chloramphenicol wurden die acetylierte und die nicht acetylierte Form auf der Dünnschichtfolie mit Hilfe des Röntgenfilms lokalisiert und ausgeschnitten. Mit 5 ml Quickszint wurde die Aktivität der Folienstücke im Szintillationszähler für 1 min gemessen und der Umsatz als Anteil der acetylierten Formen an der Gesamtmenge an Chloramphenicol in % dargestellt. Die spezifische Aktivität in nmol Umsatz pro Stunde und mg eingesetzten Protein errechnet sich nach folgender Formel:

$$4,26 \text{ nmol} \times \text{Anteil in \%} / 100 \times n \text{ mg Protein}$$

In Experimenten, bei denen zusätzlich zu einem CAT-Expressionsplasmid ein β -Galaktosidase Plasmid als interner Standard cotransfiziert war (2 µg auf 10 µg CAT-Expressionsplasmid), wurde für die Bestimmung der CAT-Aktivität eine Proteinmenge eingesetzt, die einer bestimmten β -Galaktosidase Aktivität entsprach. Die CAT-Aktivität wurde in diesen Fällen als Umsatz in nmol pro Stunde Inkubationszeit und pro 1000 Einheiten β -Galaktosidase Aktivität ausgedrückt.

2.2.16. Proteinbindung an DNA

DNase 1 Protektionsanalyse

20000 cpm eines einseitig markierten DNA Fragmentes wurden mit 60-100 µg Kernextrakt in einem Volumen von 100 µl FP-Puffer (20 mM Hepes pH 7,9, 50 mM KCl 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT) 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde MgCl₂ zu einer Endkonzentration von 6 mM und 1 µg/ml Lachs-Spermien-DNA zugegeben. Der DNase Verdau wurde durch Zugabe von 5 µl DNase I (1:10 verdünnt mit Wasser) gestartet und je nach verwendeter Proteinmenge über 1-5 min fortgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA abgestoppt, der Ansatz mit Phenol extrahiert und die verbliebene DNA mit Ethanol ausgefällt. Das Sediment wurde getrocknet und in 10 µl Sanger Probenpuffer resuspendiert. 1500 cpm eines jeden Ansatzes wurden auf einem 8% Acrylamid/Harnstoff Gel aufgetrennt. Parallel wurden Sequenzierungsansätze nach Maxam

und Gilbert desselben Fragmentes aufgetragen, um die Proteinbindungsbereiche lokalisieren zu können.

Gelretardations-Analyse (Barberis et al., 1987)

5 µg Kernextrakt wurden mit 2-10 fMol eines radioaktiv markierten Oligonukleotids (10000-20000 cpm), 1 µg poly (dIdC), einer geeigneten Menge an Kompetitor-DNA (100-200 facher molarer Überschuß) bei Raumtemperatur oder auf Eis für 30 min in 20 ml GRBB (10 mM Hepes pH 7,9, 60 mM KCl, 4% Ficoll, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) inkubiert. Vorangehend fand eine zehnmütige Inkubation des gesamten Ansatzes ohne das markierte Oligonukleotid statt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze direkt auf ein 14x15 cm großes 4% Acrylamid-Gel (30:0,8) in 0,25xTBE aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 0,25xTBE als Laufpuffer bei 100V bis die Bromphenolblau-Bande eines parallel aufgetragenen Farbmärkers 6 cm zurückgelegt hatte. Das Gel wurde daraufhin auf Whatman 3MM Papier getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert.

In den Fällen, bei denen Antikörper dem Inkubationsansatz zugefügt wurden, wurden 1-2 µl Präimmenserum oder Immenserum mit dem Kernextrakt 10 min auf Eis vorinkubiert

Methylierungs Interferenz Analyse

20 ng eines Oligonukleotids wurden einseitig markiert und wie für die G-Sequenzierungsreaktion beschrieben methyliert und gefällt. 20000 cpm dieses Ansatzes wurden zunächst einen normalen Gelretardations-Test unterworfen, um die geeigneten Bedingungen für den anschließenden präparativen Ansatz abzuschätzen..

Für den präparativen Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl GRBB 5 µg poly (dIdC) mit 100000 cpm an markiertem Oligonukleotid und soviel Kernextrakt inkubiert, daß nach der Vorabschätzung etwa die Hälfte des Oligonukleotids an Protein gebunden vorlag. Nach der Inkubation wurden die 100 µl Reaktionsansatz auf zwei 1 cm breite Taschen eines 4% Acrylamidgels in 0,25xTBE verteilt und für 1 h einer Elektrophorese bei 100 V unterworfen. Das Gel wurde anschließend feucht auf Röntgenfilm exponiert und mit Hilfe des entwickelten Röntgenfilms die Banden auf dem Gel lokalisiert und ausgeschnitten, die dem ungebundenen und dem an Protein gebundenen Oligonukleotid entsprachen. Die Gelstücke wurden in ein 1% Mini-Agarosegel eingegossen und die radioaktiven Oligonukleotide über DEAE Membran wieder aus dem Gel eluiert und gefällt. Anschließend wurden die Oligonukleotide, wie für die Sequenzierungsreaktionen beschrieben, einer Piperidinspaltung unterzogen, wiederum ausgefällt und in Sanger Probenpuffer resuspendiert. Jeweils 1500 cpm des Ansatzes der ungebundenen und des Ansatzes der gebundenen DNA entsprach wurden auf ein 20% Acrylamid/Harnstoff Gel aufgetragen und solange elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bromphenolblau Bande noch 10 cm vom

unteren Rand entfernt war. Das Gel wurde ohne Trocknung auf der Glasplatte auf Röntgenfilm exponiert.

2.3. Plasmidkonstrukte

2.3.1. Fusionsgene aus MMTV-LTR Sequenzen einschließlich Promotor und dem CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) Gen

pLTR-CAT-1239 (ehemals pLTR-CAT-9): Gesamter MMTV-LTR (-1239/+125) von Virusisolaten aus GR-Mäusen vor dem CAT Gen (Mink et al., 1990)

pLTR-CAT-631 (ehemals pMMTV-CAT): MMTV-LTR von Position -631 bis Position +125 vor dem CAT Gen (Cato et al., 1986)

2.3.2. Fusionsgene aus MMTV-LTR Sequenzen, TK (Herpes simplex, Thymidinkinase) Promotor und CAT Gen

pBI-CAT-8⁺ und pBI-CAT-9⁺: enthalten eine multiple Klonierungsstelle vor dem TK Promotor und dem CAT Gen (Klein-Hitpass et al., 1988), die Orientierung der multiplen Klonierungsstelle ist umgekehrt.

E1 syn (E1/9): Aus dem Plasmid pLTR-CAT-9 wurde ein Hha I/ Rsa I Fragment isoliert, das der Region zwischen Position -1094 und -739 des MMTV LTR entspricht. Die 5' Überhänge wurden aufgefüllt und das Fragment in den Sal I geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pTK-CAT-3 (Cato et al., 1986) kloniert. Das Konstrukt enthielt das MMTV Fragment in reverser (anti) Orientierung (pTK-CAT-E1-rev.). Die Sal I Schnittstelle neben der Hind III Schnittstelle war rekonstituiert worden. Daraufhin wurde das Fragment mit Hind III und Bam HI wieder aus dem Vektor isoliert und in den Hind III und Bam HI geschnittenen Vektor pBI-CAT-9⁺ kloniert. Das resultierende Konstrukt enthielt das MMTV Fragment in direkter (syn) Orientierung.

E1 anti (E1/8): Das MMTV Fragment in E1 syn wurde mit Hind III und Bam HI aus dem Vektor isoliert und in den ebenfalls Hind III und Bam HI geschnittenen Vektor pBI-CAT-8⁺ kloniert.

5' und 3' Deletionen des E1 Fragmentes

EBB1 bis EBB6 syn und anti: Das Konstrukt E1anti wurde mit Bam HI linearisiert und einer Bal31 Behandlung unterworfen. Anschließend wurden die überhängenden Enden aufgefüllt und mit einem Bam HI Linker ligiert. Nach einem Bam HI Verdau wurden die verkürzten MMTV Fragmente mit Hind III abgetrennt und in die HindIII/Bam HI geschnittenen Vektoren pBI-CAT-9⁺ und pBL-CAT-8⁺ kloniert. Die Fragmente liegen im ersten Fall in der syn Orientierung im zweiten Fall in der reversen Orientierung vor. Durch Sequenzierung der Plasmid DNA wurden die 5'Grenzen der MMTV Sequenz in diesen Konstrukten festgestellt.

EBB1: -841

EBB2: -872

EBB3: -894

EBB4: -950

EBB5: -1015

EBB6: -1050

Taq2 syn und anti: Das E1 Fragment wurden mit Hind III und Bam HI aus dem Plasmid E1anti isoliert und mit Taq I geschnitten. Das entstehende 40 bp Fragment wurde isoliert, die Enden aufgefüllt und das Fragment in den Sal I geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pBI-CAT-8⁺ kloniert. Dieses Konstrukt enthielt die syn Orientierung. Daraufhin wurde die Insertion in diesem Konstrukt mit Hind III und Bam HI wieder isoliert und in den Hind III und Bam HI geschnittenen Vektor pBI-CAT-9⁺ kloniert, dieses Konstrukt enthielt die anti Orientierung.

EBH220 syn und anti: Das Konstrukt E1anti wurde mit Hind III linearisiert und einer Bal31 Behandlung unterworfen. Die überhängenden Enden wurden aufgefüllt und mit einem Hind III Linker ligiert. Nach Hind III und Bam HI Verdau wurde das verkürzte DNA Fragment in die Vektoren pBI-CAT-8⁺ und pBI-CAT-9⁺ kloniert und sequenziert. Die 3'Grenze liegt bei -902.

Taq180 syn und anti: Das E1 Fragment wurden mit Hind III und Bam HI aus dem Plasmid E1anti isoliert und mit Taq I geschnitten. Das entstehende 180 bp Fragment wurde isoliert, die Enden aufgefüllt und das Fragment in den Sal I geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pBI-CAT-8⁺ kloniert. Dieses Konstrukt enthielt die anti Orientierung. Daraufhin wurde die Insertion in diesem Konstrukt mit Hind III und Bam HI wieder isoliert und in den Hind III und Bam HI geschnittenen Vektor pBI-CAT-9⁺ kloniert, dieses Konstrukt enthielt die syn Orientierung. Die 3'Grenze der MMTV Sequenz ist durch die Taq I Schnittstelle bei -912 gegeben.

Taq230 syn und anti: Das mit Hind III und Bam HI isolierte E1 Fragment wurde einem partiellen Taq I Verdau unterworfen. Hierzu wurden 2 µg des Fragmentes mit einer Enzymeinheit Taq I für 1h bei 37°C inkubiert. Das entstehende 230 bp

Fragment wurde isoliert, die Enden aufgefüllt und das Fragment in den Sal I geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pBI-CAT-8⁺ kloniert. Dieses Konstrukt enthielt die anti Orientierung. Daraufhin wurde die Insertion in diesem Konstrukt mit Hind III und Bam HI wieder isoliert und in den Hind III und Bam HI geschnittenen Vektor pBI-CAT-9⁺ kloniert, dieses Konstrukt enthielt die syn Orientierung. Die 3'Grenze der MMTV Sequenz ist durch die Taq I Schnittstelle bei -858 gegeben.

EHH syn und anti: Das mit Hind III und Bam HI isolierte E1 Fragment wurde mit Hinf I geschnitten und das entstehende 130 bp Fragment über ein Acrylamidgel isoliert, die Enden aufgefüllt und das Fragment in den Sal I geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pBI-CAT-8⁺ kloniert. Dieses Konstrukt enthielt die anti Orientierung. Daraufhin wurde die Insertion in diesem Konstrukt mit Hind III und Bam HI wieder isoliert und in den Hind III und Bam HI geschnittenen Vektor pBI-CAT-9⁺ kloniert, dieses Konstrukt enthielt die syn Orientierung. Die 3'Grenze der MMTV Sequenz ist durch die Hinf I Schnittstelle bei -968 gegeben.

Subfragmente des E1 Fragmentes

K6 syn und anti: Am Oligonukleotid K6 (Position -1075/-978 des MMTV-LTR) wurden die überhängenden Enden aufgefüllt und kinasiert. Anschließend wurde dieses Fragment in den Sal I geschnittenen, aufgefüllten und dephosphorilierten Vektor pBI-CAT-8⁺ kloniert. Durch Sequenzierung wurde die Orientierung der Insertion festgestellt.

K7 syn und anti: Das Oligonukleotid K7 (Position -1056/-991 des MMTV LTR) wurde kinasiert und in die Hind III und Bam HI geschnittenen Vektoren pBI-CAT-8⁺ und pBI-CAT-9⁺ kloniert. Durch Sequenzierung wurde überprüft ob es sich wirklich um Einfachinsertionen handelte.

Proteinbindungssequenzen aus dem E1 Fragment

F1,F2, F3, F4, F5, F11, F12 syn und anti: Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden kinasiert und in die Hind III und Bam HI geschnittenen Vektoren pBI-CAT-8⁺ und pBI-CAT-9⁺ kloniert. Hierbei entstanden neben Mehrfachinsertionen auch Einfachinsertionen der jeweiligen Oligonukleotide in den Vektor, bei pBI-CAT-8⁺ in syn Orientierung, bei pBI-CAT-9⁺ in anti Orientierung.

F1,F2, F3, F4, F5, F11, F12 multi: Bei den wie oben beschrieben entstandenen Mehrfachinsertionen wurde die Anzahl der inserierten Oligonukleotide durch Sequenzierung festgestellt, jeweils eine Dreifachinsertion ausgewählt und als F1 multi, F2 multi u.s.w. bezeichnet.

Punktmutanten des E1 Fragmentes

Als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Pvu II Fragment aus dem unter Elsyn beschriebenen Plasmid pTK-CAT-E1-rev verwendet. Als Primer wurden in allen Fällen der Universal Sequenzierungsprimer und der CAT Primer in Kombination mit den jeweiligen mutierten Oligonukleotiden verwendet.

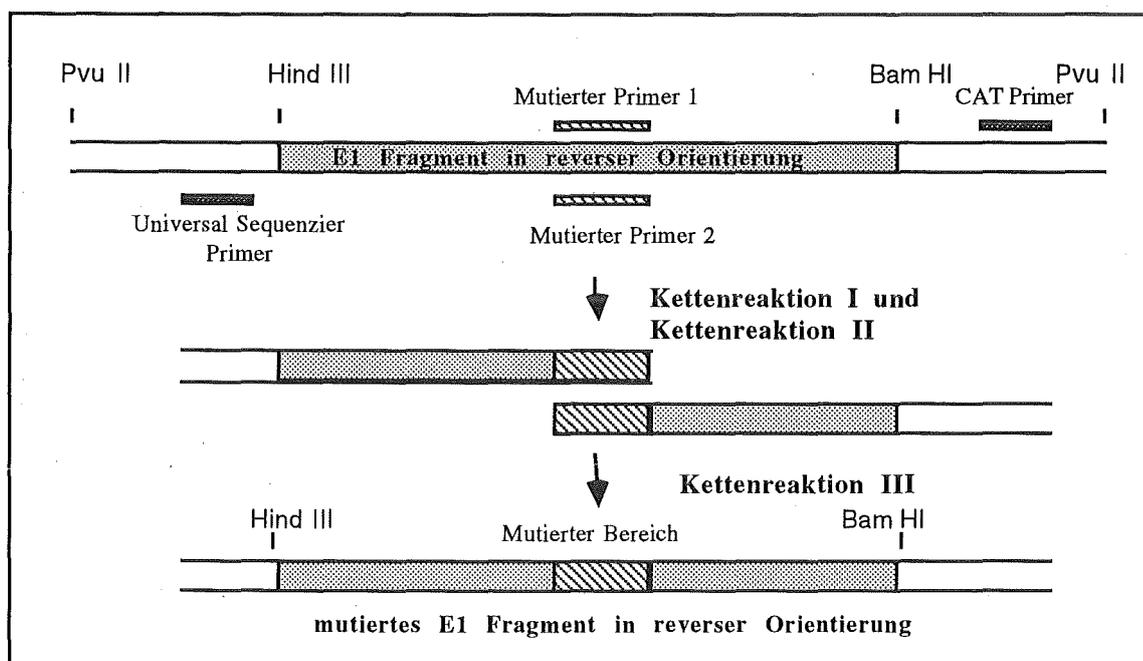


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Mutagenese im Bereich des E1 Fragmentes mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion und mutierten Oligonukleotiden.

E1m- AP1 syn und anti: Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des mutierten Oligonukleotids F1am verwendet. Nach Hind III und Bam HI Verdau, Klonierung in den Vektor pBl-CAT-8⁺ und Sequenzierung zeigte sich, daß beide in diesem Bereich vorhandenen AP1 Bindungsstellen mutiert waren. Das Fragment wurde mit Hind III und Bam HI wieder aus dem Vektor isoliert und umgekehrt (in der direkten Orientierung) in den Vektor pBl-CAT-9⁺ kloniert

E1m-NF1 syn und anti: Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des mutierten Oligonukleotids F3m verwendet. Das entstehende Fragment wurde wie für E1m-AP1 beschrieben kloniert und sequenziert.

E1m-F12 syn und anti: Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des Oligonukleotids F12m verwendet. Das entstehende Fragment wurde wie für E1m-AP1 beschrieben kloniert und sequenziert.

E1m-F4.1 syn und anti: Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des Oligonukleotids F4m1 verwendet. Das entstehende Fragment wurde wie für E1m-AP1 beschrieben kloniert und sequenziert.

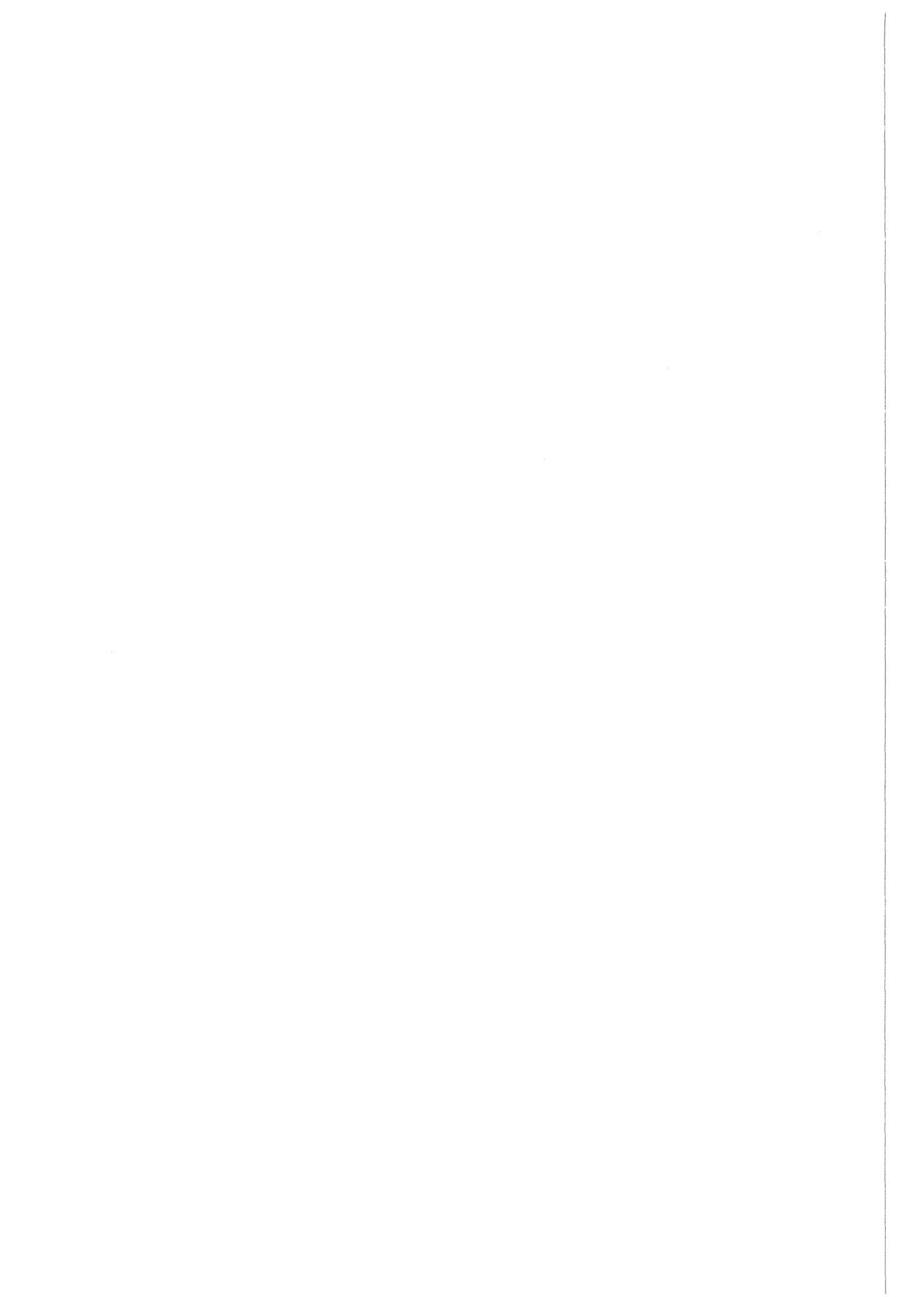
E1m-F4.2 syn und anti: Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des Oligonukleotids F4m2 verwendet. Das entstehende Fragment wurde wie für E1m-AP1 beschrieben kloniert und sequenziert.

E1m-F11 syn und anti: Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des Oligonukleotids F11m verwendet. Das entstehende Fragment wurde wie für E1m-AP1 beschrieben kloniert und sequenziert.

2.3.3. Fusionsgene aus MMTV-LTR Sequenzen, Globin Promotor und Globin Gen

OVEC-1: Dieses Konstrukt enthält den Globin Promotor und das Globin Gen (Westin et al., 1987)

OVEC-E1-syn und anti: Das E1 Fragment wurde aus dem Plasmid E1anti mit Hind III und Bam HI isoliert und die Enden aufgefüllt. Der Vektor OVEC-1 wurde mit SacI linearisiert, nach Auffüllen der Enden dephosphoriliert und mit dem vorbereiteten E1 Fragment ligiert. Die Orientierung des E1 Fragmentes bezüglich des Globin Promotors konnte durch einen Sal I Verdau festgestellt werden. Bei syn Orientierung lag die Sal I Schnittstelle des Vektors direkt neben der Sal I Schnittstelle des E1 Fragmentes, bei anti Orientierung wurde ein 350 bp Fragment herausgeschnitten.



3. Ergebnisse

3.1. Der 5' Bereich des MMTV LTR enthält einen transkriptionellen Aktivator

Um die transkriptionelle Regulation eines Genes zu untersuchen, wird in der Regel die regulatorische Region isoliert und an ein Testgen gekoppelt, dessen Expression dann verfolgt wird. Die Hybridgene können zum Beispiel als Transgene in Mäuse eingebracht werden, wo die gewebespezifische Verteilung des Expressionsmusters verfolgt werden kann. Die einfachere Möglichkeit besteht darin, die Hybridgene in Zelllinien, die sich in Kultur halten lassen, zu transfizieren. Als Testgene verwendet man hier oft für Enzyme codierende Gene, deren Expression sich in einem Zellextrakt durch einen Enzymtest leicht nachweisen läßt. Solche Enzyme sind die β -Galaktosidase oder die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT). Statt des von dem Testgen codierten Proteins kann aber auch direkt die spezifische mRNA nachgewiesen werden. Insbesondere für die Eingrenzung von regulatorischen Elementen, für die in der Regel viele Mutanten auf ihre Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung getestet werden müssen, ist es günstiger mit transienten Transfektionsexperimenten in Zellkultur arbeiten zu können. Für die Eingrenzung von Elementen, die eine gewebespezifische Regulation vermitteln, ist dafür aber Voraussetzung, daß das gewebespezifisch exprimierte Gen auch in Zelllinien, die aus verschiedenen Geweben isoliert wurden, noch ein zelltypspezifisches Expressionsmuster zeigt.

Für den MMTV LTR war bekannt, daß er fähig ist, die Expression von an ihn gekoppelten Genen in transgenen Mäusen auf die Milchdrüse zu beschränken und daß der 5' Bereich der LTR Region an der gewebespezifischen Verteilung dieser Expression beteiligt ist (Stewart et al., 1988). Auch in transienten Transfektionsexperimenten ist der MMTV LTR fähig, einem an ihn gekoppelten Testgen eine höhere Expression in Mammatumorzellen als in Fibroblasten zu vermitteln (Mink et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Beteiligung des 5' Bereiches des MMTV LTR an der mammaspezifischen Expression, die aus Experimenten mit transgenen Mäusen bekannt war, im vorhandenen Zellkultursystem bestätigt werden. Dies war die Voraussetzung dafür, ein für diese Regulation verantwortliches Element einzugrenzen.

3.1.1. Der 5' Bereich des MMTV LTR enthält einen zelltypspezifischen Aktivator, der Einfluß auf die Hormoninduzierbarkeit des MMTV LTR hat

Um die Bedeutung des 5' Bereiches des MMTV LTR für die zelltypspezifische Expression zu untersuchen wurden zwei Hybridgene, die das bakterielle Chloramphenicol Acetyltransferase Gen unter Kontrolle des MMTV Promotors und unterschiedlicher Anteile des MMTV LTR enthielten, transient in die Zelllinien GR und NIH-3T3 transfiziert. Das Konstrukt pLTR-CAT-1239 enthält den gesamten MMTV LTR von Position -1239 bis Position +125, dem Konstrukt pLTR-CAT-631 fehlt der 5' Bereich zwischen Position -1239 und Position -631, dessen Bedeutung für die zelltypspezifische Regulation untersucht werden sollte. Die Zelllinie GR entstammt Mammatumoren aus GR Mäusen, bei NIH-3T3 Zellen handelt es sich um embryonale Fibroblasten der Maus. Zur Abgleichung der Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase Expressionsplasmid mittransfiziert, bei dem die Expression der β -Galaktosidase unter Kontrolle des SV40 Promotors steht. In Abbildung 2B ist das Ergebnis mehrerer solcher Experimente anhand von Säulendiagrammen dargestellt. Die durch das gesamte MMTV LTR vermittelte CAT Aktivität ist in der Mammatumorzelllinie GR etwa dreimal höher als in der Fibroblasten Zelllinie NIH-3T3. Es wurde also bestätigt, daß der MMTV LTR auch in Zellkultur eine zelltypspezifische Expression vermitteln kann.

Ein Konstrukt, in dem der 5' Bereich des MMTV LTR bis Position -631 deletiert ist (pLTR-CAT-631), vermittelt eine geringere CAT Aktivität in den GR Zellen als der gesamte LTR Bereich. Der 5' Anteil des LTR enthält also tatsächlich ein die Transkription positiv regulierendes Element, das spezifisch in den Mammatumorzellen aktiv ist.

Um zu überprüfen, inwieweit dieses Element mit dem im 3' Bereich des LTR lokalisierten hormonresponsiven Element wechselwirkt, wurden parallele Transfektionsansätze mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason behandelt. In Abbildung 2C ist das Ergebnis mehrerer solcher Transfektionsexperimente anhand von Säulendiagrammen dargestellt. In GR Zellen ist bei vorhandenem 5' Bereich (p-LTR-CAT-1239) eine zweimal höhere Hormoninduktion möglich als bei deletiertem 5' Bereich (p-LTR-CAT-631). In NIH-3T3 Zellen hat die Deletion weder Einfluß auf die Basalexpression noch auf die Hormonantwort. Das im 5' Bereich lokalisierte positiv regulierende Element scheint also nicht nur zelltypspezifisch die Basalexpression zu beeinflussen, sondern auch zelltypspezifisch die durch das HRE vermittelte Hormonantwort zu verstärken.

