

KfK 4750
Juni 1990

Glucocorticoid-induzierte Repression der Kollagenase-I Synthese: Vermittlung durch den Transkriptionsfaktor AP-1

C. Jonat
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik und für Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4750

Glucocorticoid-induzierte Repression der Kollagenase-I Synthese:

Vermittlung durch den Transkriptionsfaktor AP-1

Carsten Jonat

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
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

Glucocorticoidhormone unterdrücken Entzündungsprozesse und die Phorbol ester-vermittelte Tumor-Promotion im Organismus. Neben ihrer Gen-aktivierenden Wirkung haben sie die Eigenschaft, die Expression einiger Gene, darunter menschliche Kollagenase-I, zu vermindern. In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus untersucht, durch den Glucocorticoidhormone die Produktion dieser Metalloprotease in der Zelle hemmen. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Inhibition der Expression des menschlichen Kollagenase-I Gens durch Glucocorticoidhormone erfolgt auf Transkriptionsebene. Die Transkription des Gens wird hauptsächlich über das Sequenzelement im Promoterbereich des Gens reguliert, über das auch die transkriptionssteigernde Wirkung der Phorbol ester vermittelt wird. An dieses Sequenzelement bindet der Transkriptionsfaktor AP-1. Sowohl die Inhibition der basalen als auch die Verminderung der Phorbol ester-induzierten Transkription des Gens durch Glucocorticoide erfolgen spezifisch über das AP-1-bindende Sequenzelement. Die Inhibition des Kollagenase-I Gens durch Glucocorticoidhormone erfolgt auch ohne die Neusynthese von Protein, erfordert aber den Glucocorticoidhormon-Rezeptor. Es kann daher eine direkte Wirkung des aktivierten Rezeptors auf die Transkriptionsmaschinerie des Kollagenase-I Gens angenommen werden. Die negative Regulation der Kollagenase-I Synthese benötigt eine 10-fach niedrigere Hormon-Konzentration als die Aktivierung Hormon-induzierbarer Gene. Zur Aktivierung Hormon-induzierbarer Gene bindet der aktivierte Rezeptor direkt an spezifische Sequenzelemente im Promoterbereich. Die Bindung des Rezeptors an die DNA scheint dagegen zur Inhibition der Kollagenase-I Transkription nicht erforderlich zu sein: Der aktivierte Rezeptor kann *in vitro* über Protein-Protein Wechselwirkung mit dem Proteinkomplex AP-1 interagieren. Durch Hormon-Einwirkung werden weder die DNA-Bindung von AP-1, noch seine Zusammensetzung verändert. Demnach scheint eine Blockierung der transaktivierenden Domäne des DNA-gebundenen Proteinkomplexes AP-1 durch den Hormonrezeptor die Repression der Kollagenase-I Transkription zu verursachen. Auch die Transkription anderer, durch TPA aktivierter Gene (*c-jun* und Metallothionein-IIA) wird bei niedriger Hormonkonzentration durch Glucocorticoidhormone reprimiert; bei höherer

Hormonkonzentration werden diese Gene jedoch - wahrscheinlich durch Bindung des Rezeptors an die DNA - durch die Hormongabe induziert.

Der vorgeschlagene Mechanismus der negativen Regulation der Genexpression durch Glucocorticoidhormone ist neu: die Blockierung von Transkriptionsfaktoren (AP-1) aufgrund direkter Protein-Protein Wechselwirkung ist eine bisher nicht beschriebene Eigenschaft des aktivierten Glucocorticoidhormon-Rezeptorproteins.

Glucocorticoid induced repression of Collagenase-I synthesis is mediated through the transcription factor AP-1

Summary

Glucocorticoid hormones suppress inflammatory processes as well as phorbol ester mediated tumor promotion in the organism. This suggests that besides their gene inducing ability those hormones may also suppress the transcription of genes. This is shown in the present work for the human collagenase-I gene, and the molecular mechanism for repression is analyzed. The results can be summarized as follows:

The inhibition of the human collagenase-I gene expression by glucocorticoid hormones occurs at the level of transcription. The transcription of this gene is mainly regulated through the sequence element which also mediates the transcription-enhancing action of phorbol esters, located between positions -73 and -65 with respect to the start site of transcription. The transcription factor AP-1 binds to this sequence element. Both the inhibition of the basal and the phorbol ester induced transcription of the gene by glucocorticoids are mediated through the AP-1-binding sequence. The inhibition is independent of ongoing protein synthesis, but requires the activated glucocorticoid receptor. Therefore the activated receptor may directly inhibit the transcription complex operating at the collagenase-I gene. The repression of collagenase-I synthesis requires a 10-fold lower hormone concentration as compared to the activation of hormone-inducible genes. To activate hormone-inducible genes the activated receptor binds directly to specific sequence elements within the promoter region. In contrast the binding of the receptor to the collagenase promoter does not seem to be necessary for the inhibition of collagenase-I transcription: i) The repressible promoter constructs do not contain a consensus binding site for the glucocorticoid receptor. ii) Receptor mutants lacking the DNA-binding site still repress, albeit to a lesser extent. iii) Upon hormone treatment neither the composition of AP-1 nor its binding to DNA are altered. iv) *In vitro* the activated receptor is able to interact via protein-protein contact with the protein complex AP-1. These findings suggest that a blockage of the transactivating domain of the DNA-associated protein complex AP-1 by the hormone receptor may cause the repression of collagenase-I transcription. The transcription of other genes that are activated by AP-1 (c-jun and Metallothionein-IIA) is also downregulated at low glucocorticoid hormone concentrations; at higher hormone doses these genes are, however, induced by hormone

treatment, presumably by the binding of the receptor to the promoter of these genes. The suggested mechanism of negative regulation of gene expression by glucocorticoid hormones is new: the blockage of transcription factors (AP-1) by direct protein-protein interaction is a property of the activated glucocorticoid receptor that has not been described so far.

Zusammenfassung	A
Summary	C
Inhaltsverzeichnis	E
Abkürzungen	1
Einleitung	3
Materialien	10
Methoden:	13
1. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	13
2. Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform	13
3. Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol	13
4. Herstellung kompetenter Bakterien	13
5. Transformation von kompetenten Bakterien	14
6. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	14
7. Sequenzierung von DNA nach der Didesoxy-Methode	15
8. Auftrennen von DNA-Fragmenten	16
9. Isolation von DNA aus Gelmaterial	17
10. Restriktionsverdau	17
11. Dephosphorylierung	17
12. Entfernen von Einzelstrang-Überhängen	18
13. Ligation von Linkern	18
14. Ligation	18
15. Mutagenese von Plasmid-DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden	19
16. Markierung von DNA mit Radionukleotiden	20
17. Gelfiltration	21
18. Isolierung von mRNA aus eukaryontischen Zellen	21
19. Northern Transfer	21
20. Hybridisierung von nick-translatierter DNA an auf Nitrozellulosefilter fixierte Nukleinsäure	22

21. Auftrennung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen	22
22. S1-Analyse	23
23. Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen	23
24. Proteinbestimmung nach Lowry	24
25. Konzentrierung einer Proteinlösung	24
26. Aufbereitung von Oligonukleotiden zur Ligation	24
27. Reinigung von Oligonukleotiden	25
28. Protein-Bindung an DNA, Band-Shift Assay	25
29. Proteinbindung an DNA mit Crosslink	26
30. Bindung von Proteinextrakten an Sepharose-immobilisierte Oligonukleotide	26
31. SDS-Gelelektrophorese	26
32. Western Analyse	27
33. Immunpräzipitation	28
34. Zellkultur	28
35. Transiente Transfektion	29
36. Bestimmung der Chloramphenicol Acetyltransferase Aktivität (CAT- Assay)	30
Plasmid-Konstruktionen	31
Ergebnisse	35
I) Die Phorbolster-induzierte Synthese von Kollagenase-I wird durch Dexamethason spezifisch gehemmt.	35
II) Repression der Kollagenase-I mRNA Akkumulation durch Dexamethason.	37
III) Die Repression der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide findet auf Transkriptionsebene statt.	41
IV) Das auf Phorbolster reagierende Element (TRE) ist die Zielsequenz für die negative Regulation des Kollagenase-I Promoters durch Dexamethason.	44
V) Die Expressionshemmung durch Glucocorticoide ist für das auf Phorbolster reagierende Element (TRE) der Kollagenase-I spezifisch.	48