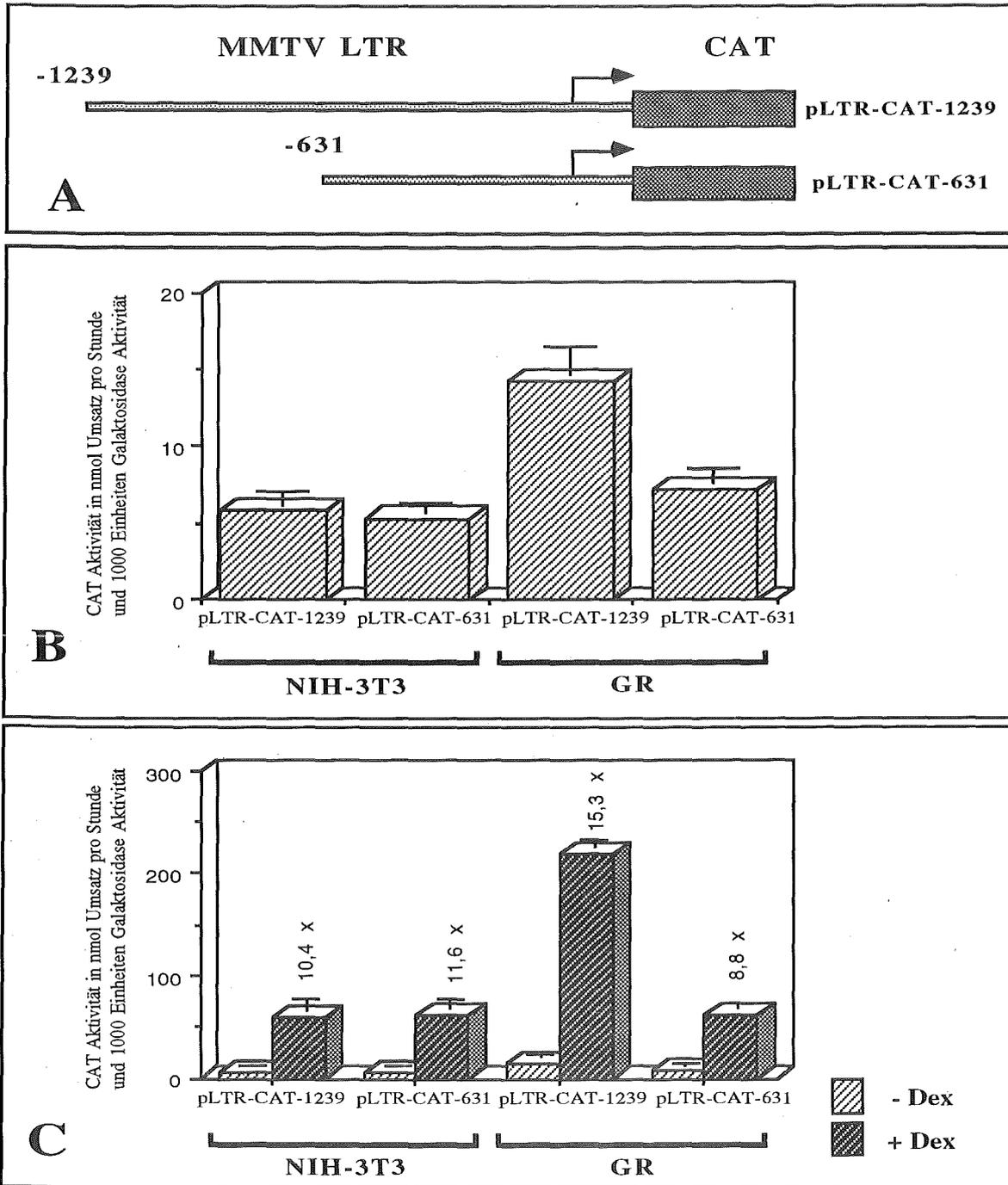


Abbildung 2: Zelltypspezifische und hormonabhängige Expression von MMTV-LTR-CAT Konstrukten
A: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. pLTR-CAT-1239 enthält das CAT Gen unter Kontrolle des gesamten MMTV LTR (Position -1239 bis +125), pLTR-CAT-631 enthält den MMTV LTR von Position -631 bis +125. **B:** CAT Aktivität in nMol pro Stunde und 1000 Einheiten β -Galaktosidase Aktivität. Die in A dargestellten Konstrukte wurden zusammen mit dem Plasmid pCH110 (Pharmacia) in GR Zellen oder in NIH-3T3 Zellen transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Proteinextrakt zunächst die β -Galaktosidase Aktivität gemessen. Für den CAT Enzymtest wurden jeweils eine Proteinmenge eingesetzt, die 3-10 Einheiten β -Galaktosidase Aktivität entsprach. Die Daten aus mindestens vier Experimenten wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet **C:** CAT Aktivität in nMol pro Stunde und 1000 Einheiten β -Galaktosidase Aktivität. Die in A dargestellten Konstrukte wurden wie unter B. beschrieben in GR Zellen und in NIH-3T3 Zellen transfiziert aber nach der Transfektion mit 10^{-7} M Dexamethason behandelt oder nicht behandelt.

3.1.2. Der isolierte 5' Bereich aktiviert heterologe Promotoren in zelltypspezifischer und orientierungsabhängiger Weise

Aus den vorgestellten Experimenten ergibt sich, daß im MMTV LTR zwischen Position -1239 und Position -631 ein zelltypspezifischer Aktivator lokalisiert ist. Um das zelltypspezifisch aktivierende Potential dieses Bereiches weiter einzugrenzen und um zu überprüfen, ob es auf andere Promotoren als den MMTV Promotor übertragen werden kann, wurde ein Großteil des 5' Bereiches isoliert (Position -1094/-739) und das entstehende Fragment als E1 bezeichnet.

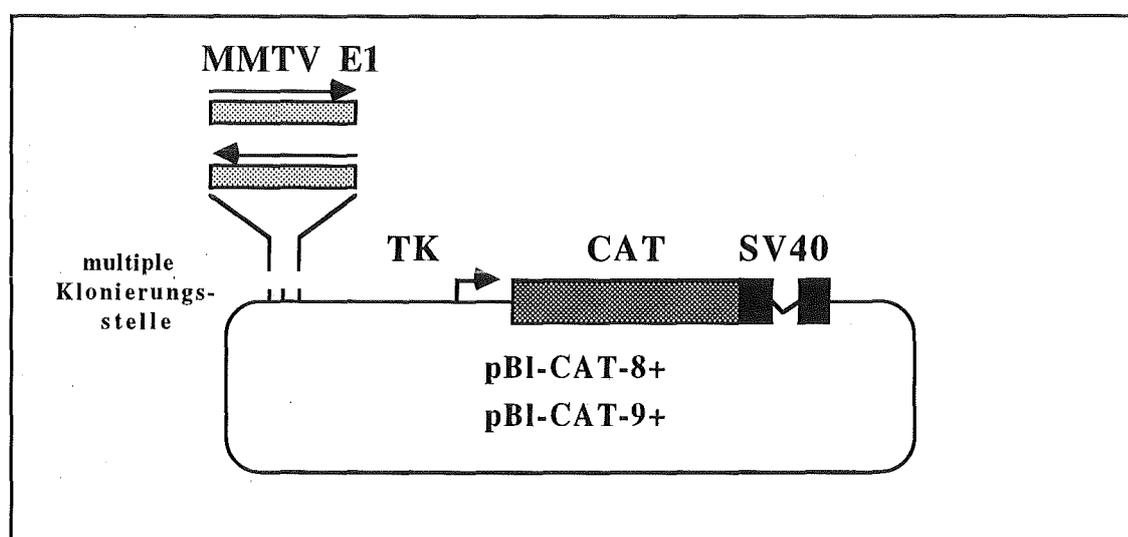


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konstrukte E1 syn und E1 anti. Ein Restriktionsfragment aus dem MMTV LTR, das von Position -1094 bis Position -739 reichte wurde in beiden Orientierungen die multiple Klonierungsstelle von den Konstrukten pBI-CAT-8⁺ und pBI-CAT-9⁺ kloniert, die sich nur in der Orientierung der Klonierungsstelle unterscheiden (Klein-Hitpass et al., 1988). Die vom TK Promotor gesteuerte Expression des in diesen Konstrukten vorhandenen CAT Gens gerät damit unter den Einfluß von regulatorischen Elementen, die in dem MMTV Fragment vorhanden sind. Die Konstrukte enthalten zusätzlich eine Splice Region und eine Polyadenylierungsstelle aus dem Genom des Tumovirus SV40.

E1 wurde in beiden Orientierungen vor den Herpes simplex Thymidin Kinase (TK) Promotor und das CAT Gen kloniert (Abbildung 3). Diese Konstrukte wurden parallel zu dem Vergleichskonstrukt, pBI-CAT-8⁺ (Klein-Hitpass et al., 1988), das nur den TK Promotor und das CAT Gen enthielt, in verschiedene Mammazelllinien und Zelllinien anderen Ursprungs transient transfiziert. Neben den schon beschriebenen Zelllinien GR und NIH-3T3 wurden vier weitere Mammazelllinien und drei Zelllinien aus anderen Geweben getestet. RAC-10-P Zellen entstammen einem murinen Mammatumor, T47D Zellen sind menschliche Mammatumorzellen, C57Bl ist dagegen eine Zelllinie, die von normalem murinen Mammagewebe isoliert wurde. Bei der Zelllinie HC11 handelt es sich um eine Mammazelllinie, die fähig ist in Kultur nach Hormonstimulus Milchproteine zu produzieren (Doppler et al., 1988). In vielen anderen Zelllinien, die aus Mammagewebe isoliert wurden,

wird diese Hormonantwort nur in der Anwesenheit von extrazellulären Matrixkomponenten beobachtet.

Zelltyp		Species	Charakter	Aktivierung	
				E1 syn	E1 anti
Mammazellen	GR	Maus	Adenokarzinom	2,4 +/-0,4	7,0 +/-2,6
	RAC-10-P	Maus	Adenokarzinom	1,8 +/-0,8	7,6 +/-1,8
	C57B1	Maus	"normal"	3,4 +/-1,2	7,1 +/-0,3
	T47D	Mensch	Adenokarzinom	1,7 +/-0,3	6,9 +/-1,5
	HC11	Maus	"laktierend"	12,5 +/-5,4	23,1 +/-6,7
Andere Zellen	NIH-3T3	Maus	Fibroblasten	1,2 +/-0,3	1,9 +/-0,5
	HepG2	Mensch	Hepatom	0,9 +/-0,2	1,5 +/-0,5
	Hela	Mensch	Cervix Karzinom	0,8 +/-0,2	1,5 +/-0,3
	CV1	Affe	Nieren Tumor	0,8 +/-0,2	1,4 +/-0,4

Abbildung 4: Aktivierung des TK Promotors durch das MMTV LTR Fragment E1 (Position -1094 bis -739 des MMTV LTR) in verschiedenen Zelltypen. Die Konstrukte E1syn und E1anti wurden transient in die angegebenen Zelllinien transfiziert. Der CAT Enzymtest wurde mit Zellextrakt gleicher Proteinmenge durchgeführt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der CAT Aktivität des jeweiligen MMTV-TK-CAT Konstruktes zu der CAT Aktivität eines parallel transfizierten TK-CAT Konstruktes ohne Insertion (pBL-CAT-8⁺). Die Werte aus mindestens vier unabhängigen Transfektionen mit mindestens zwei verschiedenen Plasmidpräparationen wurden gemittelt. Die Standardabweichung ist mit +/- angegeben.

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse aus mehreren Transfektionsexperimenten tabellarisch zusammengefasst. Das E1 Fragment hat in syn Orientierung in allen getesteten Mammazelllinien unterschiedlicher Species einen aktivierenden Einfluß auf den TK Promotor. Besonders ausgeprägt ist die Aktivierung mit mehr als zwölfmal in der Zelllinie HC11, was zeigt daß die beschriebene Aktivierung auf einen bestimmten Differenzierungszustand der Mammazelle angewiesen ist, wie auch die Hormoninduktion der Milchproteine. In den anderen getesteten Mammazelllinien liegt das Aktivierungspotential in syn Orientierung nur bei zwei- bis dreifach.

In der reversen Orientierung hat das E1 Fragment jeweils ein stärkeres Aktivierungspotential als in der syn Orientierung. In vier der getesteten Mammazelllinien liegt die Aktivierung des TK Promotors durch das E1 Fragment bei siebenmal, in der Zelllinie HC11 ist bei anti

Orientierung des E1 Fragmentes eine mehr als zwanzigfache Aktivierung des TK Promotors zu beobachten. Diese Orientierungsspezifität der Aktivierung spricht dafür, daß der E1 Aktivator an der Aktivierung von Genen außerhalb des MMTV Genoms beteiligt ist. Solche Elemente werden mit der durch MMTV ausgelösten Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht.

In den vier getesteten Nicht-Mammazelllinien verhält sich das E1 Fragment weitgehend neutral, nur bei anti Orientierung des E1 Fragmentes ist eine schwache Aktivierung von weniger als zweifach zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, daß das E1 Element ausreichend ist, um im verwendeten Zellkultursystem einem heterologen Promotor mammaspezifische Aktivierung zu vermitteln.

Um sicherzustellen, daß die mammaspezifische Aktivierbarkeit durch das E1 Fragment nicht eine Besonderheit des TK Promotors ist, wurde auch der Einfluß des E1 Fragmentes auf den β -Globin Promotor getestet. Das E1 Fragment wurde hierzu in beiden Orientierungen in den Vektor OVEC-1 kloniert (Westin et al., 1987), der das β -Globin Gen und den β -Globin Promotor enthält. Diese Konstrukte wurden zusammen mit dem Referenzkonstrukt OVEC-Ref und parallel zu dem Vektor OVEC-1 in GR und NIH-3T3 Zellen stabil transfiziert. Die Expression des β -Globingens wurde über seine mRNA verfolgt, die im Vergleich zu anderen mRNAs sehr stabil ist (Banerji et al., 1981). Aus den stabilen Transfektanden, die in Massenkultur gehalten wurden, wurde poly-A⁺ RNA isoliert und einer S1 Analyse unterzogen. Hierzu wurde die RNA an das einzelsträngige, radioaktiv markierte OVEC-Oligonukleotid hybridisiert, das über eine Strecke von 75 nt zum β -Globin Transkript komplementär war. Die DNA-RNA Hybride wurden anschließend einem Einzelstrangverdau unterworfen und die verbleibenden Doppelstranganteile auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Autoradiographie wurde das nachzuweisende β -Globin Transkript als markiertes Fragment von 75 nt Länge sichtbar. Außer 18 nt, die komplementär zum Promotorbereich des β -Globingens sind, enthält das 93 nt lange OVEC Oligonukleotid am 3' Ende 5 Nukleotide, die nicht zum β -Globin Promotor komplementär sind (in Abbildung 5 als abgeknickte Linie gekennzeichnet). Ein Transkript, das nicht vom Globin Promotor sondern von einem nicht gewünschten Transkriptionsstart weiter stromaufwärts ausgeht, liefert mit dem Oligonukleotid deshalb ein 88 Nukleotide langes, vor Einzelstrangverdau geschütztes Fragment. Die S1 Analyse hat den Vorteil, daß nur korrekt initiierte Transkripte in die Berechnung der Transkriptionsaktivierung eingehen Dies ist beim Nachweis des exprimierten Proteins, wie etwa beim CAT Enzymtest, nicht mehr nachprüfbar.

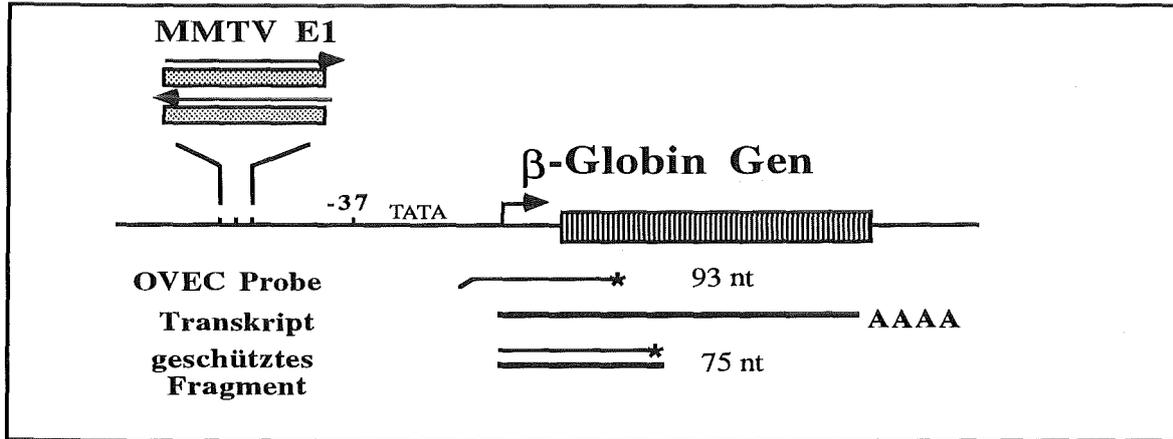


Abbildung 5: Schematische Darstellung der E1-OVEC Konstrukte und der für die S1 Analyse verwendeten Probe. Das als Probe verwendete OVEC Oligonukleotid ist 93 Nukleotide lang und beginnt bei Position -18. Ein korrekt initiiertes Transkript hybridisiert mit dem endmarkierten OVEC Oligonukleotid über eine Länge von 75 Nukleotiden (Westin et al., 1987)

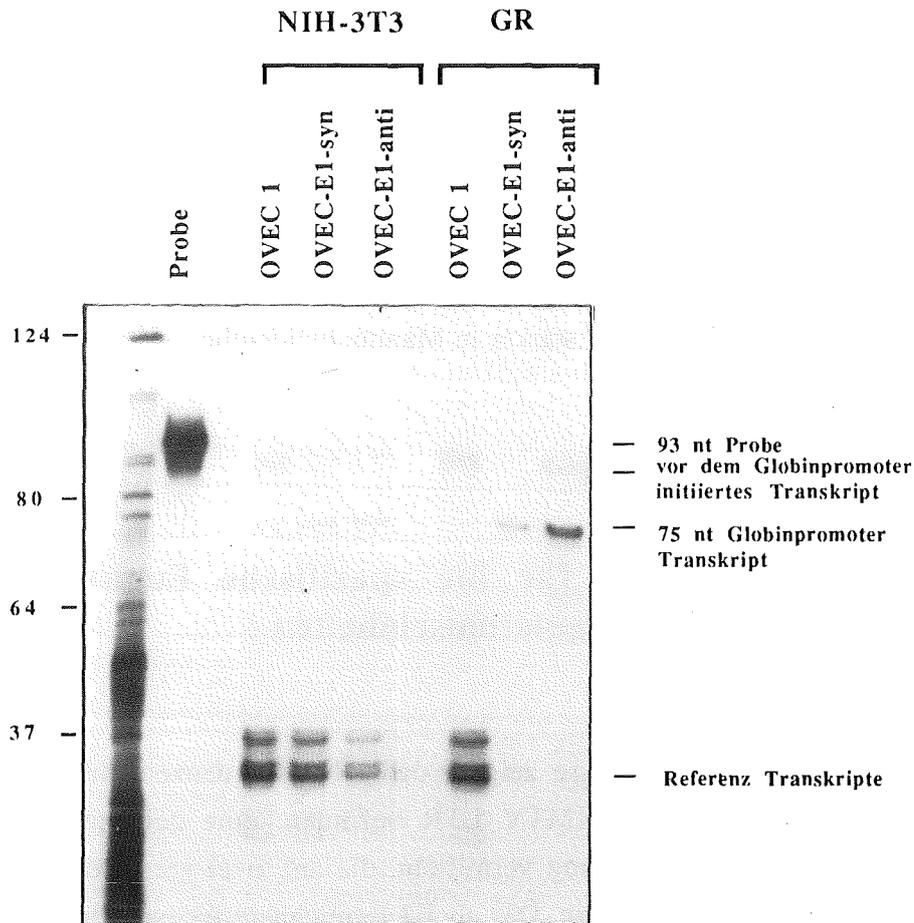


Abbildung 6: Autoradiogramm einer S1 Analyse. NIH-3T3 Zellen und GR Zellen wurden mit 10 µg der angegebenen Plasmide, mit 2 µg des Plasmides OVEC-Ref und mit 2 µg des Konstruktes RSVneo wie im Methodenteil beschrieben stabil transfiziert. Aus Massenkulturen der stabilen Transfektanden wurde polyA⁺ RNA isoliert und jeweils 10 µg für eine S1 Analyse verwendet. Als Probe wurde das einseitig markierte OVEC Oligonukleotid eingesetzt. Ein Fragment von 93 Nukleotiden Länge entspricht der nicht verdauten Probe. 88 Nukleotide entsprechen einem nicht korrekt initiierten Transkript, 75 Nukleotide einem korrekt initiierten Transkript. Kleinere Fragmente entsprechen den Referenztranskripten.

Abbildung 6 zeigt eine typische S1 Analyse mit mRNA aus stabil transfizierten GR und NIH-3T3 Zellen. Die Menge an korrekt initiiertem Transkript verändert sich in NIH-3T3 Zellen wenig, wenn das E1 Fragment vor dem β -Globin Promotor inseriert ist. In GR Zellen hat die Insertion des E1 Fragmentes aber starken aktivierenden Einfluß auf den β -Globin Promotor.

Wie schon beim TK Promotor beobachtet ist die Aktivierung stärker wenn das E1 Fragment in reverser Orientierung inseriert ist. Als interne Kontrolle enthielten die stabilen Transfektanden zusätzlich zum Testkonstrukt das Referenzplasmid OVEC-Ref, das ebenfalls das β -Globin enthält aber zusätzlich den SV40 Enhancer und eine Deletion von 28 Basenpaaren im Bereich des Transkriptionsstarts. Transkripte, die von diesem Referenzkonstrukt ausgehen, werden in der S1 Analyse als mehrere Banden von 30 bis 40 Basenpaaren Länge sichtbar. Gleichet man die korrekt initiierten Transkripte gegen die Referenztranskripte ab, so wird deutlich, daß das E1 Fragment in 3T3 Zellen in reverser Orientierung ebenfalls eine Aktivierung verursacht, die aber mit etwa dreifach deutlich niedriger liegt als die mehr als hundertfache Aktivierung des β -Globin Promotors in GR Zellen.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß der E1 Aktivator nicht nur den MMTV und TK Promotor sondern auch den β -Globin Promotor aktivieren kann. Die Aktivierung ist sehr viel stärker in Mammatumorzellen als in Fibroblasten und zeigt eine Orientierungsspezifität.

3.2. Identifizierung der für die spezifische Funktion des E1 Aktivators benötigten Regulationseinheiten

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß DNA Sequenzen, die sich zwischen Position -1094 und -739 des MMTV LTR befinden, eine zelltypspezifische und orientierungsspezifische Aktivierung vermitteln, die auf zwei verschiedene heterologe Promotoren übertragen werden kann. Das als E1 bezeichnete Aktivatorfragment hat also eine Ausdehnung von etwa 350 bp. Da die Erkennungssequenz für einen Transkriptionsfaktor in der Regel nicht mehr als zwölf bis fünfzehn Basenpaare umfaßt, bietet der E1 Aktivator theoretisch Platz für sehr viele Regulationseinheiten. Zur Dissektierung solcher Regulationseinheiten gibt es mehrere Möglichkeiten. Hierbei können Proteinbindungsstudien von funktionellen Studien unterschieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch eine DNase I Protektionsanalyse zunächst Proteinbindungsregionen im E1 Aktivator sichtbar gemacht (3.2.1.) Obwohl nicht alle in vivo bindenden und an der Regulation beteiligten Proteine durch diese in vitro Analyse sichtbar werden müssen, hat man damit Kandidaten für potentielle regulatorische Regionen lokalisiert. Diese können isoliert werden und ihrerseits für weitere Proteinbindungsstudien benutzt werden, die zum Beispiel der Aufklärung der Zelltypspezifität der Bindung, der genaueren Lokalisierung der Erkennungssequenz oder dem Nachweis einer Verwandtschaft zu einem bekannten Transkriptionsfaktor dienen können. Diese weiterführenden Proteinstudien sind Gegenstand der Kapitel 3.2.3. bis 3.2.7. Da eine Proteinbindung nicht gleichbedeutend mit einer Funktion im mammaspezifischen E1 Aktivator ist, ist diesen Kapiteln eine funktionelle Deletionsanalyse des E1 Aktivators vorangestellt (3.2.2.). Diese bestätigt zunächst, daß der E1 Aktivator tatsächlich aus mehreren Regulationsmodulen aufgebaut ist. Außerdem gibt sie Aufschlüsse über den Beitrag der einzelnen Proteinbindungsregionen zu der Aktivierung und die folgenden, die Proteinbindung betreffenden Kapitel, sind anhand dieser Daten gegliedert.

Mit Hilfe der aus der Proteinbindungsanalyse gewonnenen Daten konnten Punktmutationen in das E1 Fragment eingeführt werden, die die Bindung von einzelnen Proteinen verhindern. Die funktionelle Aktivität dieser Punktmutanten im Vergleich zu einem nicht mutierten E1 Fragment ist in Kapitel 3.2.8. behandelt. Diese Art der funktionellen Analyse gibt Aufschluß über den Beitrag der einzelnen Bindungsstellen zur Gesamtaktivierung.

Der Ergebnisteil wird abgeschlossen durch die funktionelle Analyse der isolierten Proteinbindungsstellen und Kombinationen von Bindungsstellen. Hierdurch sollte ein funktioneller Minimalmodul für die mammaspezifische Aktivierung definiert werden. Bindungsstellen für die aus den vorhergegangenen Analysen klar geworden war, daß sie für die mammaspezifische Aktivierung keine Rolle spielen, wurden in dieser Analyse nicht erfasst.

3.2.1 Mehrere Proteine binden an den Aktivator in vitro

Um mögliche regulatorische Proteine sichtbar zu machen wird in der Regel Kernextrakt mit den in Frage kommenden, radioaktiv markierten DNA Sequenzen inkubiert. Bei der DNase I Protektionsanalyse wird die DNA anschließend mit DNase I verdaut, auf ein Sequenzgel aufgetragen und autoradiographiert. In der Leiter der durch den DNase I Verdau entstandenen DNA Fragmente unterschiedlichster Größe entstehen "Fenster", wenn die DNA durch spezifisch bindende Proteine in bestimmten Bereichen vor einem DNase I Verdau geschützt ist.

Das E1 Fragment wurde einer solchen DNase I Protektionsanalyse unterzogen, wobei entweder der obere Strang oder der untere Strang markiert wurde. In Abbildung 7 sind drei Autoradiographien solcher Analysen gezeigt, bei denen der obere Strang markiert worden war. Parallel sind Sequenzleitern aufgetragen die durch basenspezifische Spaltung nach Maxam und Gilbert (1980) erhalten wurden. So ist eine genaue Lokalisierung der DNase I Schnittstellen möglich. Mit unterschiedlicher Auftrennungsdauer werden durch Proteinbehandlung verschiedene geschützte Regionen sichtbar. Ganz im 5' Bereich um die Position -1070 gibt es drei etwas abgeschwächte Banden, diese Region wurde als F11 bezeichnet. Zwischen Position -1020 und Position -1040 ist ein deutliches Fenster in der DNase I Fragmentleiter sichtbar, das als F3 bezeichnet wurde. Weitere geschützte Bereiche wurden um Position -1040 (F4), Position -925 (F5) und um Position -890 sichtbar (F2). Ein sehr großer geschützter Bereich liegt zwischen Position -815 und Position -764. Er wurde als F1 bezeichnet.

Durch eine DNase I Protektionsanalyse, die mit dem Oligonukleotid K6 (Position -1075 bis Position -978 des MMTV LTR) durchgeführt wurde, konnte eine weitere Proteinbindungsregion lokalisiert werden. Durch die 5' Endmarkierung von Oligonukleotiden, die kein eigenes 5' Phosphat besitzen, kann eine hohe spezifische Aktivität der radioaktiven Probe und dadurch auch eine höhere Sensitivität für den Nachweis einer Proteinbindung erreicht werden. In dem in Abbildung 8 gezeigten Experiment wurde der untere Strang des Oligonukleotids K6 analysiert. An der Position -1003 wird ein zusätzliches durch DNase I Verdau entstandenes Fragment nach Proteinbehandlung sichtbar. Solche DNase I hypersensitiven Stellen können an den Rändern eines DNA bindenden Proteins auftreten. Dieser Proteinbindungsbereich wurde als F12 bezeichnet.

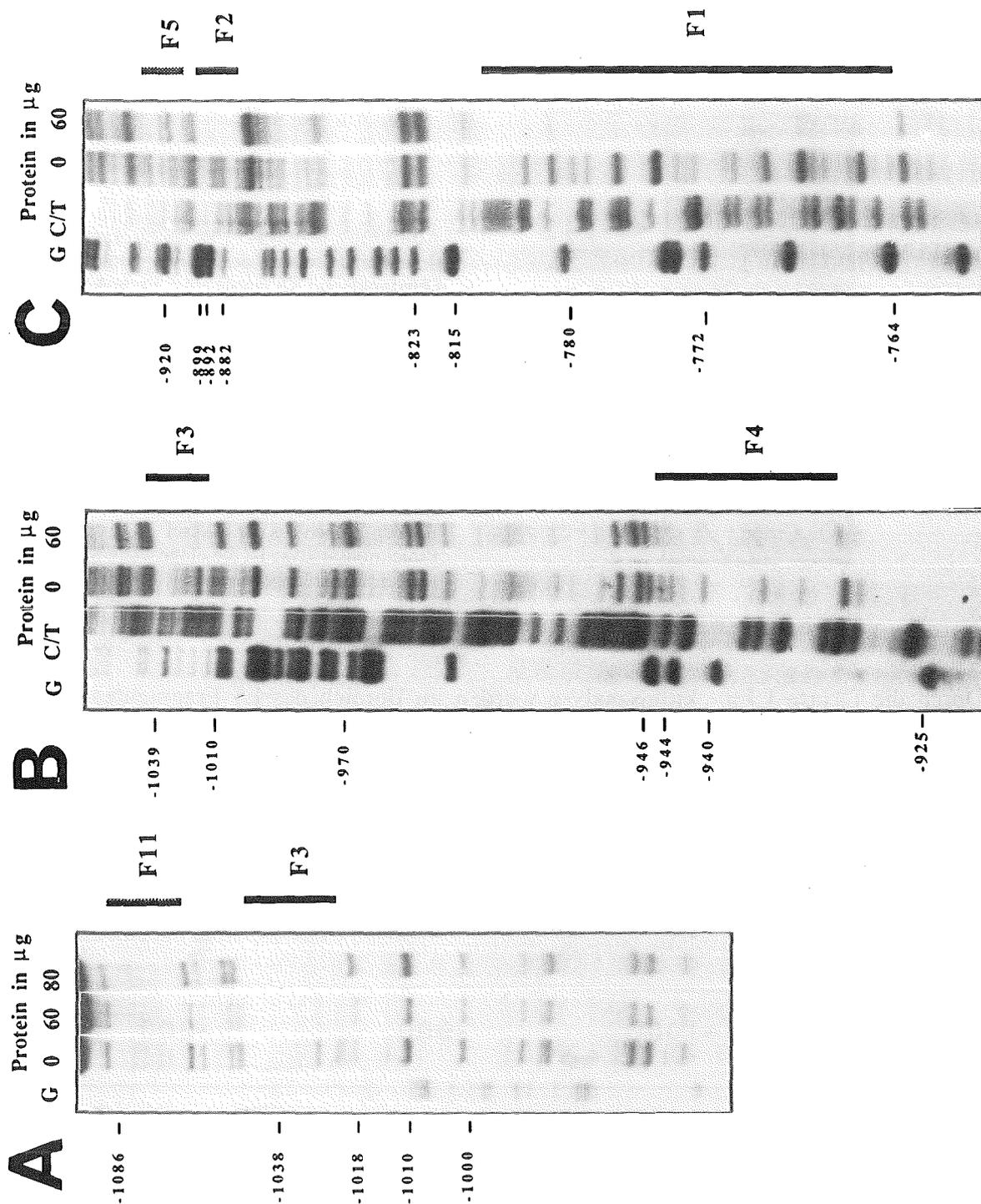


Abbildung 7: DNase I Protektionsanalyse des oberen Stranges des E1 Fragmentes. Das Konstrukt E1syn wurde mit Hind III linearisiert und durch Auffüllen mit radioaktiven Nukleotiden markiert. Nach Bam HI Verdau wurde das E1 Fragment über ein Agarosegel isoliert. Das markierte Fragment wurde mit Kernextrakt aus GR Zellen inkubiert und anschließend einem DNase I Verdau unterzogen. Die DNA wurde gefällt und auf Acrylamid/Harnstoffgele aufgetragen. Von A. nach C. sind die Autoradiographien eines 6%, 8% und eines 12% Gels unterschiedlicher Lauflänge zu sehen. Parallel zu den Proteinbindungsreaktionen wurden Sequenzreaktionen nach Maxam und Gilbert (1980) aufgetragen. Über den einzelnen Spuren ist bei den Sequenzreaktionen die Base angegeben an deren Position chemisch gespalten wurde. Bei den Proben aus der DNase I Protektionsanalyse ist die eingesetzte Menge an Kernextrakt angegeben.

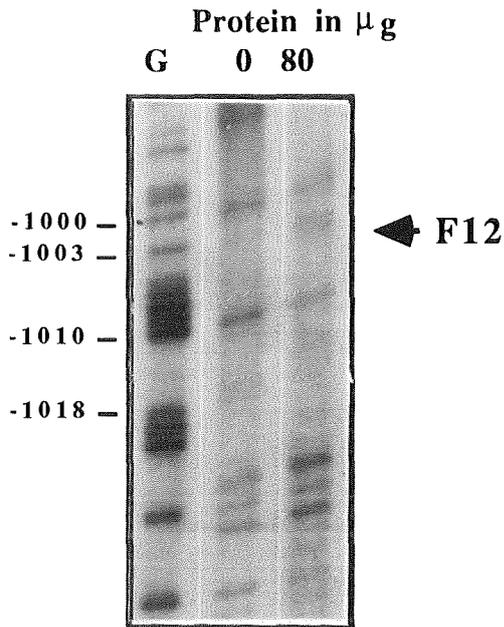


Abbildung 8: DNase I Protektionsanalyse des unteren Stranges des E1 Fragmentes. Das Oligonukleotid K6 wurde am 5' Ende des unteren Stranges radioaktiv markiert. Die DNA wurde mit Kernextrakt aus GR Zellen inkubiert, einem DNase I Verdau unterworfen und auf ein 8% Acrylamid/Harnstoffgel aufgetragen. Parallel wurden Sequenzreaktionen des Oligonukleotids aufgetrennt. Über den einzelnen Spuren ist bei der Sequenzreaktion die Base angegeben an deren Position chemisch gespalten wurde. Bei den Proben aus der DNase I Protektionsanalyse ist die eingesetzte Menge an Kernextrakt angegeben.

Durch die DNase I Protektionsanalyse wurden im Bereich des E1 Fragmentes sieben Proteinbindungsregionen lokalisiert, die in Abbildung 9 rein schematisch und in Abbildung 10 im Zusammenhang mit der DNA Sequenz des E1 Fragmentes dargestellt sind. Die schematische Darstellung wird in den folgenden Kapiteln immer wieder als Orientierungshilfe benutzt.

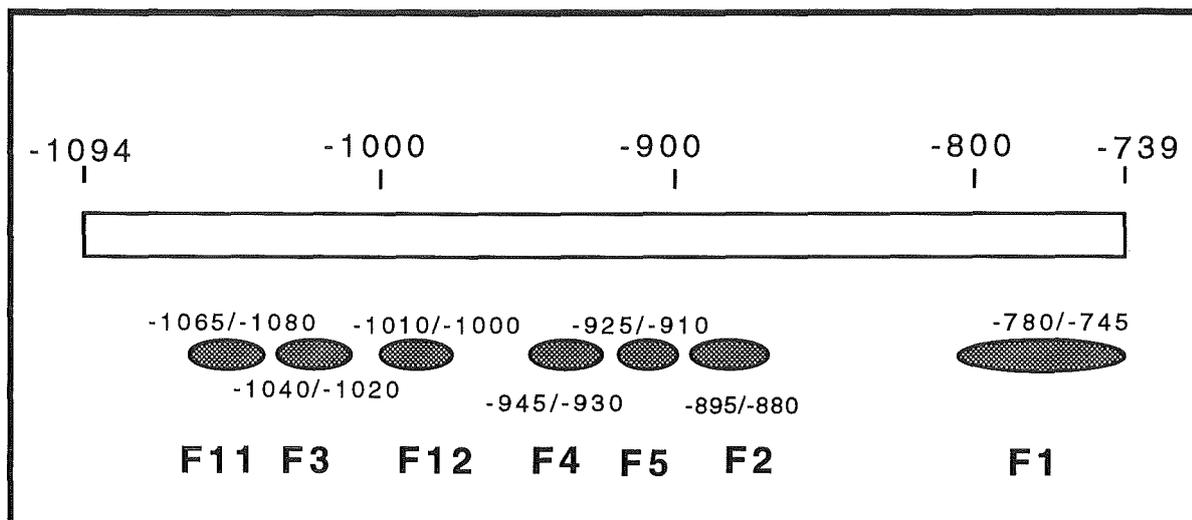


Abbildung 9: Schematische Darstellung der in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Regionen innerhalb des MMTV E1 Fragmentes (Position -1094 bis Position -739). Das DNA Fragment selbst ist als Kasten dargestellt, die geschützten Regionen darunter als Ovale. Die Zahlen geben den ungefähren Bindungsbereich an. Genauere Sequenzdaten können Abbildung 10 entnommen werden.

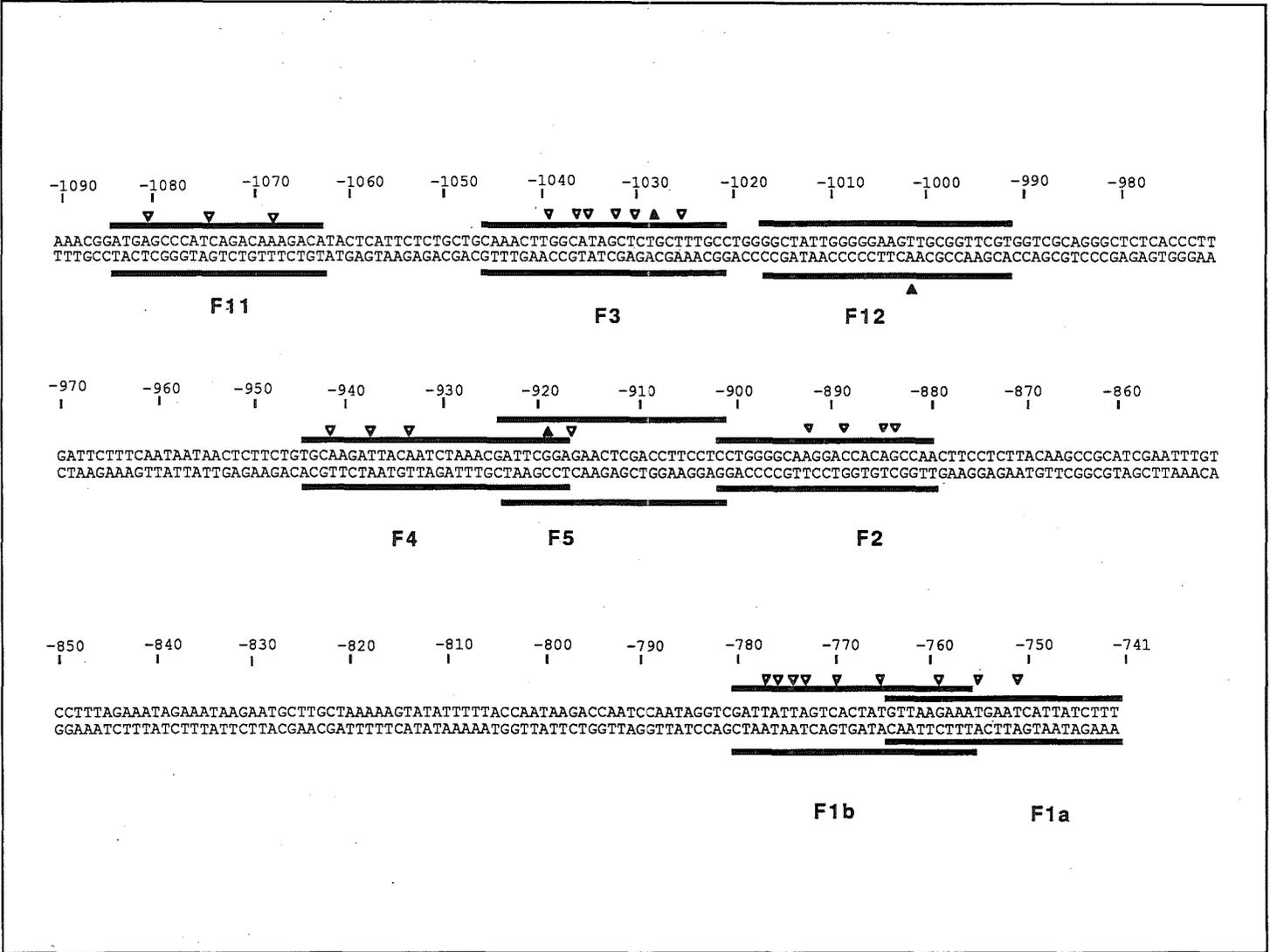


Abbildung 10: Sequenz des E1 Bereiches von Position -1090 bis Position -739. Im 5' Bereich fehlen 4 Basenpaare. Die Sequenz wurde nach Fasel et al. (1982) abgeleitet und durch Sequenzierung der Konstrukte E1syn und E1 anti überprüft. Gegenüber der aus der Literatur entnommenen Sequenz ergaben sich zwei Austausch. An Position -1019 ist A gegen G ausgetauscht, an Position -900 T gegen C. Positionen, die in der DNase I Protektionsanalyse geschützt sind, sind durch helle Dreiecke markiert, hypersensitive Stellen durch schwarze Dreiecke. Die zur Synthese von Oligonukleotiden verwendeten DNA Sequenzen in den jeweiligen Vor DNase I Verdau geschützten Regionen sind durch Balken gekennzeichnet.

3.2.2. Die funktionelle Deletionsanalyse spricht für mehrere beteiligte Regulationseinheiten

Die DNase I Protektionsanalyse macht zwar DNA bindende Proteine sichtbar aber sie läßt keine Aussage über die regulatorische Funktion dieser Proteine zu. Deshalb wurde an die Proteinbindungsanalyse eine funktionelle Analyse des E1 Fragmentes angeschlossen.

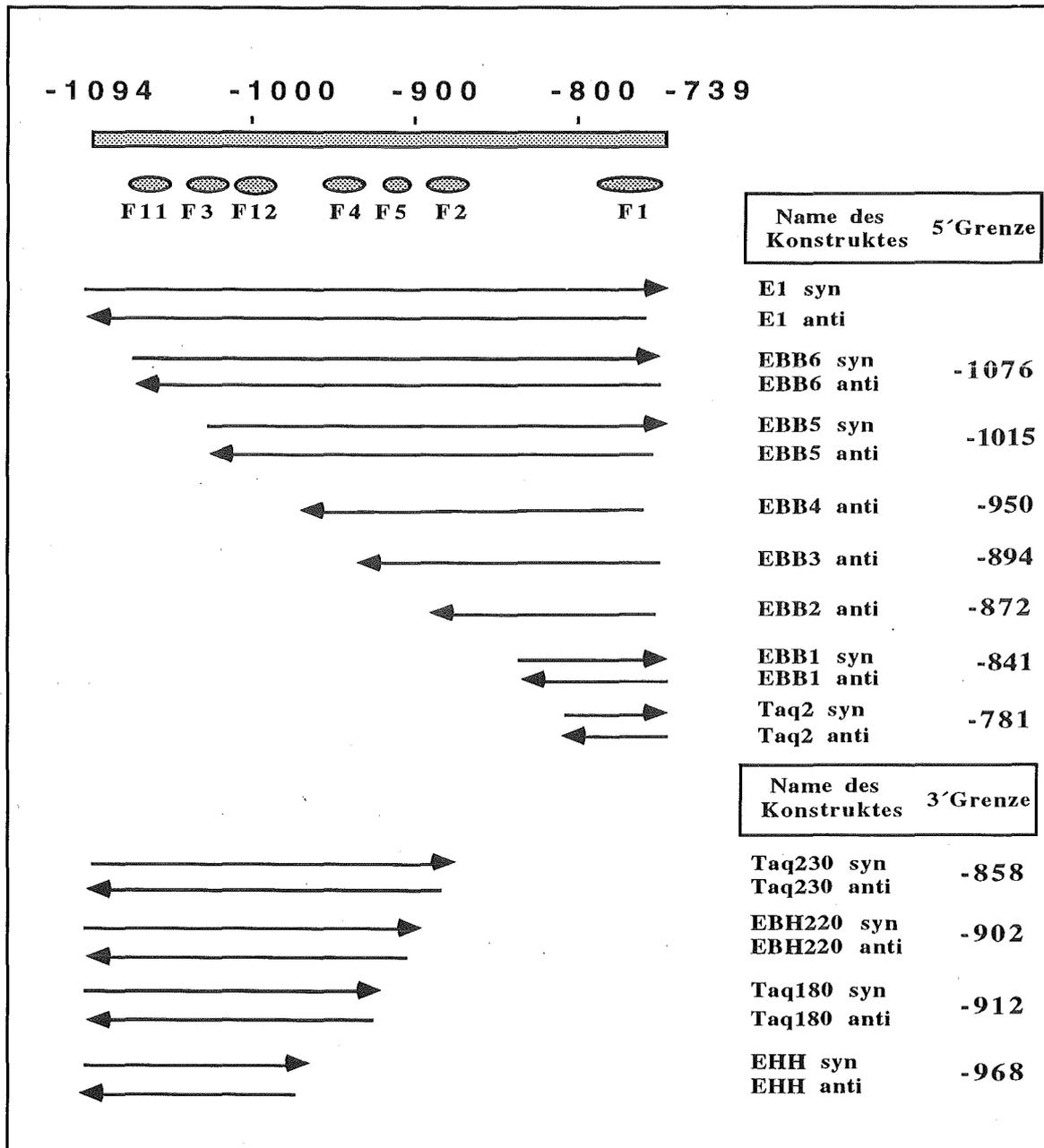


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Deletionsmutanten des E1 Fragmentes. Die Lokalisierung der vor DNase I Verdau geschützten Regionen innerhalb des E1 Fragmentes sind im oberen Bereich dargestellt. Darunter die deletierten Fragmente, die wie in Material und Methoden beschrieben in die Vektoren pBL-CAT8⁺ und pBL-CAT9⁺ (Klein-Hitpass et al., 1988). Die 5' und die 3' Grenzen wurden durch Sequenzierung ermittelt und sind im Schema ganz rechts angegeben.

Die konkrete Beteiligung der in der in der Protektionsanalyse sichtbaren Proteine kann schlußendlich nur durch die Analyse von Punktmutanten aufgeklärt werden. Eine gezielte Punktmutagenese ist aber erst möglich, wenn die Bindungssequenz der Proteine genauer bekannt ist. Deshalb wurden fortschreitend vom 5' oder 3' Ende zunächst Deletionen des E1 Fragmentes hergestellt und wie das E1 Fragment selbst vor TK Promotor und CAT Gen kloniert. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über die so entstandenen Konstrukte. Die funktionelle Deletionsanalyse sollte vorläufige Ergebnisse zur Bedeutung der einzelnen Proteinbindungsregionen liefern, um geeignete Kandidaten für eine genauere Charakterisierung der Bindungssequenzen, hinsichtlich Kontaktstellen des bindenden Proteins, Zelltypspezifität der Bindung oder Verwandtschaft zu bekannten Transkriptionsfaktoren, zu ermitteln.

Die Deletionsmutanten des E1 Fragmentes wurden transient in die Zelllinien HC11 und GR transfiziert. In Abbildung 12 (5'Deletionen) und 13 (3'Deletionen) sind die Ergebnisse mehrerer solcher Transfektionsexperimente anhand von Säulendiagrammen dargestellt. Eine Deletion des 5' Bereiches des E1 Fragmentes bis Position -1076 vermindert die Aktivierung des TK Promotors weder in HC11 noch in GR Zellen, im Gegenteil wird die Aktivierung sowohl in syn und anti Orientierung verstärkt, was dafür spricht, daß im deletierten Bereich Faktoren binden, die die Aktivierung hemmen. Eine Deletion bis Position -1015, die die Proteinbindungsregionen F11 und F3 erfaßt, zerstört das Aktivierungspotential des Fragmentes jedoch fast ganz, was dafür spricht, daß die hier bindenden Proteine für die Aktivierung in beiden Zelllinien entscheidende Bedeutung haben. Mit fortschreitender 5'Deletion ändert sich an dieser schwachen Aktivierung in anti Orientierung, die nur in GR Zellen überprüft wurde, nichts Wesentliches. Bei Deletion bis Position -841 verhält sich das inserierte Fragment in beiden Orientierungen in seinem Einfluß auf den TK Promotor sogar vollkommen neutral. Erstaunlicherweise hat ein Fragment, das nur noch den Proteinbindungsbereich F1 enthält (Position -781 bis Position -739) in GR Zellen wieder einen etwa siebenfach aktivierenden Einfluß auf den TK Promotor. Diese Aktivierung ist im Gegensatz zu der Aktivierung durch das gesamte E1 Fragment stärker in syn Orientierung als in anti Orientierung. Der Proteinbindungsbereich F1 kann also alleine für eine Aktivierung des TK Promotors in GR Zellen sorgen. Dieses Aktivierungspotential ist aber überdeckt, wenn zusätzlich zum F1 Bereich die Sequenzen zwischen Position -841 und -781 vorhanden sind. Dies spricht dafür, daß in diesem Bereich wie im äußersten 5' Bereich des E1 Fragmentes Faktoren binden, die die Aktivierung hemmen. Im Gegensatz zu GR Zellen ist in HC11 Zellen nur eine schwache Aktivierung des TK Promotors durch den F1 Bereich (Position -781/-739) zu beobachten.

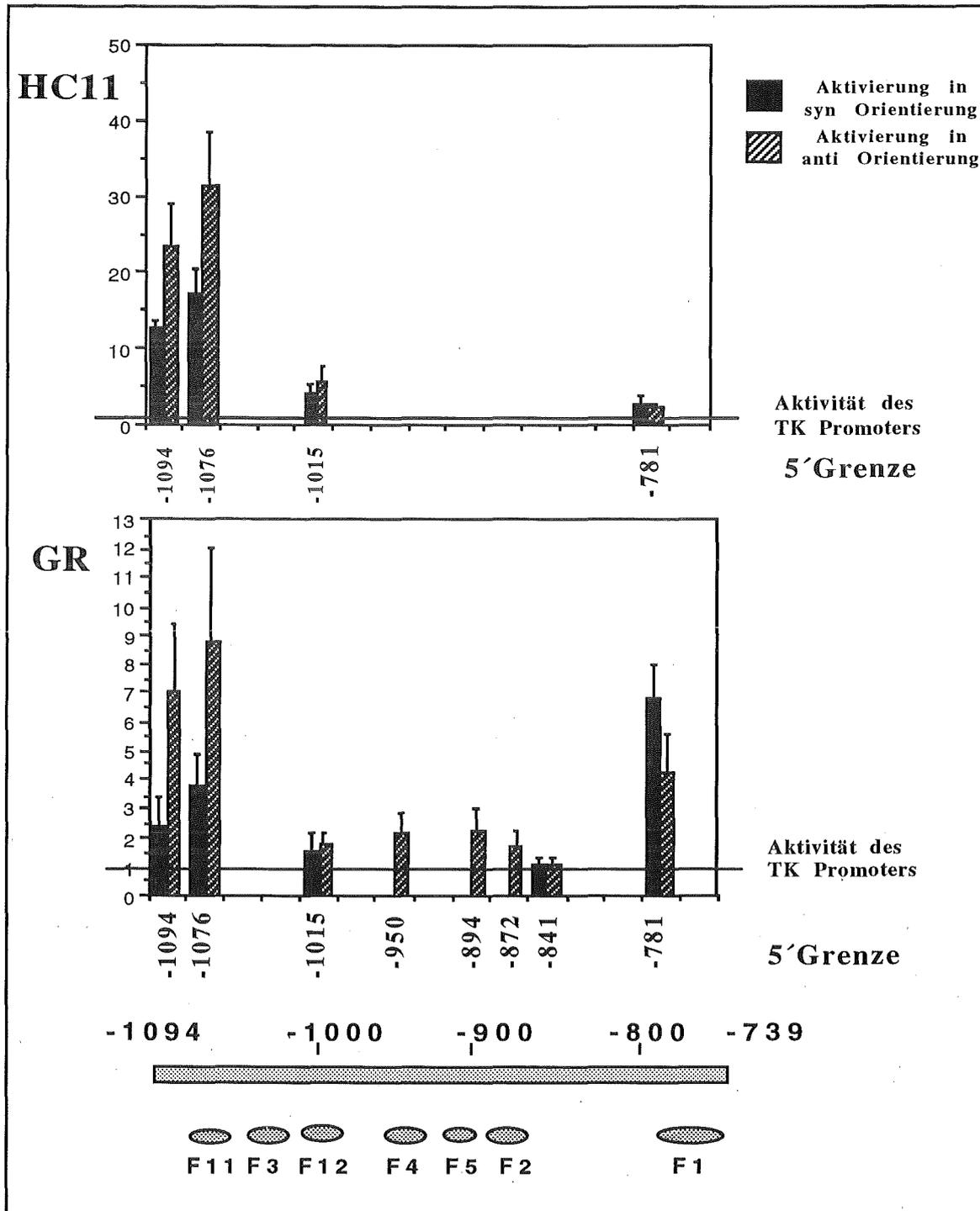


Abbildung 12: Aktivierung des TK Promotors durch 5'Deletionsmutanten des E1 Fragmentes in GR (unten) und HC11 Zellen (oben). GR und HC11 Zellen wurden mit den 5'Deletionsmutanten, die in Abbildung 10 aufgeführt sind, transient transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Zellextrakt die CAT Aktivität bezogen auf die Proteinmenge bestimmt. Die auf der y-Achse angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der CAT Aktivität des jeweiligen MMTV-TK-CAT Konstruktes, dessen 5'Grenze auf der x-Achse angegeben ist, zu der CAT Aktivität eines parallel transfizierten TK-CAT Konstruktes ohne Insertion (pBI-CAT-8⁺). Die Orientierung des MMTV Fragmentes im jeweiligen Konstrukt ist durch schwarze (syn) oder gestreifte (anti) Balken gekennzeichnet. Die Werte aus mindestens vier unabhängigen Transfektionen mit mindestens zwei verschiedenen Plasmidpräparationen wurden gemittelt. Zur Orientierung sind unter den Säulendiagrammen die in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Bereiche schematisch dargestellt. Ihre genaue Lokalisierung ist Abbildung 10 zu entnehmen.

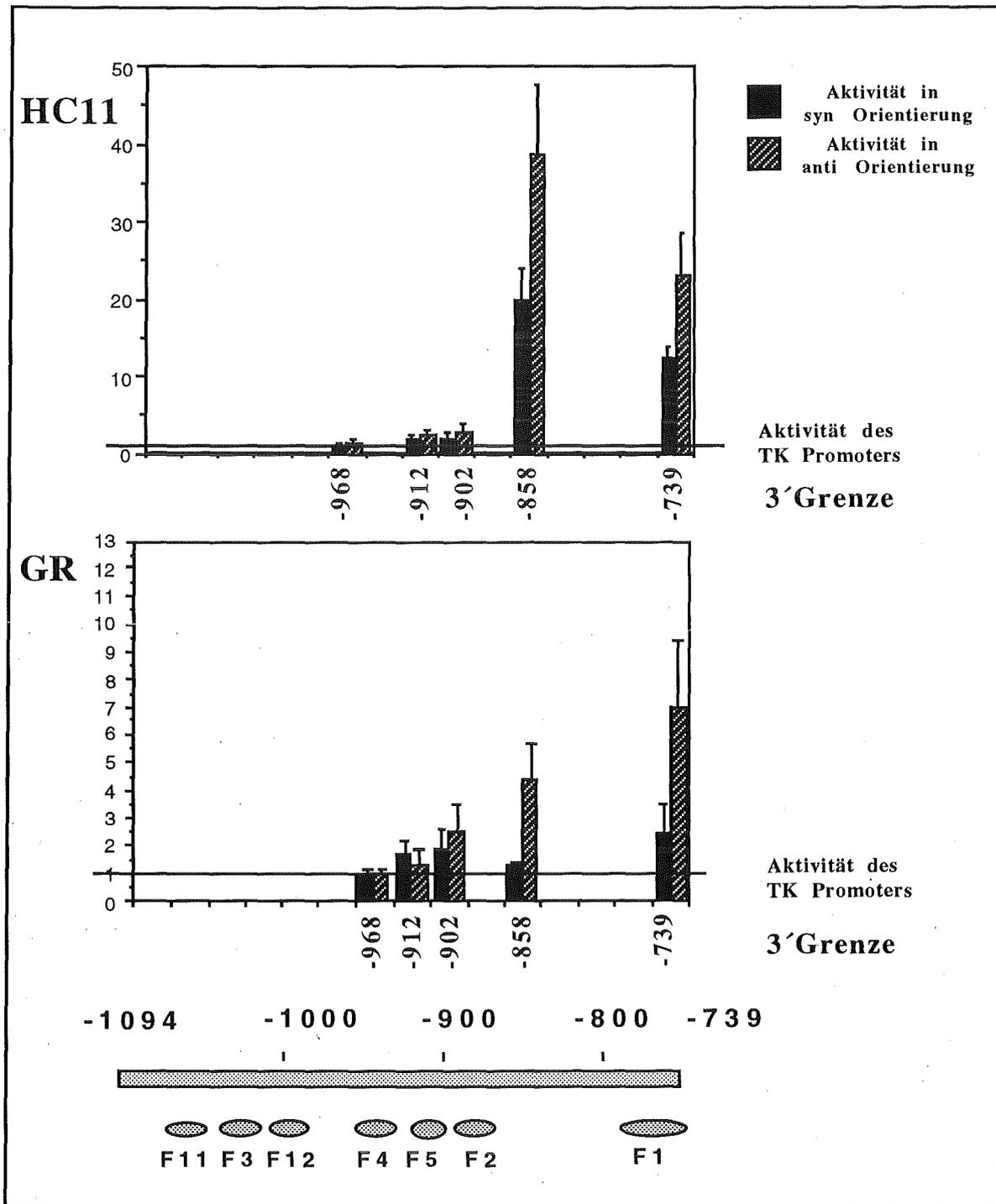


Abbildung 13: Aktivierung des TK Promotors durch 3' Deletionsmutanten des E1 Fragmentes in GR (unten) und HC11 Zellen (oben). GR und HC11 Zellen wurden mit den 3' Deletionsmutanten, die in Abbildung 10 zusammengefaßt sind, transient transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Zellextrakt die CAT Aktivität bezogen auf die Proteinmenge bestimmt. Die auf der y-Achse angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der CAT Aktivität des jeweiligen MMTV-TK-CAT Konstruktes, dessen 3'Grenze auf der x-Achse angegeben ist, zu der CAT Aktivität eines parallel transfizierten TK-CAT Konstruktes ohne Insertion (pBI-CAT-8⁺). Die Orientierung des MMTV Fragmentes im jeweiligen Konstrukt ist durch schwarze (syn) oder gestreifte (anti) Balken gekennzeichnet. Die Werte aus drei unabhängigen Transfektionen mit zwei verschiedenen Plasmidpräparationen wurden gemittelt. Zur Orientierung sind unter den Säulendiagrammen die in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Bereiche schematisch dargestellt. Ihre genaue Lokalisierung ist Abbildung 10 zu entnehmen.