VI) Die Repression der Kollagenase-I Transkription erfolgt unabhängig von Protein Neu-Synthese.	52
VII) Die Rolle des Glucocorticoidrezeptors in der negativen Regulation des Kollagenase-I Gens durch Dexamethason.	55
VIII) Zur Repression der Kollagenase-I Expression wird weniger aktivierter Glucocorticoidrezeptor benötigt als zur Induktion Hormon-induzierter Gene.	66
IX) Das Antiglucocorticoid RU 486 blockiert die trans-reprimierende Funktion des Steroidrezeptors.	68
X) Die Blockierung der trans-aktivierenden TRE-Funktion durch Glucocorticoide erfolgt unabhängig von weiteren Promoter-Elementen.	72
XI) Auch im Dexamethason-reprimierten Zustand des Promoters bindet der Transkriptionsfaktor AP-1 an das Phorbol ester-induzierbare Enhancerelement TRE.	74
XII) Der aktivierte Glucocorticoidrezeptor kann an den Transkriptionsfaktor AP-1 binden.	81
XIII) Die Überexpression von Fos blockiert sowohl die positive als auch die negative Wirkung des aktivierten Glucocorticoidrezeptors auf die Genexpression.	87
XIV) Gene, die durch Glucocorticoidhormon gleichzeitig aktiviert und reprimiert werden: Metallothionein-IIA und c-jun.	90
Diskussion	99
Literatur	106
Lebenslauf	

Abkürzungen:

ACA	Acetyliertes Chloramphenicol
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
AP-1	Aktivierender Proteinkomplex 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
CA	Chloramphenicol
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CRE	auf cyclisches AMP reagierender Enhancer
Cx	Cycloheximid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
DEAE	Diethylaminoethyl
Dex	Dexamethason
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTBP	Ditmethyl-3,3'-dithiobis-Propionimidat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz
EPIF	extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GRE	Glucocorticoid-Rezeptor Erkennungssequenz
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunden
HSP	Hitze Schock Protein
IL-1	Interleukin 1
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
MES	2-N-Morpholinoethan-Sulfonsäure
min	Minuten
MRE	auf Metalle reagierendes Element
P/S	Penicillin/Streptomycin
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Rous Sarcoma Virus
RU 486	17 β -hydroxy-11 β -(4-dimethylaminophenyl)-17 α -(1-propynyl)-Östra-4,9-dien-3-on
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SRE	auf Serum reagierendes Element
SV, SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tk	Thymidinkinase
TNF- α	Tumor-Necrosis-Faktor Alpha
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UV	ultraviolettes Licht
U	Einheiten
V	Volt

Einleitung

Das Schicksal einer Zelle im Organismus ist wesentlich von Faktoren abhängig, die von außen auf sie einwirken. Das Spektrum dieser Faktoren ist vielfältig: es reicht von Nährstoffen über physiologische Signalsubstanzen bis zu unphysiologischen Reizen, die häufig den gesamten Organismus oder wenigstens größere Bereiche des Organismus treffen und unmittelbar oder vermittelt durch die physiologischen Signalsubstanzen die einzelne Zelle erreichen. All diesen Faktoren ist gemeinsam, daß sie in der Zelle eine Veränderung der Genexpression hervorrufen, die das Muster der in der Zelle produzierten Proteine und damit ihre Eigenschaften und Funktionen beeinflusst. Die Induktion bzw. Repression der Proteine kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen: die Stabilität des Proteins selbst, die Translationsrate von mRNA zu Protein, die Stabilität der mRNA und die Transkriptionsrate, also die Übersetzung der DNA des Gens in mRNA, können variiert werden.

Die für die Entwicklung und Erhaltung des Organismus verantwortlichen molekularen Mechanismen greifen hauptsächlich auf der Ebene der Gentranskription ein (Darnell, 1982; Serfling et al., 1985). Wie bereits für prokaryontische Gene beschrieben, scheint diese Regulation der Genaktivität bei Eukaryonten ebenfalls auf der Wechselwirkung von trans-wirkenden Protein-Faktoren, den sogenannten Transkriptionsfaktoren, mit cis-Elementen in der DNA zu beruhen (Müller et al., 1984; Ptashne, 1988; Guarente, 1988; Müller et al., 1988; Mitchell und Tjian, 1989.).

Die Organisation eukaryontischer Gene scheint allerdings wesentlich komplexer zu sein. Zahlreiche, meist in der 5'-flankierenden Region lokalisierte cis-wirkende DNA Elemente regulieren im Zusammenspiel mit verschiedenen trans-wirkenden Faktoren die genaue und effiziente Initiation der Transkription (Serfling et al., 1985; Müller et al., 1988). Per Definition wird dabei zwischen Promoter-Elementen und Enhancern unterschieden. Promoter-Elemente sind in weiten Grenzen positions- und orientierungsabhängige Sequenzmotive. Zu ihnen zählen z.B. die die Positionen der Transkriptionsinitiation bestimmende AT-reiche Goldberg-Hogness- oder TATA-Box, die sich meist 25-30 bp 5' von der mRNA-Startstelle befindet (Übersicht in Müller et al., 1988), oder das in einigen eukaryontischen Genen identifizierte Sequenzmotiv CCAAT (CAAT-Box; Efstratiadis et al., 1980), sowie eine GC-reiche Sequenz (GC-Box; Benoist und Chambon, 1981; Myers et al., 1981; Everett et al., 1983). Sie befinden sich überwiegend 40-100 bp 5' vor

der Startstelle der Transkription und scheinen für die Effizienz der Initiation der Transkription wichtig zu sein. Diese Elemente sind für die Funktion eines Promoters nicht unbedingt erforderlich, regulieren jedoch häufig gemeinsam, wie z.B. beim Thymidin-Kinase-Gen des Herpes Simplex Virus (McKnight et al., 1984), die Aktivität des Promoters.

Enhancer sind ebenfalls cis-wirkende DNA-Elemente, die bis zu 200 bp groß sein können und, unabhängig von ihrer Position und Orientierung, die Aktivität eines Promoters beeinflussen können. In der Regel wird der nächstgelegene Promoter bevorzugt reguliert (Übersicht in Serfling et al., 1985). Enhancer können 5', in manchen Fällen auch 3' von der Transkriptionsstartstelle lokalisiert sein. Es gibt kein Sequenzmotiv, das allen Enhancern gemeinsam ist. Die meisten von ihnen besitzen jedoch palindromische Struktur, weisen also in beiden DNA Einzelsträngen die gleiche Sequenz in entgegengesetzter Orientierung auf.

Die strukturelle Unterscheidung zwischen Enhancer- und Promoterelementen scheint in letzter Zeit immer weniger sinnvoll. Der transkriptionssteigernde Effekt wird vermutlich nicht, wie ursprünglich angenommen, durch eine funktionelle Einheit mit klar definierten Grenzen, sondern viel eher durch die Kombination von mehreren dieser Elemente vermittelt (Sassone-Corsi und Borelli, 1986). Eine besondere Eigenschaft vieler Enhancer ist aber, daß sie mit trans-wirkenden Faktoren in Wechselwirkung treten, die ein Gen nur unter bestimmten Bedingungen regulieren; die Änderung der Transkription findet nur dann statt, wenn der entsprechende Transkriptionsfaktor durch ein von außen in die Zelle gelangtes Signal aktiviert wurde. Klassische Beispiele von regulierbaren Enhancern sind u.a. das auf Glucocorticoidhormone reagierende Element (GRE) im Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV; Chandler et al., 1983; Ponta et al., 1985) und die auf zweiwertige Metallionen reagierenden Elemente (MRE's) in Metallothionein-Genen (Karin et al., 1984; Übersicht in Karin, 1985).