Das Aktivierungspotential der 3' Deletionsfragmente des E1 Fragmentes in GR Zellen nimmt mit fortschreitender Deletion ab. Die Zerstörung der Sequenzen zwischen Position -739 und Position -858, die unter anderem den F1 Bereich miteinschließen, reduziert das Aktivierungspotential in anti Orientierung von siebenfach auf fünffach. Eine Deletion der Sequenzen bis Position -902, die den Proteinbindungsbereich F2 erfaßt, vermindert das Aktivierungspotential in anti Orientierung noch einmal auf dreifach. Die bis Position -912 und -968 deletierten Fragmente verhalten sich in anti Orientierung neutral. Die Deletion bis Position -912 scheint also noch einmal Bindungssequenzen für Faktoren zu betreffen, die an der Aktivierung beteiligt sind. Im Gegensatz zu GR Zellen vermindert die Deletion des F1 Bereiches und angrenzender Sequenzen bis Position -858 das Aktivierungspotential in HC11 Zellen keineswegs. Die Aktivierung des TK Promotors steigt von zwanzigfach auf fast vierzigfach an. Der deletierte Bereich hat also ein die Aktivierung hemmendes Potential in HC11 Zellen.

Die Zerstörung der Sequenzen zwischen Position -858 und Position -902, die den F2 Bereich enthalten, führt dagegen in HC11 Zellen weit drastischer als in GR Zellen zu einem rapiden Abfall der Aktivierung von vierzigfach auf zweifach. Die in diesem Bereich bindenden Proteine sind also stark an der Aktivierung durch das E1 Fragment in HC11 Zellen beteiligt. Die Deletion der Bereiche F5 und F4 führt zu einem vollständigen Verschwinden der verbliebenen Restaktivierung.

Die Deletionsanalyse des E1 Fragmentes zeigt, daß der in ihm enthaltene Aktivator aus mehreren funktionellen Einheiten zusammengesetzt ist, die erst zusammen die volle Aktivierung bewirken. GR und HC11 Zellen unterscheiden sich nicht nur in der Stärke der transkriptionellen Aktivierung durch das E1 Fragment sondern auch im Beitrag der einzelnen funktionellen Einheiten zur Gesamtaktivierung. Der 5' Bereich des E1 Fragmentes mit den Proteinbindungsregionen F11 und F3 ist in beiden Zelltypen wesentlich an der transkriptionellen Aktivierung beteiligt. Der 3' Bereich mit der Proteinbindungsregion F1 trägt in GR Zellen zur Aktivierung bei, hat aber in HC11 Zellen eher einen hemmenden Einfluß auf die transkriptionelle Aktivierung durch das E1 Fragment, in diesem Zelltyp ist die Region F2 stark an der Aktivierung beteiligt.

3.2.3. Im 3' Bereich des E1 Fragmentes liegen zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP1

Der 3' Bereich des E1 Fragmentes, der die Proteinbindungsregion F1 enthält ist in der Mammaepithelzelllinie HC11, die im verwendeten System von Zelllinien die stärkste Aktivierung durch das E1 Fragment zeigt, nicht an der transkriptionellen Aktivierung

beteiligt. Diese Region gehört also wahrscheinlich nicht zum eigentlichen mammaspezifischen Aktivator. Der Proteinbindungsbereich F1 hat jedoch ein starkes Aktivierungspotential auf den TK Promotor in der Mammatumorzelllinie GR und ist in diesem Zelltyp außerdem an der Aktivierung durch das E1 Fragment beteiligt. Die F1 Region wurde deshalb als Bindungsregion für Faktoren, die in Mammatumorzellen an der transkriptionellen Aktivierung beteiligt sind, näher analysiert.

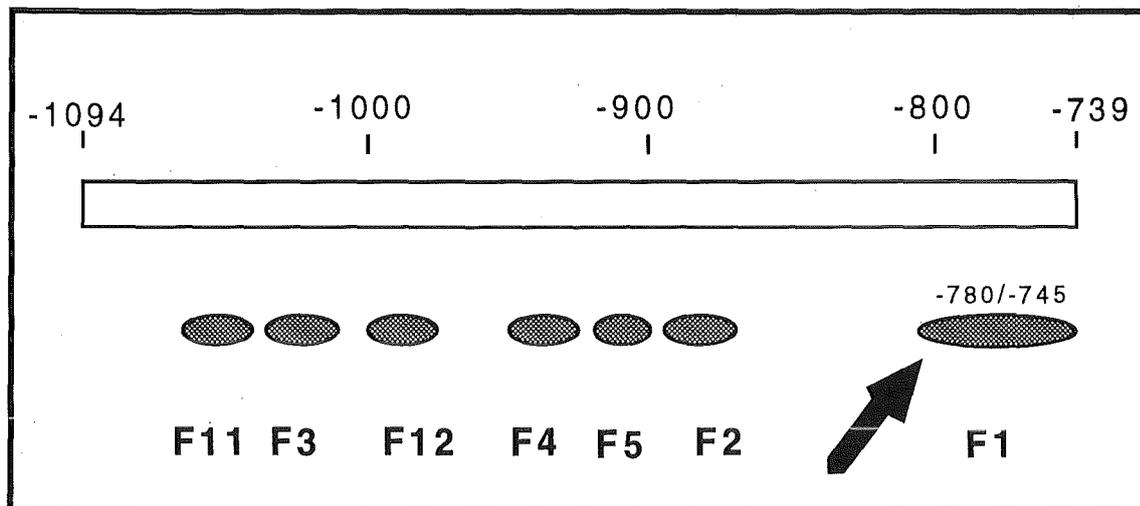


Abbildung 14: Schematische Darstellung der in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Bereiche. Die in diesem Kapitel betrachtete F1 Region ist durch einen Pfeil markiert.

Die DNA Sequenz des F1 Bereiches enthält zwei Sequenzmotive, die Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktors AP1 darstellen könnten (Angel et al., 1987, Risse et al., 1989). Sie sind in Abbildung 15 durch Kästen markiert. Es wurden zwei Oligonukleotide hergestellt, die jeweils nur eine der beiden potentiellen Bindungsstellen enthielten und die als F1a und F1b bezeichnet wurden. Die in F1b enthaltene Sequenz entspricht bis auf die neunte Position der AP1 Bindungsstelle, die im SV40 Enhancer vorkommt (Angel et al., 1987b), die in F1a vorkommende Sequenz ist für keine anderen Promotoren beschrieben. Die Fähigkeit dieser Sequenzen AP1 zu binden wurde durch Gelretardationsexperimente überprüft. Hierzu wurden die Oligonukleotide F1a und F1b radioaktiv markiert und mit Kernextrakt aus NIH-3T3 Zellen inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden auf nicht denaturierenden Acrylamidgelen aufgetrennt und autoradiographiert. Ein DNA bindendes Protein wird in dieser Art der Analyse dadurch sichtbar, daß es durch seine Bindung das Laufverhalten des Oligonukleotids im Gel retardiert. Neben einer Bande, die der freien DNA entspricht werden in der Autoradiographie eine oder mehrere Banden sichtbar, die DNA-Protein Komplexen entsprechen. Daß die beobachtete Bindung spezifisch für die verwendete Sequenz ist, wird im Allgemeinen durch Konkurrenzexperimente gezeigt.

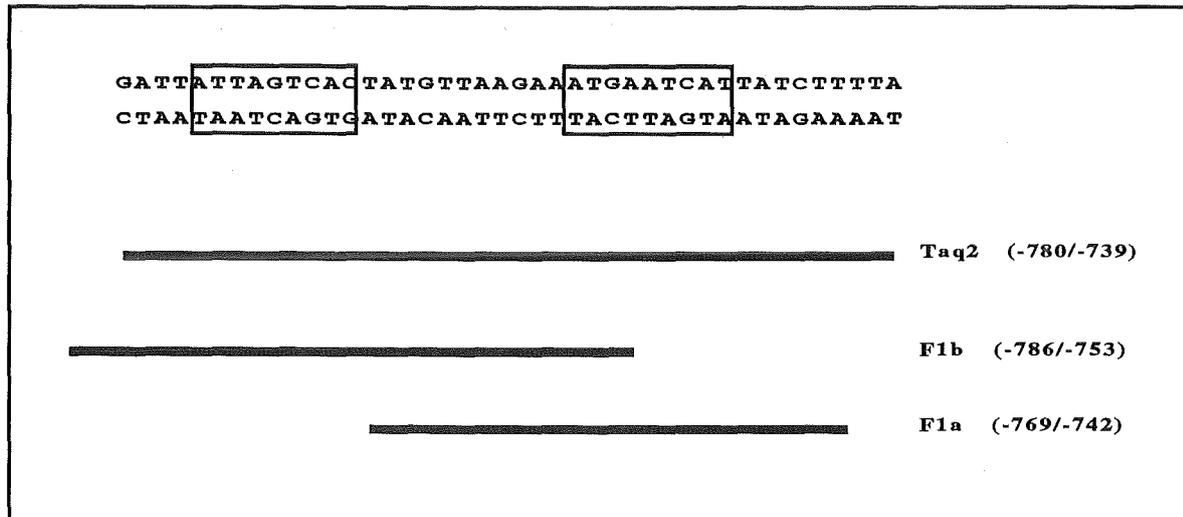


Abbildung 15: DNA Sequenz des Taq 2 Fragmentes des MMTV LTR zwischen Position -780 und -739. Die Kästen geben die potentiellen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP1 an. Die Oligonukleotide F1a und F1b enthalten jeweils eine der beiden AP1 Bindungsstellen. Die Länge der in ihnen enthaltenen MMTV Sequenz ist in Klammern angegeben.

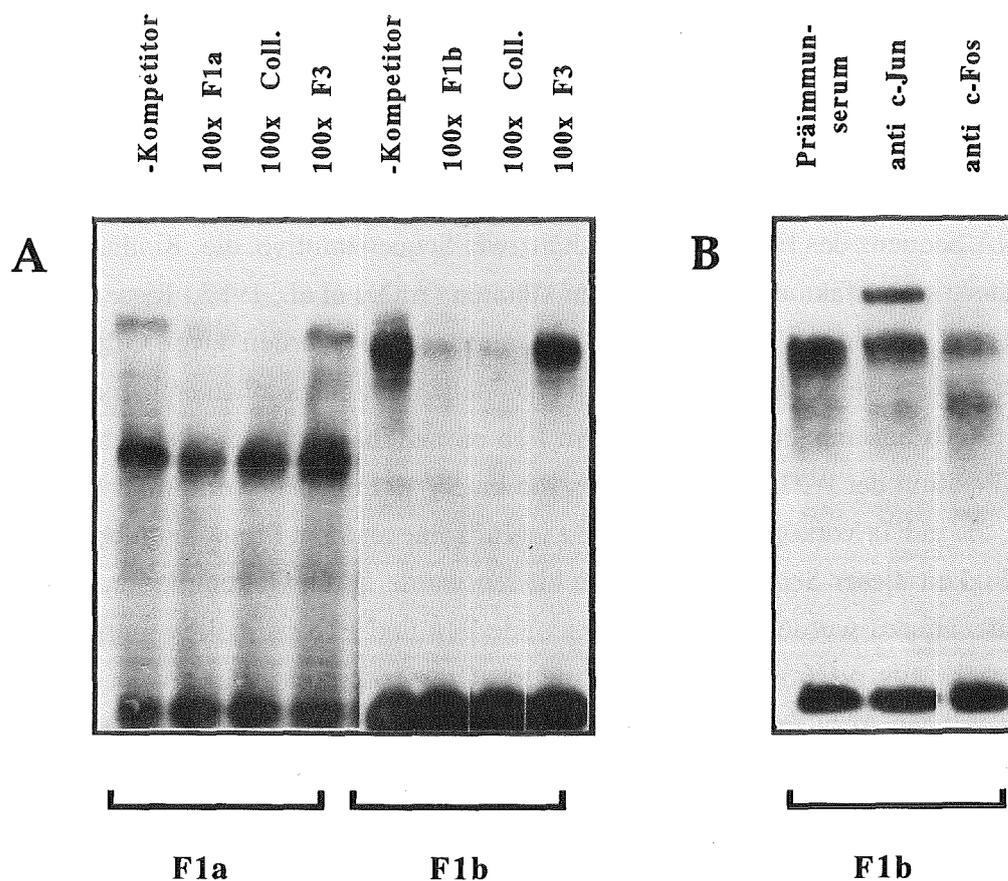


Abbildung 16: Gelretardationsanalyse mit Oligonukleotiden aus dem F1 Bereich und 5 µg Kernprotein aus NIH-3T3 Zellen pro Ansatz. A.: Konkurrenz. Das eingesetzte, radioaktiv markierte Oligonukleotid ist ganz unten angegeben, die als Kompetitoren eingesetzten Oligonukleotide über den jeweiligen Spuren. Das Oligonukleotid Coll. enthält die AP1 Bindungsstelle aus dem Promotor des menschlichen Kollagenase Gens (Angel et al., 1987a). B.: Inkubation des Proteinbindungsansatzes mit Antikörpern gegen c-Jun und c-Fos. Welches Serum verwendet wurde, ist über den jeweiligen Spuren angegeben.

Ein Überschuß an nicht markiertem Oligonukleotid, das in seiner Sequenz der verwendeten Probe entspricht, schwächt die Bindung des radioaktiv markierten Oligonukleotids ab. Ein Überschuß eines Oligonukleotids, das nicht die spezifische Bindungssequenz für das fragliche Protein enthält, tut dies nicht. Für die Oligonukleotide sollte nachgewiesen werden, daß es sich um AP1 Bindungsstellen handelt. Die in Abbildung 16 A dargestellte Gelretardationsanalyse mit den Oligonukleotiden F1a und F1b zeigt, daß beide Oligonukleotide sequenzspezifische Bindung aufweisen. Die retardierte Bande wird durch Zugabe eines Überschusses des Oligonukleotids selbst abgeschwächt (F1a beziehungsweise F1b), nicht aber durch Zugabe eines anderen nicht sequenzverwandten Oligonukleotids (F3). Die Proteinbindung am Oligonukleotid F1a ist schwächer ausgeprägt als am Oligonukleotid F1b. Außerdem wird mit F1a außer dem spezifischen, retardierten Komplex ein im Gel schneller laufender, unspezifischer Komplex sichtbar. Eine AP1 Bindungsstelle aus dem Promotor des menschlichen Kollagenase Gens (Coll, Angel et al., 1987a) kann um die Bindung sowohl mit F1a als auch mit F1b konkurrieren. Bei F1a und F1b handelt es sich also ebenfalls um AP1 Bindungsstellen.

Der Transkriptionsfaktor AP1 besteht nicht aus einem einzelnen Protein sondern aus einem Komplex, der aus verschiedenen Mitgliedern der Fos und Jun Proteinfamilien besteht (Curran und Franza, 1988). Die Beteiligung von c-Jun und c-Fos an der Komplexbildung mit dem Oligonukleotid F1b wurde durch Inkubation des Proteinbindungsansatzes mit Antikörpern gegen diese beiden Proteine überprüft (16B). Die Inkubation mit dem c-Jun Antikörper führt zu einem sogenannten "Supershift", der dadurch zu erklären ist, daß der Antikörper nicht die DNA Bindung des c-Jun Proteins verhindert, was zu einer Abschwächung der retardierten Bande führen würde, sondern zusätzlich an den Komplex bindet und damit das Laufverhalten weiter verzögert. Auch der eingesetzte Antikörper gegen das c-Fos Protein zeigt eine Interaktion mit dem retardierten Komplex, die retardierte Bande ist deutlich abgeschwächt. Sowohl c-Jun und c-Fos sind also an der Komplexbildung an der F1b Region des MMTV LTR beteiligt, wenn Kernextrakt aus NIH-3T3 Zellen verwendet wird.

Um zu überprüfen, wie die transkriptionelle Aktivierung durch AP1 in den verwendeten Zelllinien variiert, wurden verschiedene Zelllinien transient mit dem Konstrukt Taq2 synthetisiert, das den gesamten F1 Bereich vor dem TK Promotor enthält (Position -781/-739). Die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Die stärkste Aktivierung des TK Promotors läßt sich mit etwa siebenfach in GR Zellen beobachten, aber auch in der menschlichen Mammatumorzelllinie T47D oder in der menschlichen Hepatomzelllinie HepG2 ist eine deutliche Aktivierung zu sehen.

Aktivierung des TK Promoters durch das Taq 2 Fragment in verschiedenen Zelltypen	
Zelltyp	Aktivierung
GR	6.8 +/-1.2
T47D	4.8 +/-1.8
HC11	2.2 +/-0.9
NIH-3T3	2.2 +/-0.3
Hela	1.1 +/-0.1
HepG2	3.1 +/-1.2

Abbildung 17: Aktivierung des TK Promoters durch das Taq 2 Fragment in verschiedenen Zelltypen. Das Konstrukt Taq2 syn wurde transient in die angegebenen Zelltypen transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Proteinextrakt die CAT Aktivität bezogen auf die Proteinmenge bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der CAT Aktivität des Taq2 syn Konstruktes zu der CAT Aktivität eines parallel transfizierten TK-CAT Konstruktes ohne Insertion (pBL-CAT-8⁺). Die Werte aus drei unabhängigen Transfektionen wurden gemittelt.

In HC11 Zellen, NIH-3T3 Zellen und Hela Zellen ist die Aktivierung schwach oder gar nicht vorhanden. Die Aktivierung durch den F1 Bereich ist wie erwartet weder auf Mammazelllinien beschränkt noch ist er in allen Mammazelllinien zu beobachten. Damit wurde bestätigt, daß die AP1 Bindungsstellen nicht ausschlaggebend für die mammaspezifische Aktivierung durch das E1 Fragment sind. Ihr Beitrag zur Aktivierung ist eher spezifisch für einige Tumorzellen.

3.2.4. Eine der Proteinbindungsregionen im 5' Bereich des E1 Aktivators ist eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF1

Eine Deletion des 5' Bereiches des E1 Aktivators, die die Proteinbindungsbereiche F11 und F3 erfasst, führt sowohl in HC11 Zellen als auch in GR Zellen zu einer drastischen Reduktion des Aktivierungspotentials. Mindestens eines dieser Proteine sollte also entscheidend an der mammaspezifischen transkriptionellen Aktivierung beteiligt sein. In Abbildung 18 ist ihre Lokalisierung innerhalb des E1 Fragmentes noch einmal schematisch gekennzeichnet.

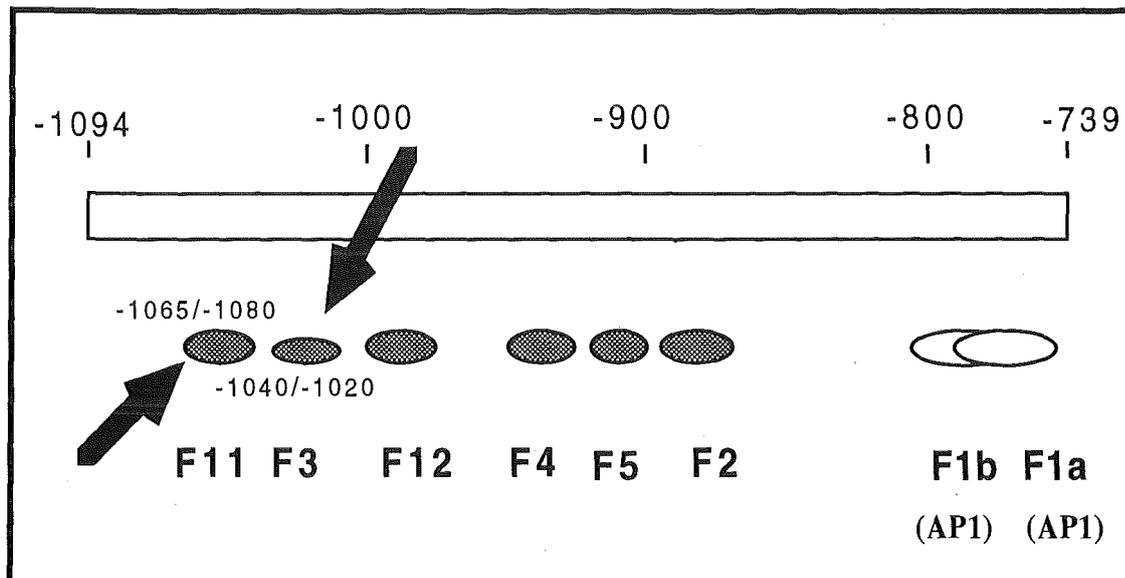


Abbildung 18: Schematische Darstellung der in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Regionen. Die in diesem Kapitel betrachteten Regionen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Bei der schon analysierten Region F1 ist in Klammern der bindende Transkriptionsfaktor angegeben, der auch ein eigenes Symbol (weiße Ovale) erhalten hat.

Zur genaueren Charakterisierung der Bindungssequenzen und zur Überprüfung einer zelltypspezifischen Bindungsaktivität wurden entsprechend diesen beiden Proteinbindungsregionen Oligonukleotide hergestellt. Ihre Sequenz ist der unter 2.1.5. aufgeführten Liste in "Material und Methoden" zu entnehmen. Die Lokalisierung der jeweiligen Sequenzen innerhalb des E1 Fragmentes ist in Abbildung 10 gekennzeichnet. Zur Überprüfung einer potentiellen mammaspezifischen Bindung wurden beide Oligonukleotide zunächst einer Gelretardationsanalyse mit Kernextrakt aus Mammazellen und Nicht-Mammazellen unterworfen.

Abbildung 19 zeigt eine Gelretardationsanalyse mit dem Oligonukleotid F11 und Kernextrakt aus GR und NIH-3T3 Zellen. Das spezifische Proteinbindungsmuster ist mit Kernextrakt aus beiden Zelllinien ähnlich. Die mit Kernextrakt aus NIH-3T3 Zellen zusätzlich auftretende Bande läßt sich weder mit einem spezifischen (F11) noch mit einem unspezifischen Kompetitor (F3) abschwächen. Es handelt sich also um eine unspezifische Bindung. Die F11 Region enthält keine als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren beschriebene Nukleotidsequenzen (Gosh, 1990). Allerdings ist die in F11 enthaltene Nukleotidsequenz ACAAAG wie aus Abbildung 29 zu ersehen ist auch in den Promotoren der Milchproteingene WAP (Whey Acidic Protein) und α -Lactalbumin vorhanden. Im WAP Promotor führt die Deletion dieser Sequenz zu einer Reduktion der Basalaktivität des Promotors (Wolfgang Doppler, persönliche Mitteilung). Im Folgenden wurde deshalb von der Hypothese ausgegangen, daß es sich bei der Sequenz ACAAAG innerhalb der F11

Region des E1 Aktivators um die Erkennungsstelle für ein regulatorisches Protein handelt. Die Proteinbindung selbst wurde nicht näher charakterisiert.

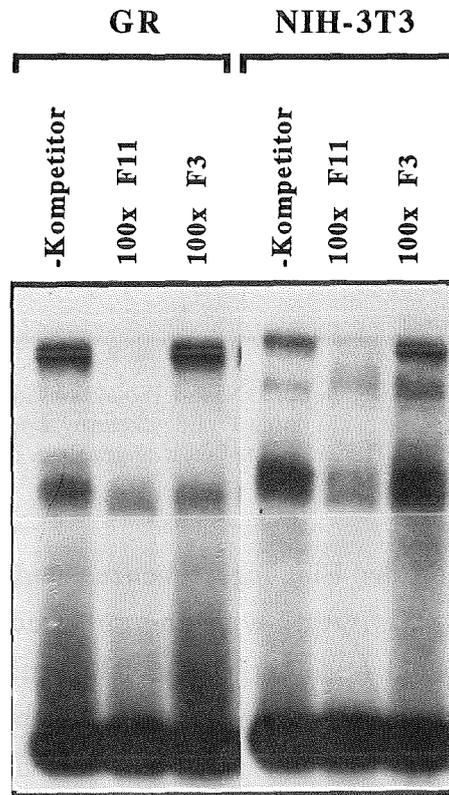


Abbildung 19: Gelretardationsanalyse mit dem Oligonukleotid F11 und Kernextrakt aus verschiedenen Zelllinien. Es wurden jeweils 5 µg Kernprotein aus den angegebenen Zelllinien verwendet. Der Kompetitor wurde in hundertfachem molaren Überschuß zugesetzt.

Auch die Region F3 wurde einer vergleichenden Gelretardationsanalyse unterworfen. In Abbildung 20 ist ein Experiment mit Kernextrakt aus NIH-3T3 und GR Zellen dargestellt. Auch in diesem Fall sieht das Bindungsmuster mit Kernextrakt aus der Mammazelllinie und der Nicht-Mammazelllinie sehr ähnlich aus. Der Extrakt aus der Mammatumorzelllinie GR zeigt eine etwas stärkere Bindungsaktivität als der Extrakt aus der Fibroblasten Zelllinie NIH-3T3. Dies könnte aber auf eine unterschiedliche Qualität der Extraktpräparation zurückzuführen sein.

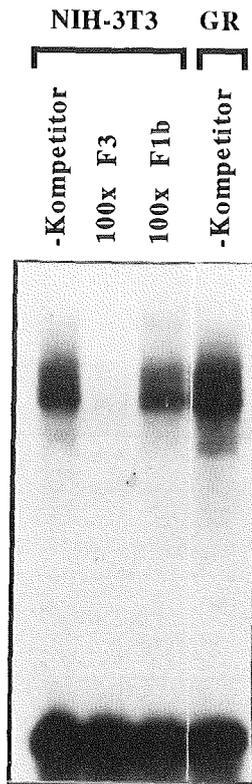


Abbildung 20 Gelretardationsanalyse mit dem Oligonukleotid F3 und Kernextrakt aus verschiedenen Zelllinien. Es wurden jeweils 5µg Kernprotein aus den angegebenen Zelllinien verwendet. Der Kompetitor wurde in hundertfachem molaren Überschuß zugesetzt.

Zur Eingrenzung der Erkennungssequenz für das spezifisch bindende Protein wurde die Proteinbindung am F3 Oligonukleotid einer Methylierungsinterferenzanalyse unterworfen. Hierzu wurden die beiden Einzelstränge einseitig radioaktiv markiert und partiell methyliert. Anschließend wurde das Oligonukleotid in einem präparativen Ansatz mit Kernextrakt aus GR Zellen inkubiert und auf einem nicht denaturierenden Gel aufgetrennt. Sowohl die retardierte DNA als auch die nicht gebundene DNA wurden aus dem Gel ausgeschnitten und einer chemischen Spaltung unterzogen, die an Guanin und Adenin Positionen gespaltene Fragmente ergibt. Diese Reaktion wurde auf einem 20% Acrylamid/Harnstoffgel aufgetrennt und autoradiographiert. Während in dem Ansatz mit der freien DNA die Gesamtpopulation aller möglichen an G und A Positionen abgebrochenen Fragmente auftritt, fehlen im Ansatz mit der an Protein gebundenen DNA bestimmte Fragmente. Eine Methylierung der entsprechenden Positionen hat die Bindung des Proteins verhindert, die Fragmente die diese Methylierung tragen sind deshalb in ihrem elektrophoretischen Laufverhalten nicht retardiert. Die Methylierungsinterferenzanalyse gibt Hinweise darauf, welche Kontaktstellen das DNA bindende Protein mit seiner spezifischen Erkennungssequenz hat.

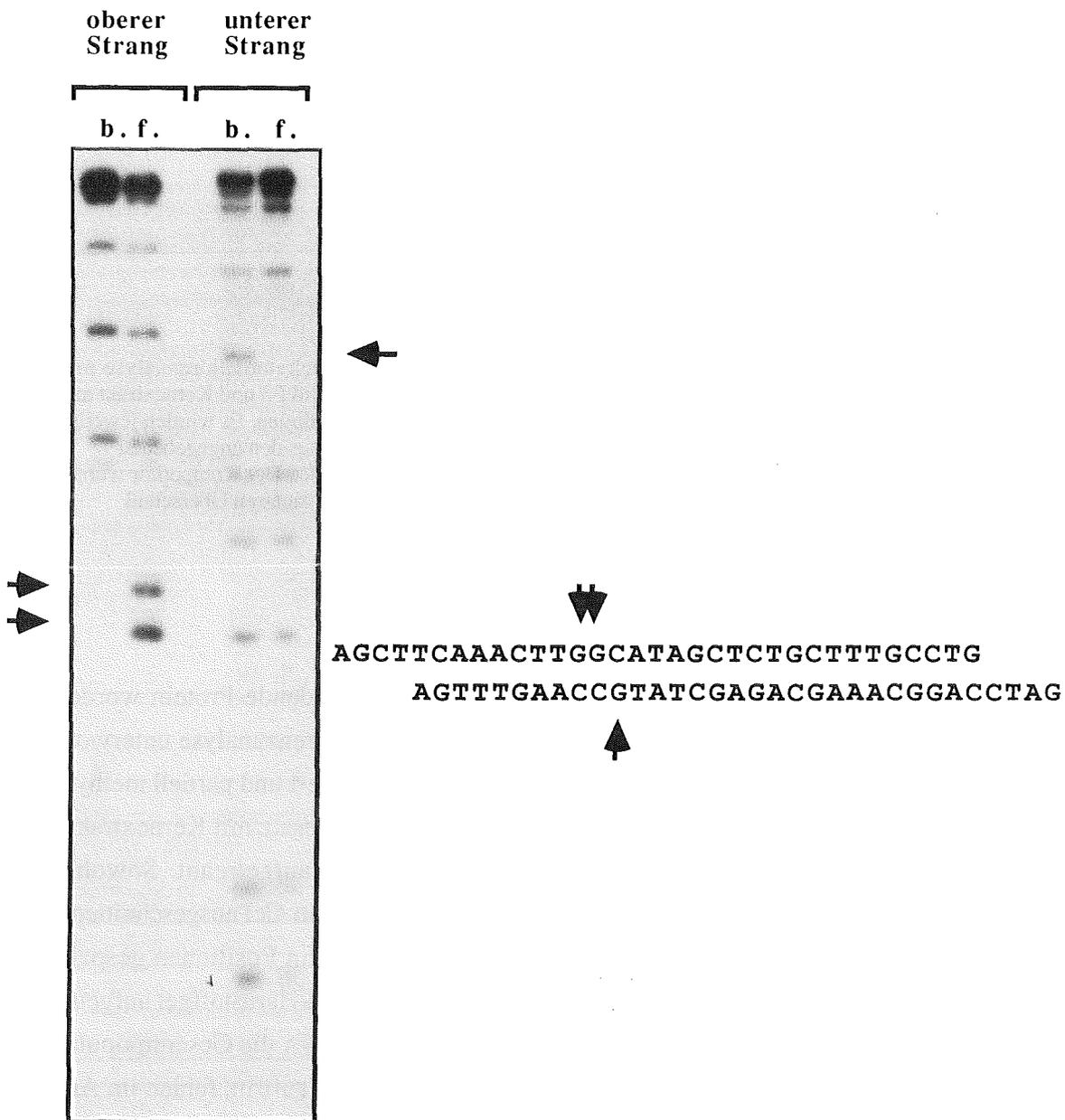


Abbildung 21: Methylierungsinterferenzanalyse mit dem Oligonukleotid F3 und Kernextrakt aus GR Zellen. Die beiden Einzelstränge des F3 Oligonukleotids wurden einseitig radioaktiv markiert und mit dem jeweiligen, nicht markierten Gegenstrang hybridisiert. Wie in "Material und Methoden" beschrieben wurden die Oligonukleotide methyliert und einer präparativen Gelretardationsanalyse unterworfen. Die retardierte Bande und die Bande mit der freien DNA wurden ausgeschnitten und die DNA jeweils einer Piperidinspaltung unterzogen. Diese Ansätze wurden auf einem 20% Acrylamid/Harnstoffgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines solchen Gels. Die Banden, die in den Ansätzen mit der gebundenen DNA (b.) nicht oder nur abgeschwächt erscheinen im Vergleich zu den Ansätzen mit der freien DNA (f.) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Daneben ist die Sequenz des F3 Oligonukleotids dargestellt. Die Positionen, die eine Methylierungsinterferenz zeigen, sind wiederum durch Pfeile gekennzeichnet.