Durch Gentransferexperimente, die die Untersuchung eines isolierten Gens *in vivo* erlauben, sind bis heute etliche Enhancerelemente ermittelt worden. Einige von ihnen, die gewebespezifischen Enhancer, regulieren die Transkriptionsaktivität ihres Promoters nur in bestimmten Geweben und sind damit für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Differenzierungszustands der Zelle wichtig. Beispiele gewebespezifisch regulierter Promotoren finden sich u.a. im α -Fötoprotein der Maus (Godbout et al., 1986), bei den

Albuminen von Ratte (Ott et al., 1984) und Maus (Gorski et al., 1986), sowie bei Ratten Insulin und Chymotrypsin (Walker et al., 1983; Edlund et al., 1985; Boulet et al., 1986). Die Gewebespezifität scheint bei einigen Genen durch einzelne Enhancerelemente vermittelt zu werden (Insulin), während sie bei anderen nur durch die Kombination mehrerer Elemente erreicht wird (α -Fötoprotein). Generell scheint die Regulation durch cis-wirkende DNA Elemente auf der differenziellen Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA zu beruhen (Müller et al., 1988; Guarente, 1988). Zum Teil werden die Transkriptionsfaktoren dazu infolge eines extrazellulären Signals selbst erst induziert oder modifiziert.

Durch Ausnutzung der DNA-Affinität konnten bereits etliche Transkriptionsfaktoren mit Hilfe chromatographischer Methoden isoliert und charakterisiert werden. Als erstes wurde der GC-Box bindende Faktor SP-1 beschrieben (Dyran und Tjian, 1985). Es wurden auch Faktoren, die an die TATA- bzw. CAAT-Box binden, in Drosophila und Säugerzellen identifiziert und isoliert (Davison et al., 1983; Parker und Topol, 1984; Jones et al., 1985, 1987; Cohen et al., 1986). Inzwischen ist eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, von denen viele induzierbar sind und an Enhancerelemente binden, z.B. der Oktamer-Bindungsfaktor, der an das Immunglobulin schwere Kette Gen bindet (Igh; Singh et al., 1986; Übersicht in Müller et al., 1988), die Glucocorticoid-Rezeptoren von Ratte und Mensch, die neben ihrer Eigenschaft als zytoplasmatische Hormon-Rezeptoren nach ihrer Aktivierung durch die Bindung des Hormons in den Kern verlagert werden und dort als Transkriptionsfaktoren an die DNA binden (Übersichten in Coffino, 1981; Evans, 1988) und der Faktor AP-1 (für activating proteincomplex-1; Lee et al., 1987a,b), der durch Phorbolster induziert werden kann und u.a. an Enhancer im SV40-, Metallothionein IIA- und Kollagenase-I-Gen bindet (Übersichten in Curran und Franza, 1988; Vogt und Bos, 1989). Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die jeweiligen Sequenzelemente der DNA scheint spezifisch zu sein. So kann z.B. der Polyoma-Virus Enhancer nicht mit dem SV40 Enhancer kompetitieren, obwohl beide Enhancer sehr ähnliche Sequenzmotive enthalten (Sassone-Corsi et al., 1985; Piette et al., 1985). Dennoch ist die Änderung der Transkriptionsaktivität eines Gens durch die Verdrängung eines Faktors durch einen anderen möglich, da die "Erkennungsmotive" für verschiedene Transkriptionsfaktoren auf der DNA überlappen können (Akerblom et al., 1988).

Bei genauerer Untersuchung einiger Transkriptionsfaktoren stellte sich heraus, daß diese häufig nicht aus nur einem einzelnen Protein, sondern aus einem Komplex mehrerer Komponenten bestehen. AP-1 besteht mindestens aus den Proteinen c-Jun und c-Fos als Hauptkomponenten (Curran und Franza, 1988; Halazonetis et al., 1988; Kouzarides und Ziff, 1988; Sassone-Corsi et al., 1988; Chiu et al., 1988; Schönthal et al., 1988a; Schürmann et al., 1989), möglicherweise sind auch noch weitere Proteine an diesem Transkriptionsfaktor-Komplex beteiligt (Curran, pers. Mitteilung). Die Änderung der Zusammensetzung des DNA-bindenden Transkriptionsfaktor-Komplexes ist damit ein Mechanismus, durch den der Beitrag eines Enhancer-Elements zur Transkriptionskontrolle reguliert sein kann.

Die meisten der bisher beschriebenen Transkriptionsfaktoren stimulieren die Aktivität des Gens, an das sie binden. Wie schon bei Prokaryonten wurden aber auch bei Eukaryonten Faktoren gefunden, die die Transkription reprimieren können. Dieser reprimierende Effekt wird häufig in Zusammenhang mit der gewebespezifischen Expression gefunden (Kahn et al., 1981; Mevel-Ninio und Weiss, 1981; Blau et al., 1983; Killary und Fournier, 1984). Das bedeutet, daß ein in einem bestimmten Zell- oder Gewebetyp reprimierter Promoter in anderen Zell- bzw. Gewebetypen nicht reguliert oder sogar aktiviert werden kann. Das bisher am besten charakterisierte Beispiel eines eukaryontischen trans-wirkenden Repressors ist das große T-Antigen von SV40, das die Synthese der frühen Virusproteine und damit seine eigene Expression reprimiert (Rio et al., 1980; Myers et al., 1981). In den meisten Fällen jedoch, wo DNA-Sequenzen mit negativem Effekt auf die Transkription beschrieben wurden, müssen die die Wirkung vermittelnden Faktoren und Mechanismen noch ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit möchte ich am Beispiel der Repression des menschlichen Kollagenase-I Gens durch Glucocorticoidhormone einen Mechanismus auf molekularer Ebene beschreiben, durch den Gene negativ reguliert werden können.

Glucocorticoidhormone können in unterschiedlichsten Geweben Gene aktivieren. Sie induzieren z.B. die Synthese von Enzymen in der Leber, die die Umkehr des Abbaus von Glucose zu Pyruvat, die Gluconeogenese, ermöglichen, und liefern einen Beitrag zum Differenzierungsprogramm der Brustdrüsenzellen (Rosen et al., 1963; Steinberg et al., 1975; Crook et al., 1978; Arad und Kulka, 1978; Topper und Freeman, 1980; Doppler et al., 1989). Die Wirkung der Hormone wird dabei durch den hormonaktivierten

spezifischen Steroidrezeptor selbst auf die DNA übertragen: nach Bindung des Hormons an den zytoplasmatischen Rezeptor wird der nun aktivierte Rezeptorkomplex in den Zellkern verlagert, wo er als Transkriptionsfaktor direkt an cis-wirkende Elemente der DNA, die auf Glucocorticoide reagierenden Elemente (GRE's) bindet (Geisse et al., 1982; Pfahl, 1982; Scheidereit et al., 1983; Litwack, 1988). Für die Induktion der Gene scheint diese Bindung essentiell zu sein. Die GRE's fungieren dabei als induzierbare Enhancer-Elemente (Chandler et al., 1983; Majors und Varmus, 1983; Hynes et al., 1983; Karin et al., 1984; Ponta et al., 1985).