Die in Abbildung 21 dargestellte Methylierungsinterferenzanalyse, die mit dem F3 Oligonukleotid und Kernextrakt aus GR Zellen durchgeführt wurde, weist auf die Bindungssequenz "TGGCA" hin. Diese Sequenz ist in der Literatur als Erkennungssequenz für die NF1/CTF Familie von Transkriptionsfaktoren beschrieben (Rupp et al., 1990). In vielen Genen liegt diese Erkennungssequenz leicht abgewandelt und palindromisch vor, so zum Beispiel auch im hormonresponsiven Element des MMTV LTR zwischen Position -81 und -58. Um zu überprüfen, ob die mit dem F3 Oligonukleotid *in vitro* beobachtete Proteinbindung tatsächlich von einem Mitglied der NF1 Familie herrührt, wurde ein Konkurrenzexperiment mit der NF1 Bindungsstelle aus dem hormonresponsiven Element des MMTV durchgeführt. Wie in Abbildung 22A dargestellt ist, ist diese NF1 Bindungsstelle fähig, im Gelretardationsexperiment mit dem F3 Oligonukleotid um die Proteinbindung zu konkurrieren.

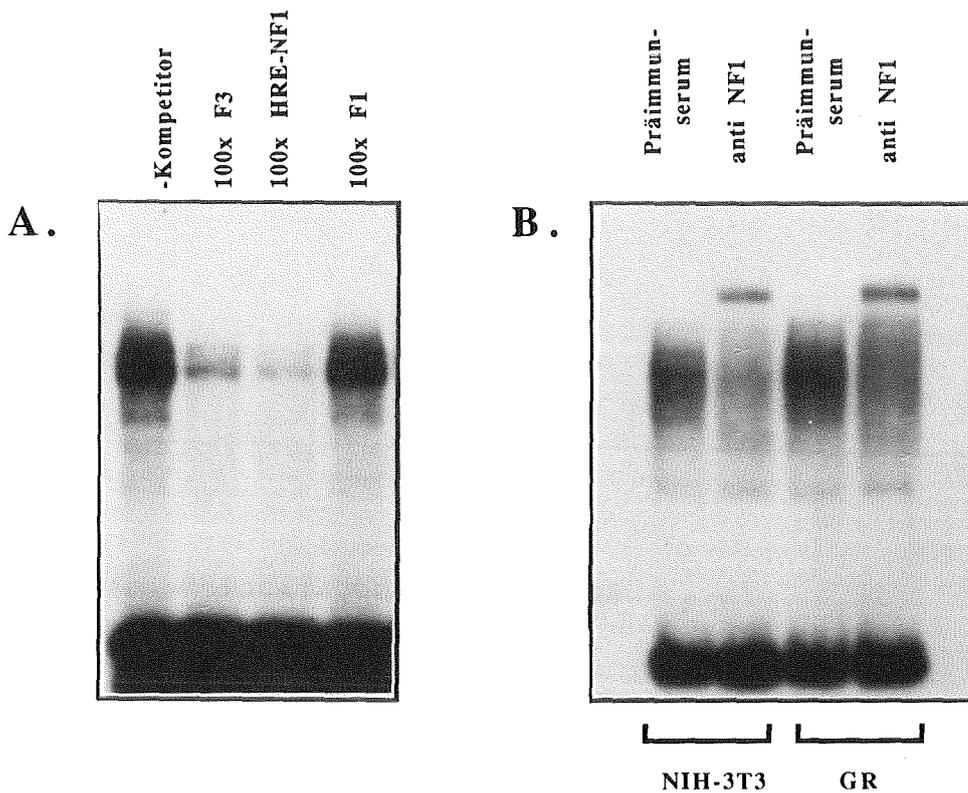


Abbildung 22: Gelretardationsanalysen mit dem F3 Oligonukleotid. A.: Gelretardationsanalyse mit 5 μ g Kernextrakt aus GR Zellen. Zur Konkurrenz wurden in hundertfachem molarem Überschuß das Oligonukleotid F3 selbst und ein Oligonukleotid eingesetzt, das die Erkennungssequenz für NF1 enthält wie sie im hormonresponsiven Element des MMTV vorkommt. B.: Gelretardationsanalyse mit je 5 μ g Kernextrakt aus den angegebenen Zelllinien. Dem Proteinbindungsansatz wurde entweder Präimmunserum oder ein gegen CTF/NF1 gerichtetes Antiserum zugesetzt.

Weiterhin wurde der Proteinbindungsansatz mit Antikörpern gegen ein carboxyterminales Peptid von CTF1, einem Mitglied der NF1 Genfamilie, inkubiert und ebenfalls einer Gelretardationsanalyse unterworfen. Ein Autoradiogramm dieses Experimentes ist in Abbildung 22B enthalten. Der Antikörper interagiert sowohl mit der Proteinbindung an das F3 Oligonukleotid, die mit Kernextrakt aus NIH-3T3 Zellen erhalten wird, als auch mit der Bindung, die mit Kernextrakt aus GR Zellen erhalten wird. Somit ist gezeigt, daß die mit dem F3 Bereich beobachtete spezifische Proteinbindung auf ein Mitglied der NF1 Familie zurückgeht.

Entsprechend den Daten aus der Methylierungsinterferenzanalyse wurden drei Basenaustausche vorgenommen und das Oligonukleotid F3m hergestellt. Dieses Oligonukleotid ist nicht mehr fähig im Gelretardationsexperiment mit dem F3 Oligonukleotid um die Proteinbindung zu konkurrieren (Abbildung 23). Die in diesem Oligonukleotid vorhandene DNA Sequenz ist also nicht mehr fähig, NF1 zu binden. Diese Information war für die Herstellung einer Punktmutante des E1 Fragmentes von Bedeutung, deren Verhalten in Kapitel 3.2.7. vorgestellt wird.

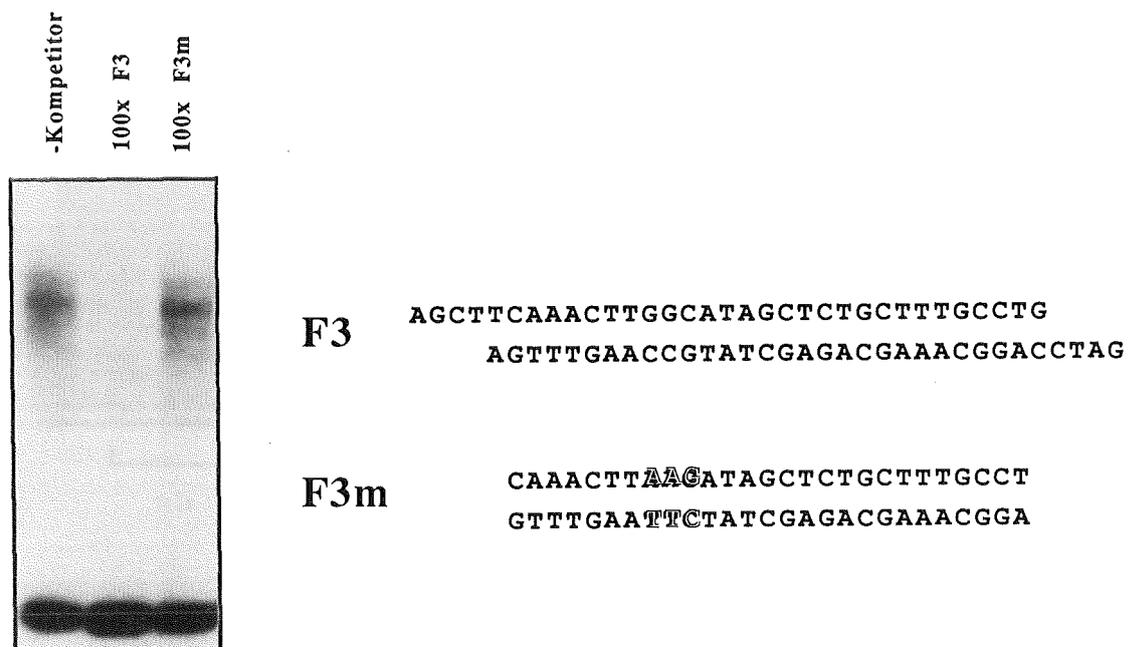


Abbildung 23: Konkurrenz der Proteinbindung am Oligonukleotid F3 mit dem mutierten Oligonukleotid F3m. Die Kompetitoren wurden für die Gelretardationsanalyse in hundertfachem molarem Überschuß eingesetzt. Es wurden 5 µg Kernextrakt aus GR Zellen verwendet.

3.2.5. Eine der Proteinbindungsregionen im mittleren Teil des Aktivators zeigt ein spezifisches Proteinbindungsmuster in Mammazellen

Neben der noch zu besprechenden Proteinbindungsregion F2, deren Beitrag zur mammaspezifischen Aktivierung in HC11 Zellen besonders deutlich ist, liegen im mittleren Teil des E1 Aktivators die beiden proteinbindende Sequenzbereiche F4 und F5, die ebenfalls an der mammaspezifischen Aktivierung beteiligt sein könnten. Ihre Lokalisierung innerhalb des E1 Fragmentes ist in Abbildung 24 noch einmal schematisch dargestellt..

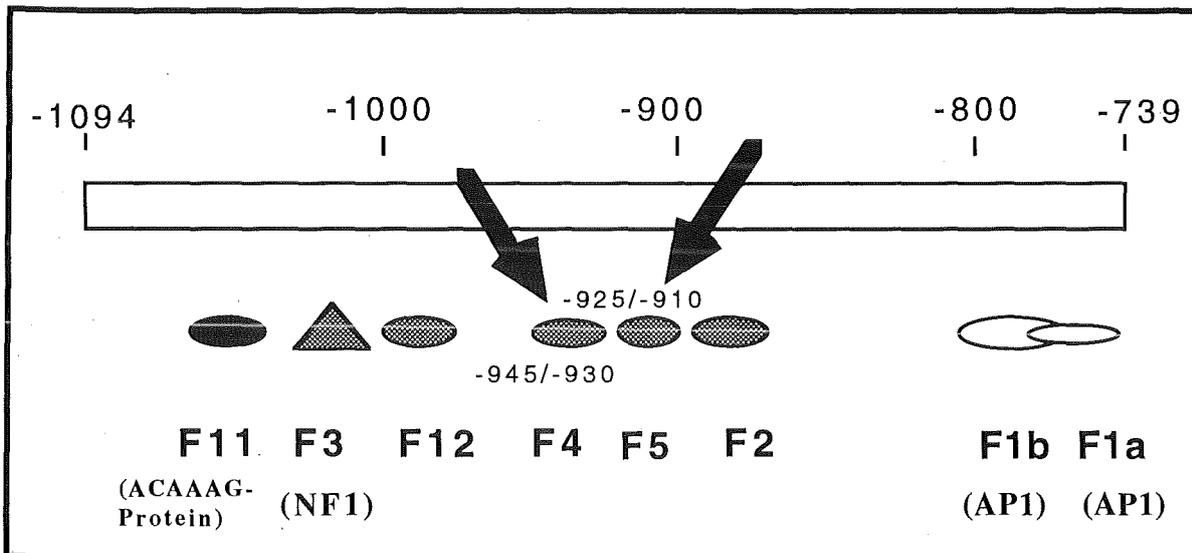


Abbildung 24: Schematische Darstellung der in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Bereiche innerhalb des MMTV E1 Fragmentes. Die in diesem Kapitel betrachteten Regionen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Bei den schon analysierten Bindungsregionen ist in Klammern der bindende Faktor angegeben. Sie sind durch eigene Symbole gekennzeichnet.

Eine 3' Deletion des E1 Fragmentes bis Position -912 hat sowohl in GR als auch in HC11 Zellen eine höhere Aktivität als eine Deletionsmutante, die nur bis Position -968 reicht und die Bereiche F4 und F5 nicht mehr enthält. Auch entsprechend zu den Regionen F4 und F5 wurden deshalb Oligonukleotide hergestellt, um ihre zelltypspezifische Bindungsaktivität zu überprüfen und gegebenenfalls die Bindungssequenz genauer zu analysieren. Die Sequenz dieser Oligonukleotide ist der unter 2.1.5. aufgeführten Liste zu entnehmen, die Lokalisierung der entsprechenden Sequenzen im E1 Fragment ist in Abbildung 10 gekennzeichnet. Sowohl das Oligonukleotid F5 als auch das Oligonukleotid F4 wurde einer vergleichenden Gelretardationsanalyse unterworfen, um zunächst zu untersuchen, ob eine dieser Regionen eine spezifische Bindungsaktivität mit Kernextrakt aus Mammaepithelzellen zeigt.

Während sich mit dem Oligonukleotid F5 (Abbildung 25) kein zelltypspezifischer Unterschied in der Proteinbindung ergibt, zeigt das Oligonukleotid F4 (Abbildung 26) ein deutlich unterschiedliches Proteinbindungsmuster mit Zellextrakt aus Mammazellen und Zellen anderen Ursprungs.

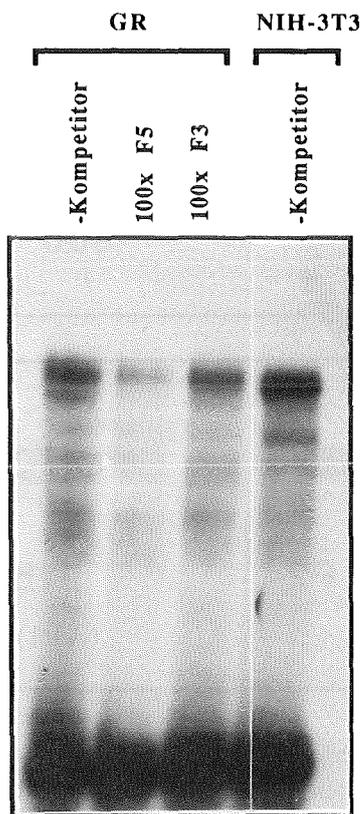


Abbildung 25: Gelretardationsanalyse mit dem F5 Oligonukleotid und Kernextrakt aus verschiedenen Zelllinien. Es wurden jeweils 5µg Kernextrakt aus den angegebenen Zelllinien verwendet. Die Kompetitoren wurden in hundertfachem molaren Überschuß zugesetzt.

Während mit Kernextrakt aus GR und HC11 Zellen neben schwächeren retardierten Banden im Wesentlichen eine retardierte, spezifische Bande erscheint, die als F4.M bezeichnet wurde, ergibt sich mit Zellextrakt aus NIH-3T3 und Hela Zellen eine zusätzliche, im Gel höher laufende Bande, die als F4.N bezeichnet wurde. Die Tatsache, daß es ein Protein gibt, das nur in den untersuchten Nicht-Mammazellen an den E1 Aktivator bindet, könnte auf einen negativen Regulationsmechanismus hindeuten, der die Aktivität des E1 Aktivators zelltypspezifisch unterdrückt. Diese Hypothese kann nur durch die spezifische Ausschaltung dieser Proteinbindung im E1 Kontext funktionell überprüft werden

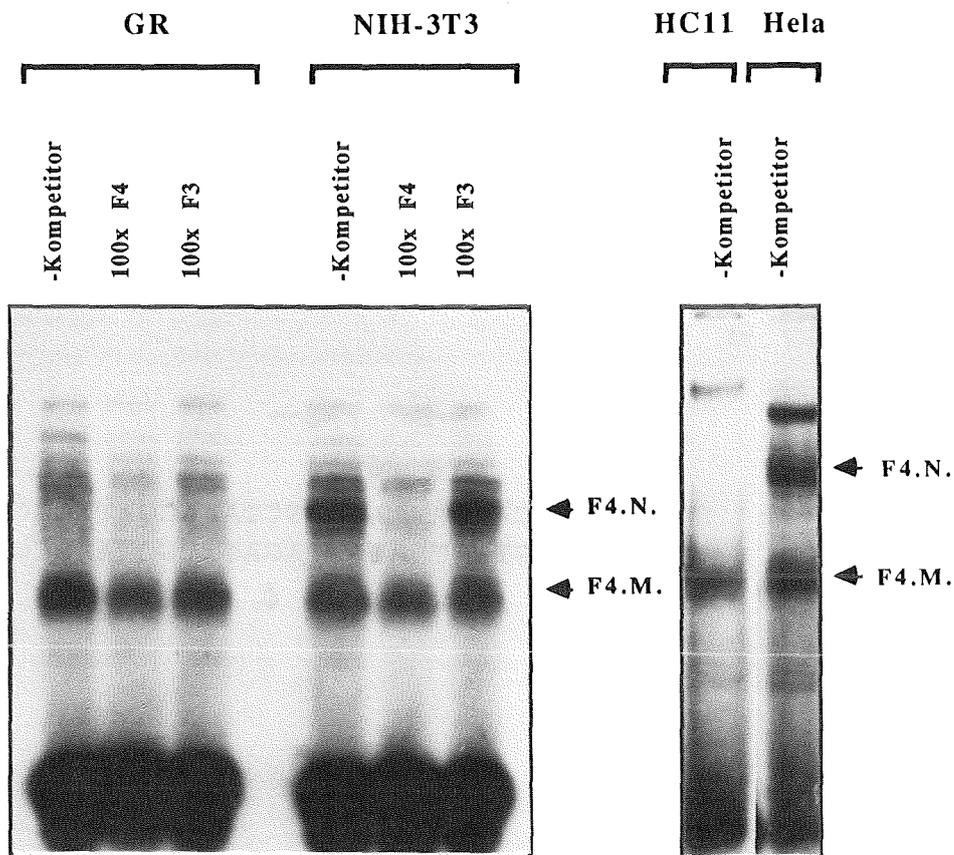


Abbildung 26: Gelretardationsanalyse mit dem F4 Oligonukleotid und Kernextrakt aus verschiedenen Zelllinien. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde mit 5 µg Kernextrakt aus den angegebenen Zelllinien inkubiert und die Ansätze auf einem nicht denaturierenden Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Bei den Ansätzen mit Kernextrakt aus GR und NIH-3T3 Zellen ist die Spezifität der Bindung durch spezifische Konkurrenz gezeigt. Die angegebenen Kompetitoren wurden in einem hundertfachen molaren Überschuß zugesetzt.

Zur Feststellung der genauen Kontaktstellen des F4.N. Proteins, die in einer entsprechenden Punktmutante ausgetauscht werden müßten, wurde die Bindung des F4.N. Proteins aus Kernextrakt von NIH-3T3 Zellen einer Methylierungsinterferenzanalyse unterzogen. Wie aus Abbildung 27 zu ersehen ist, ergibt die Methylierungsinterferenzanalyse für den Protein-DNA Komplex F4.N. eine palindromische Erkennungssequenz, in der das Motiv "GATT" spiegelbildlich wiederholt auftaucht.

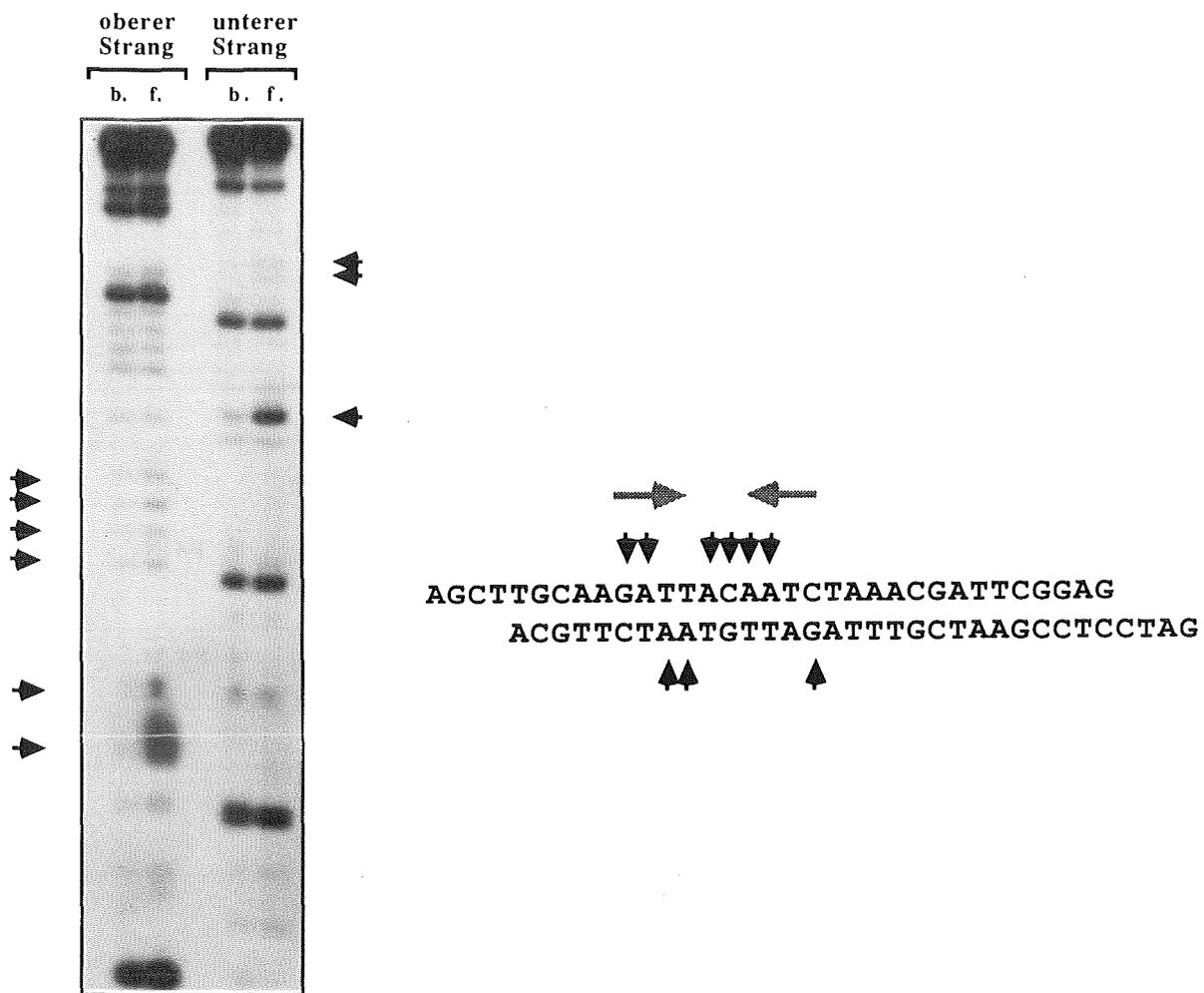


Abbildung 27: Methylierungsinterferenzanalyse des F4 Bereiches mit Kernextrakt aus NIH-3T3 Zellen. Die beiden Einzelstränge des F4 Oligonukleotids wurden einseitig radioaktiv markiert und mit dem jeweiligen, nicht markierten Gegenstrang hybridisiert. Wie in "Material und Methoden" beschrieben wurden die Oligonukleotide methyliert und einer präparativen Gelretardationsanalyse unterworfen. Die obere der beiden spezifischen Banden (F4.N.) und die freie DNA wurden ausgeschnitten und die DNA jeweils einer Piperidinspaltung unterzogen. Diese Ansätze wurden auf einem 20% Acrylamid/Harnstoffgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines solchen Gels. Die Banden, die in den Ansätzen mit der gebundenen DNA (b.) nicht oder nur abgeschwächt erscheinen im Vergleich zu den Ansätzen mit der freien DNA (f.) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Daneben ist die Sequenz des F4 Oligonukleotids dargestellt. Die Positionen, die eine Methylierungsinterferenz zeigen, sind wiederum durch Pfeile gekennzeichnet. Die abgeleitete Erkennungssequenz ist palindromisch, dies ist durch die beiden grauen Pfeile über der Sequenz angedeutet.

Es wurden Oligonukleotide hergestellt, die im abgeleiteten Bindungsbereich Mutationen trugen, und ihre Bindungsfähigkeit in der Gelretardationsanalyse durch Konkurrenz einer Bindung an das Oligonukleotid F4 überprüft. In Abbildung 28 sind die mutierten Oligonukleotide und die entsprechenden Gelretardationsanalysen dargestellt.

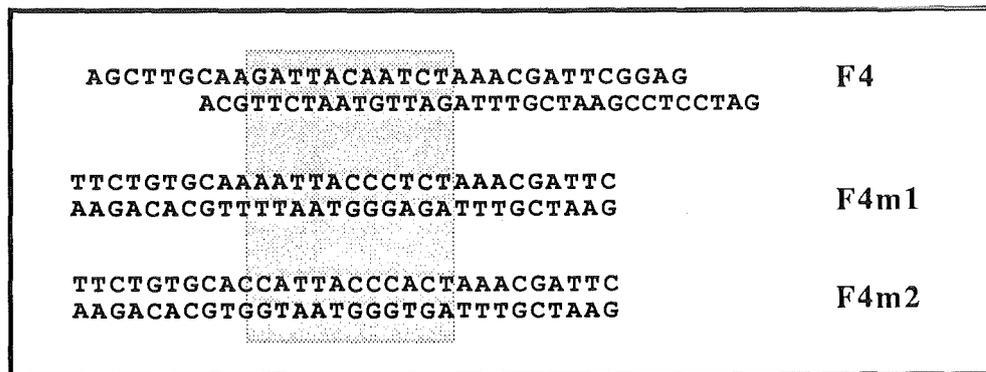
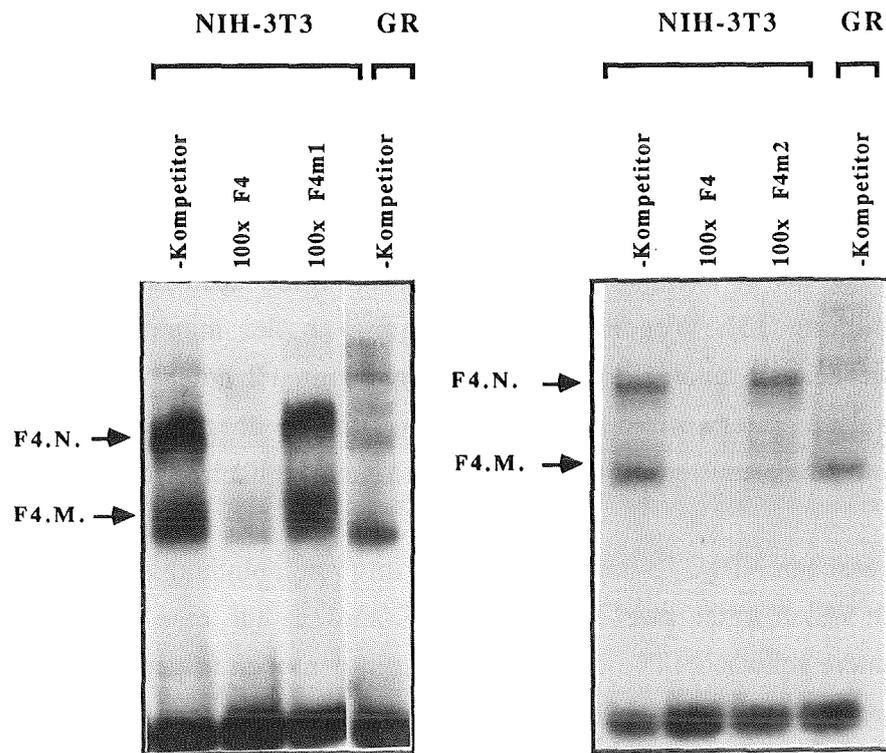


Abbildung 28: Gelretardationsanalyse mit dem F4 Oligonukleotid und 5 µg Kernextrakt aus NIH-3T3 Zellen und GR Zellen. Zur Kompetition im hundertfachen molaren Überschuß wurden neben dem F4 Oligonukleotid selbst die angegebenen mutierten Versionen des F4 Oligonukleotids eingesetzt.

Die in Oligonukleotid F4m1 gesetzten Mutationen verbieten die Bindung beider Proteine, die an den F4 Bereich in NIH-3T3 Zellen binden können, F4.M. und F4.N.. Die in Oligonukleotid F4m2 gesetzten Mutationen verhindern dagegen nur die Bindung des in NIH-3T3 Zellen zusätzlich auftretenden Proteins, F4.N.. Daraus kann unter anderem geschlossen werden, daß es sich bei F4.M. und F4.N. um zwei verschiedene Proteinkomplexe mit unterschiedlichen Erkennungspräferenzen handelt und nicht um verschiedene Modifikationen desselben Proteins. Die funktionelle Überprüfung von Mutanten des E1 Fragmentes, die die hier vorgestellten Mutationen im Bindungsbereich F4 tragen, ist Teil des Kapitels 3.2.7., das auch die funktionellen Daten enthält, die mit Punktmutanten anderer Bindungsbereiche erzielt wurden.

3.2.6. Die Regionen F12 und F2 binden dasselbe Protein: MAF

Die funktionelle 3' Deletionsanalyse des E1 Fragmentes zeigt, daß eine Deletion der Proteinbindungsregion F2 einen drastischen Abfall des Aktivierungspotentials in HC11 Zellen zur Folge hat. Etwas weniger drastisch ist dieser Abfall auch in GR Zellen zu beobachten (Abbildung 13). Wegen ihrer Beteiligung an der mammaspezifischen Aktivierung wurde deshalb auch die Proteinbindungsregion F2 einer vergleichenden Gelretardationsanalyse unterworfen (Abbildung 29), um zu überprüfen, ob sie ein spezifisches Proteinbindungsmuster mit Kernextrakt aus Mammapithelzellen zeigt.

Ein Unterschied zwischen NIH-3T3 und HC11 Zellen im Proteinbindungsmuster ist nicht sichtbar. In beiden Fällen treten zwei Protein-DNA Komplexe auf, eine obere, stärkere Bande und eine untere schwache. Die untere Bande ist in den noch folgenden, gezeigten Gelretardationsexperimenten mit demselben Oligonukleotid stärker sichtbar. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Komplex mit dem teilweise degradierten Protein, das im oberen Komplex sichtbar wird. Die untere Bande wurde bevorzugt beobachtet, wenn dieselbe Extraktpräparation mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut worden war.

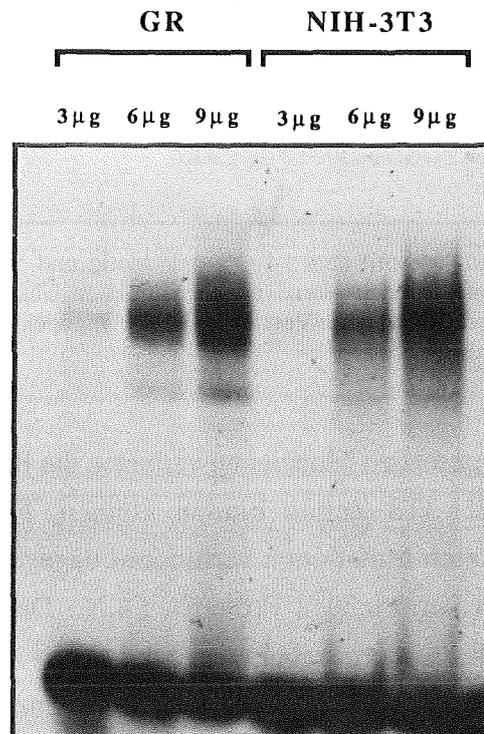


Abbildung 29: Gelretardationsanalyse mit dem Oligonukleotid F2 und Kernextrakt aus verschiedenen Zelllinien. Die verwendete Proteinmenge ist über den Spuren angegeben, ebenso die Zelllinie aus der die Kernproteine extrahiert wurden.

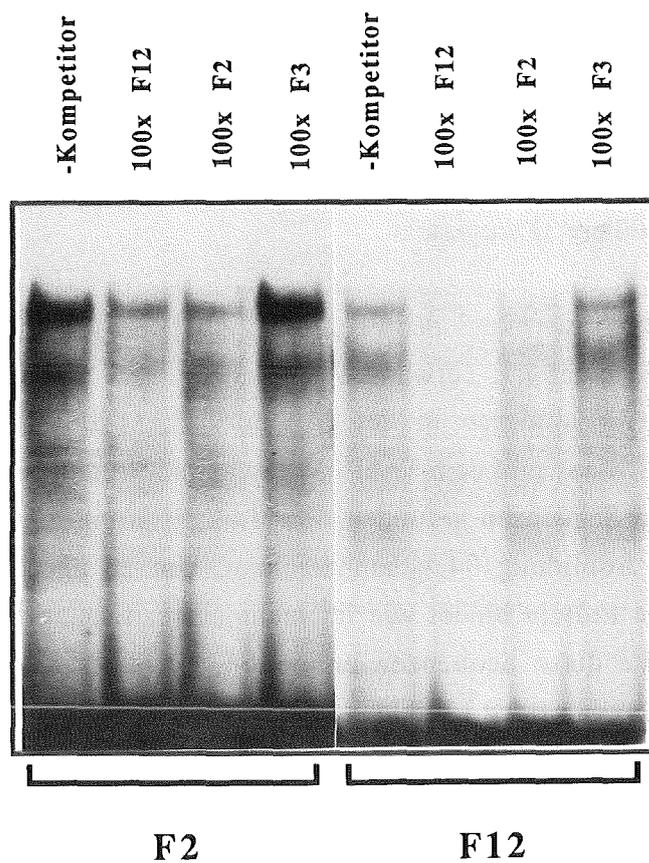


Abbildung 30: Gelretardationsanalyse mit den Oligonukleotiden F2 und F12 und 5 µg Kernextrakt aus GR Zellen. Die angegebenen Kompetitoren wurden in hundertfachem molaren Überschuß zugesetzt. Das als radioaktive Probe eingesetzte Oligonukleotid ist unter den Spuren angegeben.

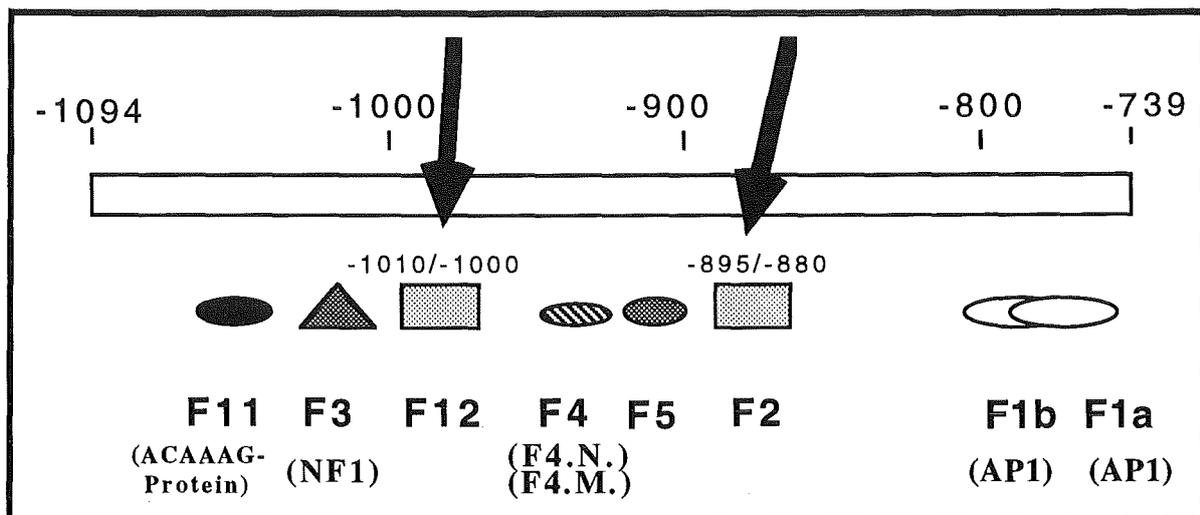


Abbildung 31: Schematische Darstellung der in der DNase I Protektionsanalyse geschützten Bereiche innerhalb des E1 Fragmentes. Bei den schon untersuchten Proteinbindungsregionen ist der bindende Faktor in Klammern angegeben. Die bindenden Faktoren sind jeweils durch eigene Symbole angegeben.

Bei Konkurrenzexperimenten wurde festgestellt, daß ein der Proteinbindungsregion F12 entsprechendes Oligonukleotid fähig ist, mit F2 um Proteinbindung zu konkurrieren. Ebenso kann F2 als Kompetitor eine Bindung an das Oligonukleotid F12 verhindern (Abbildung 30). Beide Sequenzen erkennen also dasselbe Protein. Die Lokalisierung der beiden Proteinbindungsregionen F12 und F2 innerhalb des E1 Fragmentes ist zur Orientierung in Abbildung 31 dargestellt.

Tatsächlich haben die beiden Regionen F2 und F12 über einen bestimmten Bereich, der in Abbildung 33 angedeutet ist, verwandte Sequenzen. Bei einer Sequenzanalyse der Promotoren von zwei anderen in der Milchdrüse exprimierten Genen, dem α -Lactalbuminogen der Maus und dem WAP (Whey acidic Protein) Gen der Ratte wurden ebenfalls verwandte Sequenzen gefunden. Ihre Lokalisierung innerhalb der jeweiligen Promotoren ist in Abbildung 34 gekennzeichnet. Um zu überprüfen, ob an diesen Sequenzen dasselbe Protein bindet wie im mammaspezifischen E1 Aktivator wurden Oligonukleotide, die diese Sequenzen enthielten, ebenfalls zur Konkurrenz in der Gelretardationsanalyse eingesetzt (Abbildung 32).

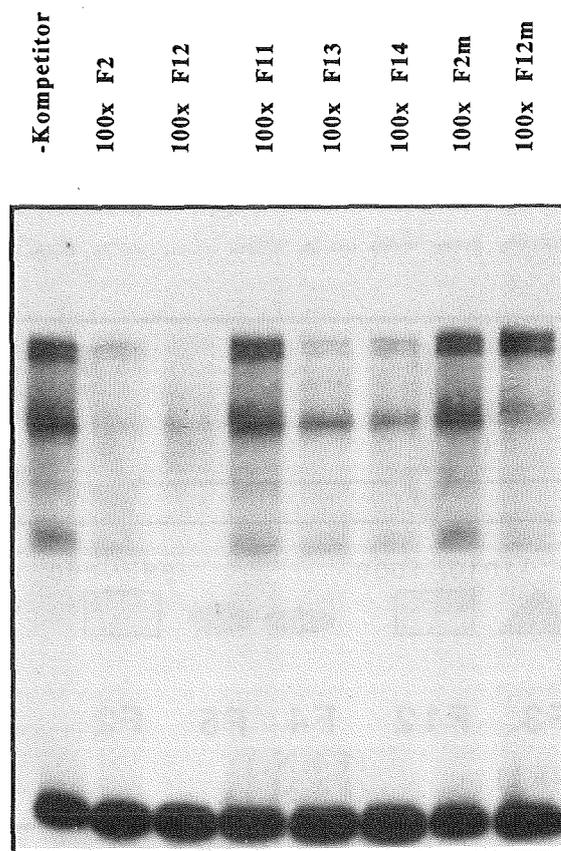


Abbildung 32: Gelretardationsanalyse mit dem Oligonukleotid F2, 5 μ g Kernextrakt aus GR Zellen und verschiedenen Kompetitoren, die über den Spuren angegeben sind. Die Kompetitoren wurden in hundertfachem molaren Überschuß eingesetzt. Ihre Sequenz ist unter Kapitel 2.1.5. aufgelistet.

Sowohl die dem α -Lactalbumin Promotor (F14) als auch die dem WAP Promotor entnommene Sequenz (F13) sind in der Lage, um die Bindung des von F2 gebundenen Proteins zu konkurrieren. Zur Herleitung einer Konsensussequenz wurden auch zwei Oligonukleotide mit Basenaustauschen gegenüber der F2 und F12 Sequenz auf ihre Bindungsfähigkeit getestet (F2m und F12m). In Abbildung 32 ist zu sehen, daß beide Sequenzen nicht mehr in der Lage sind, mit dem F2 Oligonukleotid um die Proteinbindung zu konkurrieren. Aus diesen Kompetitionsdaten kann eine Konsensussequenz für die Bindung des ab nun als MAF (für Mammazellspezifisch aktivierender Faktor) bezeichneten Faktors ableiten. Sie ist in Abbildung 33 dargestellt.

Herkunft	Sequenz	In vitro Bindung
F2, MMTV -909/-887	C T T G G G G C A A G G A C C A	+
F12, MMTV -1013/-998	A T T G G G G G A A G T T G C G	+
F13, WAP -113/-98	C A A G A A G G A A G T G T T G	+
F14, α -Lactalbumin -132/-115	A T G G A G G G A A G T T G G C	+
MAF Konsensus	G Pu Pu G C A A G T	
F2m	C T T G G G G C A A G C A A A A	-
F12m	A T T G G G T T A A G T T G C G	-

Abbildung 33: Ableitung einer Konsensus Sequenz für die Bindung des Faktors MAF. Die Bereiche des E1 Aktivators des MMTV oder die Promotorbereiche der Milchproteingene WAP und α -Lactalbumin, denen die jeweiligen Sequenzen entnommen wurden, ist unter "Herkunft" aufgeführt, ebenso die Namen der Oligonukleotide, die die jeweiligen Sequenzen enthalten. Mit + oder - ist die Fähigkeit dieser Oligonukleotide aufgeführt, in der Gelretardationsanalyse mit dem Oligonukleotid F2 um die Proteinbindung zu konkurrieren (siehe Abbildung 32). Aus diesen Daten wurden die Sequenzvoraussetzungen für die Bindung des als MAF bezeichneten Faktors abgeleitet. Übereinander stehende Basen in dieser Konsensussequenz bedeuten, daß beide Basen an dieser Position die Bindung erlauben, an den mit Pu angegebenen Positionen müssen Purinbasen (A oder G) vorliegen.

Maus WAP Promotor

```

-200
|
ATGACCACCC TTACRAAGGA CTTTTTAAAA ATGGCCTCCA TTGTGGCCCT
TACTGGTGGG AATGTTTCCT GAAAAATTTT TACCGGAGGT AACACCGGGA
-150
|
TGTTCCCTGGC AGCCTGGGCC TGCTCTCTCT GTGTGGCCAA GAAGGCACTG
ACAAGGACGG TCGGACCCGG ACGAGAGAGA CACACCGGTT CTTCCTTCAC
-100
|
TTGTAGCCCA TCTAGAGCTG TGCCAGCCTC TTCCCCACC CCACCCCAA
AACATCGGGT AGATCTCGAC ACGGTCCGGG AAGGGGGTGG GGTGGGGGTT
-50
|
AGTCTTCCTC CTGTGGGTCC TTTAAATGCA TCCCAGACAC TCAGACAGCC
TCAGAAGGAG GACACCCAGG AAATTTACGT AGGGTCTGTG AGTCTGTCCG
-10
|

```

α -Lactalbumingen der Ratte

```

-250
|
CCCTGAAGA AACHAAGCTT TACCAAAAT GAGCGAGAAG CTGGATCATT
GGGACTTTCT TCGTTTCCAA ATGGTTTTGA CTCGCTCTTC GACCTAGTAA
-200
|
GTAGAACTAT ATGGGCAGAA AACAATACTT GGTATTGACT GGATATAGGA
CATCTTGATA TACCCGTCTT TTGTTATGAA CCATAACTGA CCTATATCCT
-150
|
GGTGGGGAGG GGGCCAGGAT GGAGGAAAGT TGGCAGGCTC GCGGTTTCTA
CCACCCCTCC CACGGTCTTA CCTCGCTTCA ACCGTCGGAG CCGCAAAGAT
-100
|
TCTTGGCAGA AACTTCTCGT CATCATCATC TTCCTAGAGA GAAGGCGTGG
AGAACCCTCT TTGAAGAGCA GTAGTAGTAG AAGGATCTCT CTTCGGCACC
-50
|
TGCTAGGGCC AGAGGCCTC TTCATAAATA AAAGCAGGTG AAGTGAGTGG
ACGATCCCAG TCTCCGGAAG AAGTATTAT TTTTCGTCCAC TTCACTCACC
-10
|

```

MMTV-LTR

```

-1090
|
AAACGGATGA GCCCATCAGA CAAAGCATA CTCATTCTCT GCTGCAAACT
TTTGCTACT CGGGTAGTCT GTTCTGTAT GAGTAAGAGA CGACGTTTGA
-1040
|
TGGCTAGCT CTGCTTTGCC TGGGGCTATT GGGGAAAGTT GCGGTTTCGTG
ACGCTATCGA GACGAAACGG ACCCCGATAA CCCCCTTCAA CGCCAAGCAC
-990
|
GTGCGAGGGC TCTACCCTT GATTCTTTCA ATAATAACTC TTCTGTGCAA
CAGCGTCCCG AGAGTGGGAA CTAAGAAAGT TATTATTGAG AAGACACGTT
-940
|
GATTACAATC TAAACGATC GGAGAACTCG ACCTTCTCC TGGGGCAAGG
CTAATGTTAG ATTTGCTAAG CCTCTTGAGC TGGAAGGAGG ACCCGCTTCC
-890
|
ACCACAGCCA ACTTCCTCTT ACAAGCCGCA
TGGTGTCCGT TGAAGGAGAA TGTTCCGGCT
-870
|

```

Abbildung 34: DNA Sequenz des Promotorbereiches des WAP Gens der Ratte (Lubon et al., 1987), des α -Lactalbumingens der Maus (Quasba et al., 1984) und des Taq230 Subfragmentes des E1 Aktivators des MMTV. Bindungsstellen für NF1 sind durch ovale Kästen gekennzeichnet, Bindungsstellen für MAF durch abgerundete Rechtecke. Sequenzen mit Homologie zu der Proteinbindungsregion F11 im E1 Aktivator des MMTV sind mit Rechtecken unterlegt.

3.2.7. Ausschaltung von einzelnen Bindungsstellen im Gesamtkontext

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Proteinbindungsdaten konnten zur Synthese geeigneter Punktmutanten des E1 Fragmentes benutzt werden, in denen spezifisch die Bindung von einzelnen Proteinen ausgeschaltet ist. Die Punktmutagenese hat gegenüber der Deletionsanalyse den Vorteil, daß die Distanz bestimmter Regionen zum Promotor im Wildtypkonstrukt und in der Mutante immer gleich sind, außerdem ist gewährleistet, daß tatsächlich nur ein Protein, das man zum Beispiel aus der Gelretardationsanalyse kennt, ausgeschaltet wird. Die mutierten E1-Fragmente wurden in beiden Orientierungen vor den TK Promotor kloniert. Eine schematische Darstellung der resultierenden Konstrukte ist Abbildung 35 zu entnehmen. In der Mutante E1mF11 wurde die potentielle Proteinbindungssequenz ACAAAG durch die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym ersetzt. Diese Sequenz ist deshalb ein guter Kandidat für die Bindungssequenz eines mammaspezifischen Transkriptionsfaktors weil sie auch in den Promotoren der Milchproteingene WAP und α -Lactalbumin vorkommt. Die Lokalisierung dieser Sequenz ist in Abbildung 34 gekennzeichnet. Die Deletion dieser Sequenz führt außerdem im Fall des WAP Promotors zu einem drastischen Abfall der durch ihn vermittelten Expression des CAT Gens in transfizierten HC11 Zellen (persönliche Mitteilung von Wolfgang Doppler, Innsbruck). In der den Proteinbindungsbereich F12 betreffenden Mutante E1mF12 wurden die Basenaustausche durchgeführt, die eine in der Gelretardationsanalyse beobachtete Bindung verhindern (Siehe Abbildung 32 und 33). In der Proteinbindungsregion F3 wurden drei Basenaustausche durchgeführt, die in der Gelretardationsanalyse die Konkurrenz um die NF1 Bindung verhindern (Siehe Abbildung 23). Von den in der Mutante E1mF2 ersetzten Sequenzen wurde ebenfalls schon gezeigt, daß sie für eine spezifische Proteinbindung essentiell sind (Abbildung 32 und 33). Die in den Mutanten E1mF4.1 und E1mF4.2 ausgetauschten Basen haben, wie in Abbildung 28 gezeigt ist, unterschiedliche Bedeutung für die in diesem Bereich bindenden Proteine F4.N und F4.M. In der Mutante E1mF1 sind beide Erkennungssequenzen des E1 Aktivators für AP1 zerstört (Risse et al., 1989).

Die Punktmutanten wurden in GR, HC11 und in NIH-3T3 Zellen transient transfiziert und im Zellextrakt die CAT Aktivität gemessen. Die jeweilige Aktivierung des TK Promotors wurde aus dem Verhältnis der CAT Aktivität des jeweiligen Konstruktes mit mutiertem E1 Fragment zur CAT Aktivität eines parallel transfizierten Konstruktes ermittelt, das nur den TK Promotor vor dem CAT Gen enthielt. Die durch die Mutation entstandene Reduktion des Aktivierungspotentials des E1 Fragmentes wurde ebenfalls bestimmt. Die Resultate mehrerer solcher Transfektionsexperimente sind in Abbildung 36 tabellarisch zusammengefasst.

Konstrukt	Zelllinie					
	HC11		GR		NIH-3T3	
	Aktivierung des TK Promoters	relative Aktivierung	Aktivierung des TK Promoters	relative Aktivierung	Aktivierung des TK Promoters	relative Aktivierung
E1 syn	13.2 +/-4.5	100 %	1.9 +/-0.3	100 %	1.2 +/-0.3	100 %
E1 anti	26.2 +/-2.9	100 %	5.9 +/-1.6	100 %	2.4 +/-0.6	100 %
E1mF11 syn	1.5 +/-0.3	11 %	1.3 +/-0.2	68 %	1.3	108 %
E1mF11 anti	4.4 +/-1.8	17 %	2.8 +/-0.4	48 %	1.7	71 %
E1mF3 syn	3.7 +/-0.3	28 %	1.1 +/-0.2	58 %	1.3 +/-0.2	108 %
E1mF3 anti	10.1 +/-2.3	39 %	1.7 +/-0.3	29 %	2.3 +/-0.3	96 %
E1mF12 syn	4.8 +/-2.1	36 %	1.3 +/-0.4	68 %	0.8 +/-0.2	67 %
E1mF12 anti	9.6 +/-5.2	37 %	2.1 +/-0.2	36 %	1.8 +/-0.4	75 %
E1mF2 syn	2.3 +/-0.8	17 %	1.9 +/-0.4	100 %	0.8	67 %
E1mF2 anti	7.9 +/-1.4	30 %	4.0 +/-0.5	68 %	1.6	67 %
E1mF4.1 syn	12.4 +/-4.1	94 %	2.4 +/-1.1	126 %	1.4 +/-0.3	116 %
E1mF4.1 anti	18.1 +/-3.2	69 %	2.0 +/-0.6	34 %	2.0 +/-0.4	85 %
E1mF4.2 syn	12.1 +/-4.7	92 %	2.9 +/-0.3	152 %	1.2 +/-0.3	100 %
E1mF4.2 anti	24.8 +/-4.8	93 %	6.0 +/-0.2	102 %	2.1 +/-0.3	86 %
E1mF1 syn	12.5 +/-2.8	95 %	1.3 +/-0.3	69 %	0.9 +/-0.2	75 %
E1mF1 anti	30.9 +/-7.4	118 %	3.4 +/-0.4	58 %	1.2 +/-0.3	50 %

Abbildung 36: Aktivierung des TK Promotors durch Punktmutanten des E1 Fragmentes in verschiedenen Zelltypen. HC11, GR und NIH-3T3 Zellen wurden mit den Punktmutanten, die in Abbildung 30 aufgeführt sind, transient transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Zellextrakt die CAT Aktivität bezogen auf die Proteinmenge bestimmt. Die unter "Aktivierung des TK Promotors" angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der CAT Aktivität des jeweiligen MMTV-TK-CAT Konstruktes zu der CAT Aktivität eines parallel transfizierten TK-CAT Konstruktes ohne Insertion (pBI-CAT-8⁺). Die Werte aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen mit mindestens zwei verschiedenen Plasmidpräparationen wurden gemittelt. Die Standardabweichung ist mit +/- angegeben. Wo keine Standardabweichung angegeben ist, wurde das Experiment nur einmal durchgeführt. Unter "relative Aktivierung" ist in % die nach Mutation verbliebene Restaktivität der Aktivität des intakten E1 Fragmentes in der jeweiligen Orientierung aufgeführt.

Wegen der in diesem Zelltyp am stärksten auftretenden Aktivierung sollen zunächst vor allem die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten mit HC11 Zellen betrachtet werden. Die Zerstörung der Proteinbindungsregion F11 in der Mutante E1mF11 hat eine Reduktion der Aktivierung durch das E1 Fragment auf 10 bis 20% zur Folge. Diese Reduktion des Aktivierungspotentials ist bei beiden Orientierungen des E1 Fragmentes zu beobachten. Dies läßt darauf schließen, daß das in dieser Region bindende Protein, das als ACAAAG-Protein bezeichnet wurde, an der Aktivierung beteiligt ist. Ebenso ist der in den

Regionen F2 und F12 bindende Faktor MAF für die Aktivierung erforderlich. Die Zerstörung jeder der beiden Bindungsstellen (E1mF2 und E1mF12) hat eine Reduktion der Aktivierung auf etwa ein Drittel der Ursprungsaktivität zur Folge.

Die Zerstörung der Bindungsstelle für NF1 in der Mutante E1mF3 hinterlässt ebenfalls eine Restaktivierung von etwa einem Drittel der Ursprungsaktivität. Womit gezeigt ist, daß auch NF1 an der Aktivierung beteiligt ist. Die bisher betrachteten Proteinbindungsregionen sind auch in GR Zellen an der Aktivierung durch das E1 Fragment beteiligt. Auch in diesem Zelltyp hat ihre Ausschaltung eine mehr oder weniger deutliche Reduktion des Aktivierungspotentials zur Folge.

In der Mutante E1m F4.1 ist die Bindung von beiden am F4 Bereich bindenden Proteinen, F4.N und F4.M, ausgeschaltet. Eine Reduktion der Aktivierung in HC11 Zellen und GR Zellen kann nur bei anti Orientierung des mutierten E1 Fragmentes beobachtet werden, die Aktivierung in syn Orientierung ist nicht beeinflußt. Dies könnte auf eine Bedeutung der F4 Region für die Orientierungsspezifität der Aktivierung durch das E1 Fragment hindeuten. In der Mutante E1mF4.2 sind Basenaustausche durchgeführt, die die Bindung des in HC11 und GR Zellen vorkommenden Proteins F4.M nicht beeinflussen. Wie erwartet verhält sich diese Mutante in HC11 und GR Zellen wie ein Wildtypkonstrukt. Die Mutation in E1mF4.2. betrifft die Bindung eines Proteins, das in NIH-3T3 Zellen auftritt (F4.N.). Weder die Zerstörung der Bindungsstelle für F4.N. in der Mutante E1mF4.2 noch die Ausschaltung beider Bindungsstellen in der Mutante E1mF4.1 hat Einfluß auf die Aktivität des E1 Fragmentes in NIH-3T3 Zellen. Die in der F4 Region bindenden Proteine scheinen also die Expression in NIH-3T3 Zellen weder positiv noch negativ zu beeinflussen. Auch die Ausschaltung der anderen bis jetzt besprochenen Proteinbindungsbereiche hat kaum Einfluß auf die Aktivität des E1 Aktivators in NIH-3T3 Zellen.

Die Zerstörung der beiden AP1 Bindungsstellen in der Mutante E1m F1 vermindert das Aktivierungspotential des E1 Fragmentes in GR Zellen. In HC11 Zellen wird die Aktivierung dagegen verstärkt, wenn die AP1 Bindung verhindert wird. In GR Zellen scheint AP1 also an der Aktivierung beteiligt zu sein, in HC11 Zellen dagegen nicht. Daß die in NIH-3T3 Zellen auftretende, schwache Aktivierung in anti Orientierung durch eine Mutation der AP1 Bindungsstellen fast vollständig verschwindet, könnte darauf hindeuten, daß AP1 an der Aktivierung in diesem Zelltyp beteiligt ist.

3.2.8. Die Kombination aus einer MAF Bindungsstelle und einer NF1 Bindungsstelle stellt einen Minimalmodul für die mammaspezifische Aktivierung dar

Die 3' Deletionsanalyse zeigt, daß in HC11 Zellen das Subfragment Taq 230 (Position -1094 bis Position -858) das vollständige mammaspezifische Aktivierungspotential enthält. Die in diesem Fragment fehlenden Sequenzen des E1 Aktivators, die unter anderem die beiden AP1 Bindungsstellen enthalten, scheinen eher hemmend auf die mammaspezifische Aktivierung zu wirken. Eine 5' Deletion des E1 Fragmentes, der Sequenzen zwischen Position -1094 und -1076 fehlen, ist ebenfalls aktiver als das gesamte Fragment. Dies läßt darauf schließen, daß im Bereich zwischen Position -1076 und Position -858 Sequenzen vorhanden sind, die ausreichen um eine mammaspezifische Aktivierung zu vermitteln.

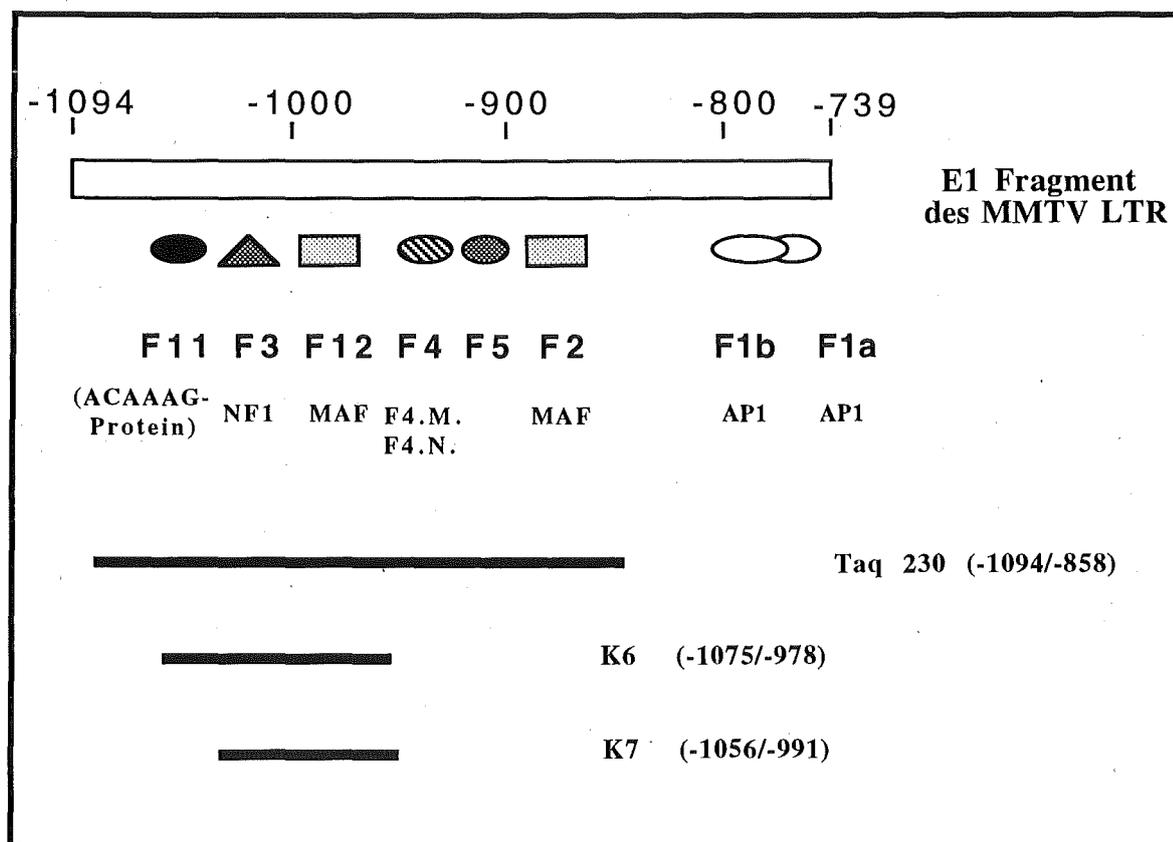


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Subfragmente des Taq 230 Fragmentes, die in beiden Orientierungen vor den TK Promotor und das CAT Gen kloniert wurden. Der Name der resultierenden Konstrukte ist mit dem Namen des inserierten Fragmentes identisch, enthält aber zusätzlich eine Angabe über die Orientierung des Fragmentes bezüglich des TK Promotors in dem jeweiligen Konstrukt. Ganz oben ist schematisch der E1 Aktivator mit dem in ihm lokalisierten Proteinbindungsbereichen dargestellt.

Es wurde von der Hypothese ausgegangen, daß es innerhalb dieses eigentlichen mammaspezifischen Aktivators einen Minimalmodul gibt, der für eine gewisse mammaspezifische Aktivierung ausreichend ist und der in seiner Aktivität durch zusätzliche Module verstärkt wird. Ein solcher Minimalmodul wird in der Analyse von Punktmutanten nicht direkt sichtbar, weil die einzelnen Module sich unter Umständen funktionell ersetzen können. Deshalb wurden die einzelnen Proteinbindungsregionen, die innerhalb dieses eigentlichen Aktivatorbereiches (-1076/-858) liegen, für eine funktionelle Analyse vor TK Promotor und CAT Gen kloniert. In gleicher Weise wurden Subfragmente des E1 Fragmentes, die Kombinationen von Bindungsstellen enthielten kloniert. Die resultierenden Konstrukte sind in Abbildung 37 schematisch dargestellt.

Keine der getesteten Bindungssequenzen hat als einfache Bindungsstelle in syn Orientierung einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität des TK Promotors in HC11 Zellen. F11, F4 und F5 verhalten sich auch als multimere Bindungsstellen neutral. Eine dreifach vorhandene NF1 Bindungsstelle, wie sie im Konstrukt F3 multi vorliegt, sorgt dagegen für eine etwa sechsfache Aktivierung des TK Promotors in HC11 Zellen und für eine zwei bis dreifache Aktivierung in GR Zellen. In NIH-3T3 Zellen hat die Insertion dieser Bindungssequenzen keinen Einfluß auf die Aktivität des TK Promotors. Auch die Insertion einer dreifachen Bindungsstelle für den Faktor MAF wie sie in den Konstrukten F12 multi und F2 multi vorliegt sorgt für eine Aktivierung des TK Promotors in HC11 Zellen und GR Zellen, nicht jedoch in NIH-3T3 Zellen. In HC11 Zellen liegt diese Aktivierung bei etwa vierfach, in GR Zellen, in denen auch die Gesamtaktivierung durch das Taq 230 Fragment schwächer ausgeprägt ist, nur bei eineinhalbfach. Die Kombination aus einer einfachen Bindungsstelle für NF1 und einer einfachen Bindungsstelle für MAF, wie sie in den Konstrukten K7 syn und K7 anti vorliegt, sorgt in beiden Orientierungen für eine fünf- bis sechsfache Aktivierung des TK Promotors in HC11 Zellen und für eine zweieinhalbfache Aktivierung in GR Zellen. In NIH-3T3 Zellen ist höchstens eine schwache Aktivierung von weniger als zweifach zu beobachten. Die Insertion des Fragmentes K6, das außer einer NF1 und einer MAF Bindungsstelle die Proteinbindungsregion F11 enthält, hat eine etwas stärkere Aktivierung des TK Promotors zur Folge als die des Fragmentes K7, das diese Bindungsstelle nicht enthält. Die Aktivierung ist in HC11 Zellen mit zehnfach in syn Orientierung wieder stärker als in GR Zellen, wo nur vierfache Aktivierung des TK Promotors bei syn Orientierung des K6 Fragmentes beobachtet wird. In NIH-3T3 Zellen verhält sich das Fragment annähernd neutral.

Konstrukt	Zelllinie		
	HC11	GR	NIH-3T3
Taq 230 syn	14.4 +/-4.5		0.9 +/-0.3
Taq 230 anti	38.5 +/-6.8	4.4 +/-1.3	
F11 syn	0.9 +/-0.3		
F11 multi	1.1 +/-0.2		
F3 syn	1.3 +/-0.4		0.6 +/-0.2
F3 multi	5.7 +/-1.8	2.6 +/-0.7	1.3 +/-0.3
F12 syn	1.4 +/-0.2		
F12 multi	4.4 +/-0.3	1.6 +/-0.2	1.1 +/-0.3
F2 syn	1.3 +/-0.4		0.8 +/-0.2
F2 multi	4.2 +/-0.6	1.7 +/-0.3	0.7 +/-0.2
F4 syn	0.6 +/-0.3		0.7 +/-0.3
F4 multi	1.2 +/-0.3		1.2 +/-0.4
F5 syn	0.9 +/-0.4		
F5 multi	1.4 +/-0.2		
K6 syn	10.6 +/-2.4	3.7 +/-1.6	1.6 +/-0.2
K6 anti	6.9 +/-3.1		
K7 syn	5.8 +/-1.4	2.6 +/-0.5	1.5 +/-0.4
K7 anti	5.2 +/-2.1	2.5 +/-0.7	

Abbildung 38: Aktivierung des TK Promotors durch Subfragmente und multimerisierte Proteinbindungsbereiche des E1 Fragmentes in verschiedenen Zelllinien. Die angegebenen Konstrukte wurden transient in die angegebenen Zelllinien transfiziert und im Zellextrakt die CAT Aktivität bestimmt. Die aufgeführten Werte entsprechen dem Verhältnis der CAT Aktivität des jeweils angegebenen Konstruktes zu der CAT Aktivität eines parallel transfizierten TK-CAT Konstruktes ohne zusätzliche Insertion (pBI-CAT-8⁺). Die Werte aus drei unabhängigen Transfektionen wurden gemittelt. Die mittlere Abweichung vom Mittelwert ist mit +/- angegeben.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß entweder multimere Bindungsstellen für die Faktoren NF1 oder MAF, oder eine Kombination aus beiden Bindungsstellen für eine mammaspezifische Aktivierung ausreichend sind. Eine jeweils einfache Bindungsstelle für einen der beiden Faktoren ist jedoch nicht ausreichend. Der in der Region F11 bindende Faktor ist auch bei multimer vorliegenden Bindungsstellen nicht zu einer mammaspezifischen Aktivierung fähig, aber er kann wahrscheinlich die durch die Faktoren NF1 und MAF vermittelte Aktivierung verstärken.

In Zusammenfassung mit den Daten aus der Punktmutagenese des E1 Elementes und aus den verschiedenen Proteinbindungsanalysen wird klar, daß die mammaspezifische Aktivität des E1 Aktivators durch ein Zusammenspiel von zwei Bindungsstellen für das MAF Protein und einer Bindungsstelle für ein Protein der NF1 Familie zustandekommt. Diese Aktivität wird durch das ACAAAG-Protein unterstützt und durch das F4.M. Protein orientierungsspezifisch moduliert.

4. Diskussion

Die Mechanismen, die zur regulierten Abrufung genetischer Information in bestimmten Geweben führen, sind nur in manchen Fällen verstanden. Während für die Leber zum Beispiel Transkriptionsfaktoren bekannt sind, die an der spezifischen Expression mehrerer in der Leber exprimierter Gene beteiligt sind (Kugler et al., 1988, Lichtensteiner und Schibler, 1989), waren für die verschiedenen in der Milchdrüse von Säugern exprimierten Gene solche regulierenden Faktoren bisher unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe eines Virus-Modells Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren charakterisiert, die die spezifische Expression eines Gens in der Milchdrüse vermitteln können. Die Untersuchung des im LTR des Maus Mamma Tumor Virus lokalisierten mammaspezifischen Aktivators liefert außerdem neue Aspekte zur Biologie dieses Virus selbst, der die Hauptursache für die Entstehung von Mammakarzinomen bei Mäusen ist und seit langem als fruchtbares Modell für die hormonelle Regulation der Genexpression dient.

Der zwischen Position -1094 und Position -739 des MMTV LTR lokalisierte Aktivator hat nicht nur Einfluß auf die gewebespezifische Expression des Virus (Stewart et al., 1988, Mink et al., 1990) sondern in der vorliegenden Arbeit konnte auch ein Einfluß dieses 5' Bereiches auf die durch das im 3' Bereich des LTR lokalisierte hormonresponsive Element vermittelte Hormonantwort nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Yanagawa und Mitarbeitern (1991), die ebenfalls auf eine Interaktion zwischen einem zwischen Position -1075 und Position -978 lokalisierten positiven regulatorischen Element und dem hormonresponsiven Element des MMTV hinweisen. Das E1 Fragment selbst vermittelt keine Induzierbarkeit durch Glucocorticoide (Wolfgang Doppler, persönliche Mitteilung).

Die durch das E1 Fragment vermittelte mammazellspezifische Expression kann auf andere Promotoren als den MMTV Promotor übertragen werden. Das von Position -1094 bis Position -739 reichende MMTV LTR Fragment, das als E1 bezeichnet wurde, vermittelt dem TK Promotor eine hohe Basalaktivität in Mammazellen, nicht jedoch in anderen Zellen. Am stärksten ausgeprägt ist diese mammaspezifische Aktivierung des TK Promotors durch das E1 Fragment in der Mammaepithelzelllinie HC11, die sich auch als besonders geeignet erwiesen hat, die hormonelle Regulation der Milchproteine WAP (Whey Acidic Protein) und β -Casein im Zellkultursystem zu untersuchen (Ball et al., 1988, Doppler et al., 1988, Doppler et al., 1991). Sie scheint am ehesten einem differenzierten Zustand von Mammaepithelzellen zu entsprechen, der offensichtlich für eine starke Aktivität des E1

Elementes notwendig ist. Die Aktivierung des β -Globin Promotors durch das E1 Fragment, die in der vorliegenden Arbeit in der Mammatumorzelllinie GR überprüft wurde, liegt viel höher als die transiente Aktivierung des TK Promotors im selben Zelltyp. Dies könnte auf den unterschiedlichen Promotor zurückzuführen sein oder aber eine starke Aktivierung ist abhängig von einer Integration des Testgens. Für letzteres sprechen Ergebnisse von Wolfgang Doppler (persönliche Mitteilung), der in stabilen Transfektionsexperimenten in HC11 Zellen noch eine sehr viel höhere Aktivierung des TK Promotors durch das E1 Fragment beobachten konnte als die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Aktivierung im transienten Ansatz.

Innerhalb der E1 Region des MMTV LTR wurden sieben Bindungsstellen für bekannte und nicht bekannte Transkriptionsfaktoren lokalisiert. Die Deletionsanalyse und die Ausschaltung der einzelnen Bindungsstellen im Gesamtkontext durch Punktmutagenese zeigt, daß mehrere dieser Bindungsstellen notwendig sind, um die spezifische Funktion des Aktivators zu erfüllen. Ein solcher modularer Aufbau ist charakteristisch für die sogenannten Enhancerelemente, die über ihre Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung über weite Distanzen und unabhängig von ihrer eigenen Orientierung definiert sind (Übersicht: Serfling et al., 1985). Die Distanzabhängigkeit der Aktivierung durch das E1 Fragment wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft. Da die funktionelle Deletionsanalyse des MMTV LTR in Zellkultur wie auch im transgenen Tier (Stewart et al., 1988) jedoch für eine Beteiligung der E1 Region in der gewebespezifischen Aktivität des im MMTV LTR mehrere hundert Basenpaare entfernten MMTV Promotors spricht, kann von einer gewissen Fernwirkung ausgegangen werden. Die Orientierungsabhängigkeit der Aktivierung durch die E1 Region spricht streng genommen gegen eine Klassifizierung des E1 Elementes als Enhancer. Das E1 Element soll deshalb wegen der Fernwirkung und des modularen Aufbaus des Elementes als enhancerähnlicher Aktivator bezeichnet werden.

Gerade die Orientierungsabhängigkeit der Aktivierung durch das E1 Fragment machen den in ihm enthaltenen Aktivator zu einem guten Kandidaten für den lange gesuchten Aktivator, der für die durch MMTV Amplifikation ausgelöste Tumorentstehung verantwortlich ist. In Mammatumoren der Maus wird in den meisten Fällen eine Integration einer proviralen MMTV Sequenz in der Nähe von bestimmten zellulären Onkogenen gefunden, die unter dem Namen "int" Gene zusammengefasst werden. Für den int-1 und den int-2 locus wurde eine Integration von proviralen Sequenzen auf beiden Seiten des int Gens und in einem maximalen Abstand von etwa zehntausend Basenpaaren vom int Promotor gefunden. Die Expression der int Gene, die normalerweise nur in embryonalen Geweben gefunden wird, ist in diesen Tumoren erhöht, geht aber in den allermeisten Fällen vom int Promotor selbst aus und nicht etwa von einem inserierten MMTV Promotor (Nusse et al., 1984, Dickson et

al., 1984, Nüsse et al., 1990). Deshalb wurde seit langem ein cis wirkendes Enhancerelement auf dem MMTV Genom postuliert, das fähig ist, den int Promotor über weite Distanzen zu aktivieren. Das HRE als bisher einziges bekanntes Enhancerelement des MMTV kommt für die Aktivierung der int Gene nicht in Frage. Sonnenberg und Mitarbeiter (1987) konnten zeigen, daß in Zellen, die einem späten Mammatumorstadium entsprechen und in denen sowohl die MMTV als auch die int-2 Expression im Vergleich zu ihren Vorläuferzellen reduziert ist, die MMTV Expression durch Glucocorticoide erhöht werden kann, nicht aber die Expression des int-2 Gens. Da die Transkriptionsrichtung der inserierten Proviren bei 5'Insertion bezüglich des int Gens immer der Transkriptionsrichtung des int Gens entgegengesetzt ist, bei 3'Insertion aber immer gleichgerichtet ist, muß man davon ausgehen, daß der für die Aktivierung der int Gene verantwortliche Enhancer auf dem MMTV Genom in seiner Wirkung orientierungsspezifisch ist. Diese Eigenschaft erfüllt der im E1 Fragment enthaltene Aktivator. Hier sollte erwähnt werden, daß das E1 Element nicht das einzige regulatorische Element des MMTV LTR ist, das orientierungsspezifische Aktivität zeigt. Ein zwischen Position -631 und Position -560 lokalisiertes negativ regulierendes Element entfaltet seinen negativen Einfluß nur in der direkten Orientierung (Mink et al., 1990). Dieses negative Element könnte daran beteiligt sein, daß der E1 Aktivator, der sowieso schon bevorzugt Promotoren aktiviert, die in ihrer transkriptionellen Orientierung dem MMTV Promotor entgegengesetzt sind, in seiner Wirkung auf den MMTV Promotor selbst gehemmt wird. Das E1 Element hat wahrscheinlich seine Hauptaufgabe in der Aktivierung von zellulären Genen, während es die gewebespezifische MMTV Expression nur mitbeeinflusst. Die gewebespezifische Expression des MMTV hängt zusätzlich von negativen Elementen ab, die die Expression zelltypspezifisch unterdrücken (Morley et al., 1987, Hsu et al., 1988, Mink et al., 1990, Ross et al., 1990).

Ein Element, das an der Orientierungsspezifität der E1 Aktivität beteiligt sein könnte ist die Proteinbindungsregion F4. Das Aktivierungspotential einer Punktmutante des E1 Fragmentes, in der die spezifische Proteinbindung an die F4 Region vollständig ausgeschaltet ist, ist orientierungsspezifisch verändert. Die Aktivierung in syn Orientierung wird durch diese Mutation nicht verändert, die Aktivierung in anti Orientierung ist dagegen reduziert. Dies könnte darauf hindeuten, daß F4 an der Orientierungsspezifität der Aktivierung durch das E1 Element beteiligt ist. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß keines der Subfragmente des E1 Fragmentes, das die F4 Region nicht enthält, eine Orientierungsabhängigkeit der Aktivierung zeigt. Als isolierte Bindungsstelle kann die Region F4 keine transkriptionelle Aktivierung vermitteln, auch nicht als multimere Bindungsstelle. Für die Proteinbindungssequenz in der F4 Region, die eine palindromische Wiederholung der Sequenz GATT darstellt, wurden keine Homologien in anderen

Promotoren von mammaspezifisch regulierten Genen gefunden (Gosh, 1990). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß diese Region etwas mit der spezifischen Funktion des E1 Elementes innerhalb des MMTV LTR zu tun hat. Neben einer in allen getesteten Zelltypen beobachteten Bindungsaktivität an die F4 Region, die als F4.M. bezeichnet wurde, tritt in den getesteten Nicht-Mamma-Zelllinien Hela und NIH-3T3 eine zusätzliche Bindungsaktivität auf, die als F4.N. bezeichnet wurde. Die Vermutung, daß das entsprechende DNA bindende Protein an der Unterdrückung der E1 Aktivität in Nicht-Mammazellen beteiligt sein könnte, wurde nicht bestätigt. Eine Punktmutante des E1 Fragmentes, in der die Bindung von F4.N. ausgeschaltet ist die Bindung von F4.M. aber unbeeinflusst bleibt, zeigt in NIH-3T3 Zellen keine höhere Aktivität als ein Wildtypfragment.

Eine im E1 Aktivator gefundene Proteinbindung, die gar nichts mit der mammaspezifischen Aktivierung zu tun hat, ist die Bindung des Transkriptionsfaktors AP1 im 3' Bereich des E1 Fragmentes. Die Untersuchung einer Punktmutante zeigt, daß die beiden AP1 Bindungsstellen nicht für die mammaspezifische Aktivierung durch das E1 Fragment in HC11 Zellen notwendig sind. Darüberhinaus haben die beiden isolierten Bindungsstellen wie zu erwarten kein mammaspezifisches Aktivierungspotential, obwohl dieses Aktivierungspotential zwischen verschiedenen Zelltypen variiert. Die starke transkriptionelle Aktivierung durch die AP1 Bindungsstellen und die Beteiligung dieser Stellen in der Gesamtaktivierung durch das E1 Fragment, die in der Mammatumorzelllinie GR beobachtet wird, stellt wahrscheinlich eine Besonderheit einer Gruppe von Tumorzelllinien dar. Die AP1 Bindungsstellen sollten also nicht als Teil des eigentlichen mammaspezifischen Aktivators betrachtet werden. Der mammaspezifische Aktivator im E1 Fragment des MMTV LTR reicht in 3'Richtung höchstens bis Position -858. Eine Deletion bis zu dieser Stelle vermindert das Aktivierungspotential in HC11 Zellen nicht, sie erhöht sie sogar. Auch in 5'Richtung kann eine Einschränkung gemacht werden, denn der äußerste 5' Bereich zwischen Position -1094 und Position --1076 hat ebenfalls einen hemmenden Einfluß auf das Aktivierungspotential. Deshalb haben auch Fragmente, die diesen 5' Bereich zusätzlich zu den noch zu besprechenden mammaspezifischen Elementen enthalten, teilweise kein deutliches Aktivierungspotential. Ein Beispiel hierfür ist das EHH genannte Fragment, das von Position -1094 bis Position -968 reicht. Mit den besprochenen Einschränkungen im 5' und 3' Bereich wurde der eigentliche mammaspezifische Aktivator innerhalb des E1 Fragmentes auf einen Bereich zwischen Position -1076 und Position -858 eingegrenzt.

Eine Proteinbindungsregion, die in diesem eigentlichen Aktivatorbereich liegt, über deren Beteiligung an der Gesamtaktivierung durch das E1 Fragment aber keine Aussage getroffen werden kann, ist die Region F5. Eine 3'Deletion des E1 Fragmentes bis Position -912 hat zwar sowohl in GR als auch in HC11 Zellen eine höhere Aktivität als eine

3' Deletionsmutante, die nur bis Position -968 reicht, aber der diese beiden Fragmente unterscheidende Sequenzbereich enthält außer der Proteinbindungsregion F5 auch die Proteinbindungsregion F4, deren Beteiligung an der Gesamtaktivierung schon besprochen wurde. Auch für die F5 Region wurden wie für die F4 Region keine homologen Sequenzen in Promotoren von anderen Genen gefunden (Gosh, 1990).

Die kleinste Einheit innerhalb des E1 Fragmentes, die noch eine mammaspezifische Aktivierung vermitteln kann, besteht aus einer Kombination aus einer NF1 Bindungsstelle und einer Bindungsstelle für den neu definierten Transkriptionsfaktor MAF (Mammazellspezifisch aktivierender Faktor). Keine der beiden Bindungsstellen vermittelt als isolierte Einheit eine transkriptionelle Aktivierung in Mammazellen, wie auch keine andere der im E1 Element lokalisierten Bindungsstellen, die die Aktivierung durch den Minimalmodul verstärken. Dies ist ein typischer Fall von Kooperation von Transkriptionsfaktoren. Die Kooperativität oder synergistische Wirkung ist dadurch definiert, daß die durch mehrere Faktoren verursachte Gesamtwirkung über eine reine Addition der Einzeleffekte hinausgeht. Die Kooperation von mehreren Bindungsstellen bei der transkriptionellen Aktivierung ist für viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren beschrieben. Die Bindungsstelle für den Glucocorticoidrezeptor kann synergistisch unter anderem mit Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF1, Sp1 und OTF kooperieren (Schüle et al., 1988). Auch für die gewebespezifische Regulation von Genen ist in vielen Fällen eine Kooperation von mehreren Bindungsstellen notwendig. Ein Beispiel ist die transkriptionelle Aktivierung eines Promotors des Hepatitis B Virus durch den leberspezifischen Transkriptionsfaktor HNF-1 und durch den Transkriptionsfaktor Oct-1. Beide Bindungsstellen sind hier für die leberspezifische Aktivierung notwendig (Zhou und Yen, 1991). Gerade bei einer gewebespezifischen Expression hat die synergistische Aktion von mehreren Bindungsstellen den Vorteil, daß mit einer limitierten Anzahl von Transkriptionsfaktoren durch die Kombination mehrerer Bindungsstellen verschiedene Spezifitäten erreicht werden können. Für den Mechanismus einer kooperativen Wirkung von Transkriptionsfaktoren kommt neben einer kooperativen Bindung an die DNA eine Protein-Protein Interaktion unter den Faktoren in Frage. Vorstellbar ist auch die Beteiligung eines nicht DNA bindenden zusätzlichen Proteins, das die Verbindung zum basalen Transkriptionsapparat herstellt.

Die Zerstörung der NF1 Bindungsstelle im Gesamtkontext des E1 Elementes hinterläßt eine Restaktivierung von etwa 30%. Dies bedeutet, daß auch die anderen im E1 Element bindenden Faktoren noch eine mammaspezifische Aktivierung vermitteln können und daß NF1 diese Aktivierung im Gesamtkontext verstärkt. Andererseits ist aber eine multimere NF1 Bindungsstelle für eine gewisse mammaspezifische Aktivierung ausreichend. NF1 ist

an sich ein ubiquitär verbreiteter Transkriptionsfaktor. Unter dem Namen NF1 werden aber verschiedene Proteine mit gleicher Bindungsspezifität zusammengefasst, die ihrerseits gewebespezifische Verteilung haben können (Rupp et al., 1990, Goyal et al., 1990). NF1 Bindungsstellen sind in mehreren Fällen an der Vermittlung einer gewebespezifischen Expression beteiligt. Beispiele dafür sind die für Epithelzellen spezifische Expression des menschlichen Papillomavirus Typ 16 (Chong et al., 1991) oder die für Adipocyten spezifische Expression des Lipidträgerproteins aP2 (Graves et al., 1991). Bezüglich der Milchdrüse ist bekannt, daß die NF1 Bindungsaktivität während der Lactation in der Milchdrüse der Kuh stark ansteigt (Ivanov et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurden keine drastischen Unterschiede in der Bindungsaktivität zwischen Mammazellen und Nicht-Mammazellen gefunden. Transkriptionsfaktoren können in Zellkultur in sehr viel geringeren Konzentrationen vorliegen als im Gewebe. So ist der mammaspezifische Transkriptionsfaktor MGF, der an der gewebespezifischen und hormonellen Regulation des β -Casein Gens beteiligt ist, in Extrakten aus laktierenden Milchdrüsen gut nachweisbar, nur schwer aber in Kernextrakten aus der Mammaepithelzelllinie HC11, obwohl seine funktionelle Aktivität in dieser Zelllinie nachgewiesen werden kann (Schmitt-Ney et al., 1991). Im Übrigen könnten sich auch geringfügige Unterschiede in der Konzentration von NF1 für eine zelltypspezifische Regulation auswirken. NF1 bindet mit höchster Affinität an die palindromische Erkennungssequenz TGG^A/C_N₅GCCA und mit geringerer Affinität an sogenannte halbe Erkennungssequenzen, die nur eine Kopie der Sequenz TGG enthalten (Rosenfeld et al., 1987, Jones et al., 1987). Im MMTV LTR tritt eine weniger affine halbe Erkennungssequenz für NF1 auf. So könnte eine ganz bestimmte Konzentration von NF1 kritisch für die Auslösung der Aktivierung sein. Interessanterweise enthalten auch die Promotoren der Gene für die Milchproteine WAP und α -Lactalbumin halbe Palindrome von NF1 Bindungsstellen. Daneben bleibt zu klären, welche NF1 Proteine in Mammazellen vorhanden sind und ob spezifische in anderen Geweben nicht vorkommenden Modifikationen vorliegen.

Die zweite Bindungsstelle, die entweder als Trimer oder in Kombination mit einer NF1 Bindungsstelle zu der Vermittlung einer mammazellspezifischen Aktivierung in der Lage ist, ist die Bindungsstelle F12. Durch Konkurrenzexperimente wurde herausgefunden, daß die Bindungsstelle F2 im MMTV E1 Fragment denselben Faktor bindet. Die Deletionsanalyse und die Analyse der entsprechenden Punktmutanten weist auf eine starke Beteiligung der Bindungsstellen F12 und F2 an der mammaspezifischen Gesamtaktivierung durch das E1 Fragment des MMTV LTR hin. Homologe Sequenzen wurden auch in den Promotoren von anderen spezifisch in der Milchdrüse exprimierten Genen gefunden. Das WAP Protein, dessen Funktion unbekannt ist, macht bei den Rodentia den Hauptanteil der Molke aus (Campbell et al., 1984), das α -Lactalbumin wird in der Milch von vielen Säugern gefunden

und beeinflusst die Lactosesynthese (Quasba und Safaya, 1984). Sequenzen aus dem Promotor des α -Lactalbumingens der Maus und aus dem Promotor des WAP Gens der Ratte sind in vitro in der Lage mit F12/F2 Sequenzen um die Proteinbindung zu konkurrieren. Im Fall des WAP Promotors der Maus war die homologe DNA Sequenz durch DNase I Protektionsexperimente mit Kernextrakt aus laktierenden Milchdrüsen als Proteinbindungsregion bekannt (Lubon und Henninghausen, 1987). Außerdem hat die Deletion dieser Sequenz im Kontext des WAP Promotors eine Verminderung der Basalaktivität in der Mammaepithelzelllinie HC11 zur Folge (Wolfgang Doppler, persönliche Mitteilung). Der an die homologen Regionen bindende Faktor wurde wegen seiner zumindest im Fall der multimeren Bindungsstellen F2 und F12 überprüften Fähigkeit zur Vermittlung einer mammazellspezifischen Transkriptionsaktivität als Mammazellspezifisch aktivierender Faktor (MAF) bezeichnet. Aus Konkurrenzexperimenten wurden die Sequenzvoraussetzungen für die Bindung von MAF abgeleitet. Es ergibt sich die Konsensussequenz $\text{GPuPuG}^{\text{C}}/\text{GAAGT}^{\text{T}}/\text{G}$. Es ist für eukaryontische Transkriptionsfaktoren typisch, daß mehrere verwandte Sequenzen die Bindung desselben Faktors zulassen. In der Bindungssequenz ist deshalb an bestimmten Positionen das Vorkommen mehrerer Basen möglich.

Für MAF wurde keine für Mammazellen spezifische Bindungsaktivität gefunden. Dies spricht entweder für eine Faktorfamilie mit gleicher Bindungsspezifität aber unterschiedlicher Gewebeverteilung und Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung oder für transkriptionell unterschiedlich aktive gewebespezifische Modifikationen desselben Faktors. Für die Modifikation von Transkriptionsfaktoren kommen Glykosylierung und Phosphorylierung in Frage. Für den Glucocorticoidrezeptor ist zum Beispiel bekannt, daß er bei Aktivierung phosphoryliert wird (Hoek und Groner, 1990). Ein Beispiel eines glycosylierten Transkriptionsfaktors ist der leberspezifische Transkriptionsfaktor HNF-1 (Lichtensteiner und Schibler, 1989). Daß die gewebespezifische Aktivität von Transkriptionsfaktoren in manchen Fällen von ihrer gewebespezifischen Modifikation abhängt, ist zwar wahrscheinlich aber bis jetzt noch in keinem Fall nachgewiesen. Eine andere Erklärung für das Zustandekommen der MAF Aktivität, spezifisch in Mammazellen, wäre auch die Beteiligung eines zusätzlichen, nicht DNA bindenden Proteins an der transkriptionellen Aktivierung durch MAF. Dieses Protein könnte seinerseits in gewebespezifischer Verteilung vorliegen. Ein Beispiel für ein Protein, das die Aktivität eines Transkriptionsfaktors beeinflusst ohne selbst an DNA zu binden ist das Protein S300-II, das die Aktivität des COUP Faktors am Ovalbumin Promotor des Hühnchens unterstützt (Tsai et al., 1987). Man muß davon ausgehen, daß Transkriptionsfaktorkomplexe, die aus mehreren auch nicht DNA bindenden Komponenten bestehen, eher die Regel als die Ausnahme bei der eukaryontischen Transkriptionskontrolle darstellen (Übersicht: Shaw, 1990).

Eine Kombination aus einer MAF Bindungsstelle und einer NF1 Bindungsstelle sorgt für eine Aktivierung des TK Promotors spezifisch in Mammazellen. Mindestens in zwei weiteren Promotoren, die eine für die Milchdrüse spezifische Expression vermitteln, dem Promotor des WAP (Whey acidic Protein) Gens der Maus und dem Promotor des α -Lactalbumin Gens der Ratte folgt ebenfalls von 5' nach 3' auf eine Bindungsstelle für NF1 eine Bindungsstelle für MAF. Während im MMTV E1 Fragment 26 bp zwischen den beiden Bindungsstellen liegen, folgen sie im WAP Promotor in einem Abstand von 30 bp und im α -Lactalbumin Gen in einem Abstand von 7 bp aufeinander. Im α -Lactalbumin Promotor wird außerdem die MAF Bindungsstelle direkt von einer zweiten NF1 Bindungsstelle gefolgt (Abbildung 29). Die Lokalisierung einer MAF Bindungsstelle in der Nachbarschaft einer NF1 Bindungsstelle in drei Promotoren von mammaspezifisch exprimierten Genen (MMTV, WAP und α -Lactalbumin) spricht wie die in dieser Arbeit vorgelegten funktionellen Daten für eine effiziente Kooperation des MAF Proteins mit NF1 in der mammaspezifischen Aktivierung. Daneben hat MAF die Fähigkeit mit sich selbst zu kooperieren. Dies ist durch die transkriptionelle Aktivierung durch eine trimere Bindungsstelle belegt. Deshalb ist es auch für eine mammazellspezifische Aktivität günstig, daß im E1 Element des MMTV LTR gleich zwei Bindungsstellen für MAF lokalisiert sind.

Eine weitere Sequenz, die in allen drei betrachteten Milchpromotern vorkommt ist die Sequenz ACAAAG, die im MMTV E1 Element in der Proteinbindungsregion F11 lokalisiert ist. Die Ersetzung der Sequenz ACAAAG im Kontext des E1 Elementes durch die Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym hat eine Reduktion des Aktivierungspotentials zur Folge, was für eine Beteiligung eines in dieser Region bindenden Faktors an der Aktivierung durch das E1 Element spricht. Außerdem hat ein Konstrukt, das die Proteinbindungsregion F11 zusätzlich zu einer MAF und einer NF1 Bindungsstelle enthält eine höhere transkriptionelle Aktivität als eines, das nur die Kombination MAF/NF1 enthält. Die Deletion der ACAAAG Sequenz im Zusammenhang des WAP Promotors führt zu einer Reduktion der Basalaktivität in der Mammaepithelzelllinie HC11. Auch dort scheint diese Sequenz also an der transkriptionellen Aktivierung beteiligt zu sein. Die Lokalisierung der Sequenz in der Nachbarschaft zu NF1 und MAF Bindungsstellen nicht nur im MMTV E1 Fragment und im WAP Promotor sondern auch im α -Lactalbumin Promotor spricht für eine Bedeutung dieser Sequenz für die mammaspezifische Expression dieser Gene. Alleine ist der in der F11 Region bindende Faktor nicht zur transkriptionellen Aktivierung in der Lage. Auch eine trimere Bindungsstelle vermittelt dem TK Promotor keine mammazellspezifische Expression. Damit gehört dieses Element zu einer anderen Klasse von Enhancerelementen als die Bindungsstellen von NF1 und MAF (Fromental et al., 1988). Auch für die die Sequenz ACAAAG enthaltende F11 Region des MMTV E1 Elementes wurde keine

spezifische Bindungsaktivität in Mammazellen gefunden. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Lefebvre und Mitarbeitern (1991), die eine spezifische Interaktion der Region - 1180 bis Position -956 des MMTV LTR, die die F11 Region enthält, mit Kernextrakt aus Mammaepithelzellen zeigen. Diese spezifische Bindung konnte in ihren Händen mit einem der Region F11 entsprechenden Oligonukleotid kompetiert werden.

Da die Kombination aus der Sequenz ACAAAG, einer halben NF1 Bindungsstelle und einer MAF Bindungsstelle in den regulatorischen Bereichen von drei spezifisch in der differenzierten Mammarydrüse exprimierten Genen auftritt und die bindenden Faktoren in zwei Fällen nachgewiesenermaßen an der mammaspezifischen Regulation beteiligt sind, kann die Kombination aus diesen drei Bindungsstellen als eine Art regulatorische "Milchkassette" bezeichnet werden. Die Kombination von drei Regulationsmodulen erhöht wahrscheinlich die Spezifität der Expression. Wenn man andere spezifisch in der Milchdrüse exprimierten Gene betrachtet, so fällt auf, daß die einzelnen in der Milchkassette vorhandenen Regulationsmodule auch in anderer Zusammensetzung und Reihenfolge auftreten können als in den drei bis jetzt betrachteten Genen. Das α -Lactalbumin Gen des Menschen enthält bei Position -140 eine potentielle MAF Bindungsstelle, die gegenüber der MAF Konsensus Sequenz nur einen Basenaustausch aufweist. Diese Bindungsstelle wird gefolgt von einer Tandemwiederholung der NF1 Bindungsstelle TGGCA. Auch die Sequenz ACAAAG tritt in diesem Promotor als Tandemwiederholung 120 bp stromaufwärts von der potentiellen MAF Bindungsstelle auf (Hall et al., 1987). Ein anderes Milchprotein ist das β -Lactoglobulin. Es macht bei Ruminantia den Hauptanteil der Molke aus, während man bei dieser Tiergruppe das WAP Protein nicht findet. Seine Hauptaufgabe besteht wahrscheinlich im Retinoltransport (Papitz et al., 1986). Im β -Lactoglobulin Gen des Schafs tritt zwischen Position -274 und Position -264 eine Tandem Wiederholung einer halben NF1 Bindungsstelle und bei Position -720 eine Sequenz auf, die gegenüber der abgeleiteten MAF Konsensussequenz nur einen Basenaustausch aufweist (Simak und Clark, 1988). Eine Homologie zur Bindungssequenz ACAAAG wird aber nicht gefunden.

Einen Sonderfall in der mammaspezifischen Genregulation scheinen die Casein Gene darzustellen. Ihre Hauptaufgabe besteht wahrscheinlich im Calciumtransport, der für die Knochenentwicklung des Neugeborenen wichtig ist (Bonsing et al., 1988). Die Expression des β -Casein Gens steigt während der Schwangerschaft schneller an als die des WAP Gens oder die MMTV Expression (Hobbs et al., 1982). Im Promotor des besonders gut untersuchten β -Casein Gens der Ratte ist keine Homologie zu einer der in der Milchkassette enthaltenen Bindungssequenzen vorhanden. Die gewebespezifische und hormonelle Regulation des β -Casein Gens ist hauptsächlich abhängig von einer Bindungsstelle für den Faktor MGF. Dieser Faktor zeigt Bindungsaktivität spezifisch in differenziertem Mammagewebe und ist für die Vermittlung der synergistischen Aktivierung durch

Glucocorticoide und Prolaktin verantwortlich (Schmitt-Ney et al., 1991). Jedes der beiden Hormone hat alleine nur einen schwachen Effekt auf die Expression des β -Casein Gens (Doppler et al., 1988). MGF Bindungsstellen sind die ersten cis wirkenden DNA Sequenzen, für die nachgewiesen werden konnte, daß sie eine Antwort auf das Peptidhormon Prolaktin vermitteln, sie werden nur in den Promotoren der Casein Gene gefunden (Michael Schmitt-Ney, persönliche Mitteilung)

Beim β -Casein Gen sind die hormonelle und die gewebespezifische Regulation nicht zu trennen, beim MMTV LTR ist dies dagegen möglich. Die im MMTV LTR enthaltene mammaspezifische Aktivator vermittelt keine Regulation durch die Hormone Dexamethason und Prolaktin in HC11 Zellen (Wolfgang Doppler, persönliche Mitteilung). Für die hormonelle Regulation ist das HRE zuständig, das Bindungsstellen für Glucocorticoid oder Progesteron Rezeptoren enthält, der mammaspezifische Aktivator kann allerdings diese Glucocorticoidantwort verstärken. Auch die die Prolaktinantwort vermittelnden Sequenzen sind im hormonresponsiven Element lokalisiert, da eine 5' Deletionsmutante des MMTV LTR, die nur noch dieses Element enthält, nicht nur eine Glucocorticoidantwort vermitteln kann sondern auch eine Erhöhung dieser Induktion durch Prolaktin (Doppler et al., 1991). An welchen Elementen Prolaktin im MMTV HRE angreift ist bis jetzt nicht geklärt..

Der WAP Promotor enthält keine Bindungsstellen für Glucocorticoidrezeptoren. Der Einfluß von Glucocorticoiden ist also im Gegensatz zum MMTV Promotor indirekt. Die durch den WAP Promotor vermittelte Expression ähnelt aber der durch den MMTV LTR vermittelten Expression insofern, daß im Gegensatz zum β -Casein Promotor auch eine deutliche Induktion durch Glucocorticoide alleine möglich ist. Prolaktin verstärkt diese Glucocorticoidantwort (Doppler et al., 1991). Wenn man berücksichtigt, daß die im WAP Promotor vorhandene Milchkasette keine hormonelle Regulation vermittelt (Wolfgang Doppler, persönliche Mitteilung), so ist davon auszugehen, daß es wie bei MMTV getrennte Elemente gibt, die die hormonelle Regulation vermitteln. Sie sind aber nicht charakterisiert.

Zusammenfassend kann man bei der mammaspezifischen Regulation von Genen wahrscheinlich mindestens zwei Typen der Regulation unterscheiden. Das β -Casein gehört zu einer Gruppe von Genen deren hormonelle und gewebespezifische Regulation im Wesentlichen durch den Faktor MGF reguliert wird. Das WAP Gen und MMTV gehören zu einer anderen Gruppe von Genen, deren mammaspezifische Regulation von den in der hier für MMTV beschriebenen Milchkasette vorkommenden Bindungssequenzen abhängt. Die nun mögliche Aufreinigung der in Mammazellen an diese Sequenzen bindenden Proteine und die Klonierung der entsprechenden Gene wird weitere Aufschlüsse über diesen Typ der mammaspezifischen Genregulation liefern.

Literaturverzeichnis

- Alton, N. und Vapnek, D. (1977). Nukleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature (London)* **282**: 864-869
- Andres, A., Schönenberger, C., Groner, B., Henninghausen, L., LeMeur, M. und Gerlinger, P. (1987). Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: tissue specificity, hormonal regulation and tumor induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 1299-1303
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1987a). 12-o-Tetradecanoyl-Phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible Enhancer element located in the 5' flanking region. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2256-2266
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987b). Phorbol ester inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739
- Angel, P., Allegretto, E.A., Okino, S.T., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T. und Karin, M. (1988). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171
- Banaiahmad, A., Muller, M., Steiner, Ch. und Renkawitz, R. (1987). Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *EMBO J.* **6**: 2297-2303
- Ball, R.K., Friis, R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W. und Groner B. (1988). Prolactin regulation of β -casein gene expression and of a cytosolic 120 kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* **7**: 2089-2095
- Bittner, J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary tumor incidence in mice. *Science* **84**: 162-169
- 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 promoter. *Cell* **50**: 347-359
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**: 335-344
- Bonsing, J., Ring, J.M., Stewart, A.F. und Mackinlay, A.G. (1988). Complete nucleotide sequence of the bovine β -casein gene. *Aust. J. Biol. Sci.* **41**: 527-537
- Briggs, R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P. und Tjian, R. (1986). Purification and Biochemical characterization of the promoter specific transcription factor, SP1. *Science*, **234**: 47-52
- Campbell, S.M. und Rosen, J.M. (1984). Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse. *Nucl. Acid Res.* **12**: 8685-8697
- Cato, A.C.B., Miksicek, R., Schütz, G., Arnemann, J. und Beato, M. (1986). The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesteron

- induction. *EMBO J.* **5**: 2237-2240
- Cato, A.C.B., Henderson, D. und Ponta, H. (1987). The hormone response element of the mouse mammary tumor virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* **6**: 363-368
- Cato, A.C.B. und Weinmann, J. (1988a). Mineralocorticoid regulation of transcription of transfected mouse mammary tumor virus DNA in cultured kidney cells. *J. Cell Biol.* **106**: 2119-2125
- Cato, A.C.B., Weinmann, J., Mink, S., Ponta, H., Henderson, D. und Sonnenberg, A. (1988b). The regulation of expression of mouse mammary tumor virus DNA by steroid hormones and growth factors. *Steroid Biochem.* **34**: 139-143
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M. und Bernard, H-U. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factor oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol.* **65**: 5933-5943
- Curran, T. und Franza, B.R. jr. (1988). Fos and Jun: The AP1 Connection. *Cell* **55**: 395-397.
- Darnell, J. E. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* **297**: 365-370
- Dickson, C., Smith, R., Brookes, S. und Peters, G. (1984). Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus : proviral activation of a cellular gene in the common integration region int 2. *Cell* **37**: 529-536
- Doppler, W., Groner, B. und Ball, R.K. (1988). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat b-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 1485-1489
- Doppler, W., Villunger, A., Jennewein, P., Groner, B. und Ball, R. (1991). Lactogenic hormone and cell type specific control of the whey acidic protein promoter in transfected mouse cells. *Mol. Endocrinol.* **5**: 1624-1632
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. und Tjian, R. (1991). Isolation of Coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**: 563-576
- Fasel, N., Pearson, K., Buetti, E. und Diggelmann H. (1982). The region of mouse mammary tumor virus DNA containing the long terminal repeat includes a long coding sequence and signals for hormonally regulated transcription. *EMBO J.* **1**: 3-7
- Foulds, L. (1956). The histological analysis of mammary tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **17**: 701-712
- Fromental, C., Kanno, M., Nomiya, H. und Chambon, P. (1988). Cooperativity and hierarchical levels of functional organization in the SV 40 enhancer. *Cell*, **54**: 943-953
- Gosh, D. (1990). A relational database of transcription factors. *Nucl. Acid Res.* **18**: 1749-1756

- Goyal, N., Knox, J. und Gronostajski, R.M. (1990). Analyses of multiple forms of nuclear factor I in human and murine cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1041-1048
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467
- Graves, R.A., Tontonoz, P., Ross, S.R. und Spiegelman, B.M. (1991). Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes & Dev.* **5**: 428-437
- Hall, L., Emery, D.C., Davies, M.S., Parker, D. und Craig, R.K. (1987). Organization and sequence of the human α -Lactalbumin gene. *Biochem. J.* **242**: 735-742
- Henninghausen, L.G. und Sippel, A.E. (1982). Characterization and cloning of the mRNAs specific for the lactating mouse mammary gland. *Eur. J. Biochem.* **125**: 131-141
- Henrard, D. und Ross, S. (1988). Endogenous mouse mammary tumor virus is expressed in several organs in addition to the mammary gland. *J. Virol.* **62**: 3046-3049
- Herr, W. und Clarke, J. (1986). The SV 40 enhancer is composed of multiple functional elements that can compensate for one another. *Cell* **45**: 461-470
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. Und Pease, L.R. (1989). Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59
- Hobbs, A.A., Richards, D.A., Kessler, D.J. und Rosen, J.M. (1982). Complex hormonal regulation of casein gene expression. *J. Biol. Chem.* **257**: 3598-3605
- Hoek, W. und Groner, B. (1990) Hormone dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the aminoterminal transactivation domain. *J. Biol. Chem.* **265**: 5403-5408
- Horwitz, K.B., Zava, D.T., Thilagar, A.K., Jensen, E.M. und McGuire, W.L. (1978). Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **38**: 2434-2437
- Hsu, C.L., Fabritius, C. und Dudley, J. (1988). Mouse mammary tumor virus proviruses in T-cell lymphomas lack a negative regulatory element in the long terminal repeat. *J. Virol.* **62**: 4644-4652
- Hynes, N., Van Ooyen, N. Kennedy, P., Herrlich, H., Ponta, H. und Groner, B. (1983). Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid responsive expression of mouse mammary tumor virus and an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 3637-3641
- Ivanov, V., Kabishev, A., Gorodetsky, S., Gribanovsky, V und Williams, R.O. (1990). Activation of the transcription factors NF1 and NF-kB in bovine mammary gland during lactation. *Mol. Biol. (Moskau)* **24**: 1605-1615
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J. und Tjian, R. (1987). A cellular DNA binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48**: 79-89

- Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G., Heitlinger, E. und Cato, A.C.B. (1988). A 13 bp palindrom is a functional estrogen responsive element and interacts with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.* **16**: 633-674
- Kugler, W., Wagner, U. und Ryffel, G. (1988). Tissue specificity of liver gene expression: a common liver specific promoter element. *Nucl. Acids Res.* **16**: 3165-3174
- Krusekopf, S., Chaucherau, A., Milgrom, E., Henderson, D. und Cato, A.C.B. (1991). Co-operation of progestational steroids with epidermal growth factor in activation of gene expression in mammary tumor cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **40**: 239-245
- Larsen, R., Harney, J.W. und Moore, D.D. (1986). Repression mediates cell-type specific expression of the rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 8283-8287
- Lee, W., Mitchel, P. und Tjian, R. (1987). Purified transcriptionfactor AP1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752
- Lefebvre, P., Berard, D.S., Cordingley, M.G. und Hager, G.L. (1991). Two regions of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat regulate the activity of its promoter in mammary cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2529-2537
- Lichtensteiner, S. und Schibler, U. (1989). A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. *Cell* **57**: 1179-1187
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Proteinmeasurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Lubon, H. und Henninghausen, L. (1987). Nuclear proteins from lactating mammary glands bind to the promoter of a milk protein gene. *Nucleic Acid Res.* **15**: 2103-2121
- Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980). Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* **65**: 499-459
- Messing, J., Crea, R. und Seeburg, P.H. (1981). A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acid Res.* **9**: 309-321
- Michalides, R. und Nusse, R. (1981). Molecular biology of the mouse mammary tumor virus. in Hilgers, J. und Sluysen, M. (Ed.), *Mammary tumors of the mouse.* Biomedical Press, Elsevier, Amsterdam: 117-200
- Mink, S., Ponta, H. und Cato, A.C.B. (1990). The long terminal repeat region of the mouse mammary tumor virus contains multiple regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2017-2024
- Miksicek, R., Borgmeyer, U. und Nowock, J. (1987). Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* **6**: 1355-1360
- Mitchell, P.J. und Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378

- Morley, K.L., Toohey, M.G. und Peterson, D.O. (1987). Transcriptional repression of a hormone responsive promoter. *Nucl. Acid Res.* **15**: 6973-6988
- Moore, R., Casey, G., Brookes, S., Dixon, M., Peters, G. und Dickson, C. (1986). Sequence, topography and protein coding potential of mouse int-2: a putative oncogene activated by mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* **5**: 519-524
- Müller, H und Schaffner, W. (1990). Transcriptional enhancers can act in trans. *Trends Genet.* **6**: 300-304
- Munos, B. und Bolander, F.F. (1989). Prolactin regulation of mouse mammary tumor virus (MMTV) expression in normal mouse mammary epithelium. *Mol. Cell. Endocrinol.* **62**: 23-29
- Nakajima N., Horikoshi, M. und Roeder, R.G. (1988). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TF II D. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4027-4040
- Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y.K.T. und Varmus, H.E. (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* **307**: 131-136
- Nusse, R. (1986). The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion. *Trends Genet.* **2**: 244-247
- Nusse, R., Theunissen, H., Wagenaar, E., Rijsewijk, F., Gennissen, A., Otte, A., Schuurin, E. und van Ooyen, A. (1990). The wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4170-4179
- Papitz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. und Kraulis, P.J. (1986). The structure of b-Lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* **324**: 383-385
- Payar, F., DeFranco, D., Firestone, G.L., Edgar, B., Wrange, Ö., Okret, S., Gustafson, J-A. und Yamamoto, K.R. (1983). Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* **35**: 381-392
- Picard, D. und Schaffner, W. (1984). A lymphocyte specific enhancer in the mouse immunoglobulin κ gene. *Nature* **315**: 80-82
- Pina, B., Brüggemeier, U. und Beato, M. (1990). Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* **60**: 719-731
- Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P. Hynes, N.E. und Groner, B. (1985). Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat can be dissociated from the proviral promoter and has enhancer properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1020-1024
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**: 683-689

- Quasba, P.K. und Safaya, S.K. (1984). Similarity of the nucleotide sequences of rat α -lactalbumin and chicken lysozyme genes. *Nature* **308**: 377-380
- Renkawitz, R. (1990). Transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Genet.* **6**: 192-197
- Ringold, G., Lasfargues, E.Y., Bishop, J.M. und Varmus, H.E. (1975). Production of mammary tumor virus by cultured cells in the absence and presence of hormones; assay by molecular hybridization. *Virology* **65**: 135-147
- Risse, G., Jooss, K., Neuberg, M., Brüller, H. und Müller, R. (1989). Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by Fos Protein Komplexes. *EMBO J.* **8**: 3825-3832
- Rosenfeld, P.J., O'Neill, E.A., Wides, R.J. und Kelly, T.J. (1987). Sequence specific interactions between cellular DNA-binding proteins and the adenovirus origin of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 875-886
- Ross, S. und Solter, D. (1985). Glucocorticoid regulation of mouse mammary tumor virus sequences in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 5880-5884
- Ross, S., Hsu, C.L.L., Choi, Y., Mok, E. und Dudley, J.P. (1990). Negative regulation in correct tissue-specific expression of mouse mammary tumor virus in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5822-5829
- Rupp, R.A.W., Kruse, U., Multhaup, G., Göbel, U., Beyreuther, K. und Sippel, A.E. (1990). Chicken NF1/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NF1-A, NF1-B and NF1-C with homologues in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2607-2616
- Rupp, W. und Weintraub, H. (1991). Ubiquitous Myo D transcription at the midblastula transition precedes induction-dependent Myo D expression in presumptive mesoderm of *X. laevis*. *Cell* **65**: 927-937
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P.C. und Tjian, R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* **334**: 218-224
- Sassone-Corsi, P. und Borrelli, E. (1986). Transcriptional regulation by trans-acting factors. *Trends Genet.* **2**: 15-219
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H.M. und Beato M. (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature* **304**: 749-352
- Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C. und Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* **242**: 1418-1420
- Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R.K. und Groner, B. (1991). β -Casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3745-3755

- Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends Genet.* **1**: 224-230
- Shaw, P.E. (1990). Multicomponent transcription factor complexes: the exception of the rule?. *The New Biologist* **2**: 111-118
- Simak, A. und Clark, A.J. (1988). Characterization of the gene encoding ovine beta-lactoglobulin. Similarity to the genes for retinol binding protein and other secretory proteins. *J. Mol. Biol.* **199**: 415-426
- Sonnenberg, A., van Balen, P., Hilgers, J., Schuurin, E. und Nusse, R. (1987). Oncogene expression during progression of mouse mammary tumor cells; activity of a proviral enhancer and the resulting expression int-2 is influenced by the state of differentiation. *EMBO J.* **6**: 121-125
- Sonnenberg, A., Daams, H., Calafat, J. und Hilgers, J. (1986). In vitro differentiation and progression of mouse mammary tumor cells. *Cancer Res.* **46**: 5913-5922
- Southern, P.J. und Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. of Molecular and Applied Genetics* **1**: 327-341
- Stewart, T.A., Hollingshead, P.G. und Pitts, S.L. (1988). Multiple regulatory domains in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat revealed by analysis of fusion genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 473-479
- Topper, Y.J. und Freeman, C.S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Reviews* **60**: 1049-1105
- Tsai, S.Y., Sagami, I., Wang, H., Tsai, M.J und O'Malley, W. (1987). Interactions between a DNA-binding transcription factor (COUP) and a non-DNA binding factor (S300-II). *Cell* **50**: 701-709
- Varmus, H. (1983). Retroviruses. in Shapiro, J. (Verl.), *Mobile genetic elements.* Acad. Press, Orlando: 411-503
- von der Ahe, D., Janich, S., Scheiderei, C., Renkawitz, R., Schütz, G. und Beato, M. (1985). Glucocorticoid and progesteron receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature* **313**: 706-709
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, C. und Lassar, A.L. (1991). Myo D: a nodal point during the specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**: 761-766
- Westin, G., Gerster, T., Müller, M.M., Schaffner, G. und Schaffner, W. (1987). OVEC, a versatile system to study transcription in mammalian cells and cell-free extracts. *Nucleic Acids Res.* **15**: 6787-6790
- Yanagawa, S., Tanaka, H. und Ishimoto, A. (1991). Identification of a novel mammary cell line specific enhancer element in the long terminal repeat of mouse mammary tumor virus, which interacts with its hormone responsive element. *J. Virol.* **65**: 526-531

Zhou, D. und Yen, T.S. (1991). The ubiquitous transcription factor oct-1 and the liver-specific factor HNF-1 are both required to activate transcription of a hepatitis B virus promoter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1353-1359

Abkürzungen

A:	Adenin
ATP:	Adenosintriphosphat
bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserum Albumin
C:	Cytosin
CAT:	Chloramphenicol Acetyltransferase
ci:	Curie
cm:	Zentimeter
cpm:	Zerfälle pro Minute
Dex:	Dexamethason
DMS:	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse:	Desoxyribonuklease
dNTP:	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT:	Dithiothreitol
E:	Extinktion
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS:	Fötale Kälberserum
G:	Guanin
h:	Stunde
Hepes:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRE:	Hormon responsives Element
kb:	1000 Basenpaare
LTR:	"Long Terminal Repeat", lange terminale Wiederholung der proviralen Form eines Retrovirus
M:	molar
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
mRNA:	Boten RNA
mg:	Milligramm
min:	Minuten
µg:	Mikrogramm
mM:	millimolar
NaAcetat:	Natriumacetat
ng:	Nanogramm
nt:	Nukleotide
poly-A+-RNA:	polyadenylierte RNA
RNA:	Ribonukleinsäure
RNase:	Ribonuklease
SDS:	Natriumdodecylsulfat
sec:	Sekunden
T:	Thymin
TK:	Thymidinkinase
t-RNA:	Transfer RNA
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED:	N,N,N',N''-tetramethyl-ethylendiamin
Upm:	Umdrehungen pro Minute
V:	Volt
Verl.:	Verleger
WAP	Whey Acidic Protein