Neben der geninduzierenden Wirkung wurden für Glucocorticoide auch hemmende Eigenschaften beschrieben, aufgrund derer diese Klasse von Hormonen bereits seit längerer Zeit in der klinischen Therapie angewendet wird. Glucocorticoide hemmen entzündliche Prozesse und begrenzen die Proliferation von Zellen z.B. bei der Wundheilung (Narbenwucherung) oder bei chronischen Autoimmunkrankheiten (Baxter und Forsham, 1972; Vassalli et al., 1976; Beutler et al., 1986; Gustafsson et al., 1987; Allison, 1988). Außerdem blockieren sie die Tumorpromotion im Haut-Karzinogenese Modell der Maus (Belman und Troll, 1972; Scribner und Slaga, 1973). Die Tumorpromotion kann durch karzinogene Agenzien oder Chemikalien ausgelöst sein, deren wirksamste Vertreter Phorbol-Diester sind (Hecker, 1968). Der stärkste und experimentell am häufigsten verwendete Tumorpromoter ist der natürlicherweise vorkommende Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA), der aus dem Samen des südostasiatischen Baumes *Croton tiglium* isoliert wurde (Hecker, 1968, 1987), und dessen Eigenschaft sowohl *in vivo* am Tier (Boutwell, 1964) als auch in Zellkultur nachgewiesen wurde (Mondal et al., 1976; Weinstein et al., 1977). Die Tumorpromotion in Mäusehaut und Zellkultur, z.B. in Keratinozyten und Fibroblasten, ist von massiven Änderungen der Genexpression begleitet, die zu einer Änderung des Phänotyps der Zelle führen (Hashiba et al., 1989; Denhardt et al., 1989). Obwohl Tumorpromotoren wahrscheinlich nicht direkt mit der DNA interagieren, können sie eine Schädigung der DNA, z.B. Strangbrüche oder Schwesterchromatid-Austausche, verursachen (Kinsella und Radmann, 1978), vermutlich aufgrund einer Erhöhung der Peroxid-Anionen- und OH-Radikalkonzentration in der Zelle (Emerit et al., 1983; Cerutti, 1985). Die durch Tumorpromotoren induzierten Gene werden auch durch Wachstumsfaktoren und DNA-schädigende Agenzien aktiviert (Kaina et al., 1989; Mai et al., 1989). Synthetische und physiologische Glucocorticoide wirken der Entwicklung des promovierten Phänotyps der

Zelle entgegen, wobei ihre Fähigkeit zur Hemmung der Tumorpromotion mit der der Entzündungshemmung korreliert (Viaje et al., 1977).

Eines der Gene, die in Wachstumsfaktor-abhängiger Proliferation und Phorbolster-vermittelter Tumorpromotion involviert sind, kodiert für die menschliche Kollagenase-I (Angel et al., 1987a). Kollagenasen werden in vielen Zell- und Gewebetypen während der embryonalen und postnatalen Entwicklung exprimiert (Murphy und Reynolds, 1985; Brenner et al., 1989). Die physiologische Funktion der Kollagenasen ist der Abbau extrazellulärer Matrix. Die Regulation dieser metallabhängigen Enzyme findet auf allen Ebenen, von der Transkriptionskontrolle der Gene bis hin zur post-translatorischen Modifikation der Proteine und der Synthese spezifischer Inhibitoren der enzymatischen Funktion, statt (Vater et al., 1983; Stricklin und Welgus, 1983; Bunning et al., 1984; Brinckerhoff et al., 1986; Angel et al., 1987a; Murphy et al., 1987). Eine stark erhöhte Expression der Kollagenasen wird während der Tumorpromotion und Tumorprogression gefunden. Die Kollagenasen sind außerdem an der Entwicklung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse beteiligt (Harris et al., 1984; Liotta, 1986; Angel et al., 1987a).

Die Transkription des Kollagenase-I Gens wird weitgehend über ein spezifisches, cis-wirkendes Element, das auf TPA reagierende Element (TRE; TPA Responsive Element), reguliert. An dieses induzierbare Enhancer-Element bindet der Transkriptionsfaktor AP-1 (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987b). Durch Phorbolster, UV-Strahlung, Tumor-Necrosis-Faktor Alpha (TNF- α) und Wachstumsfaktoren werden in der Zelle unterschiedliche Signalwege angesprochen, die ein gemeinsames Ziel haben: die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und damit die Induktion der Kollagenase-I (Angel et al., 1987b; Schönthal et al., 1988a,b; Stein et al., 1988, 1989a; Brenner et al., 1989). AP-1 ist die limitierende Komponente in der Regulation der Kollagenase-I Transkription (Angel et al., 1987b).

Seit mehreren Jahren ist bekannt, daß Glucocorticoide die Expression der Kollagenase-I und anderer sezernierter Proteasen hemmen (Wigler et al., 1975; Vassalli et al., 1976; Werb et al., 1978; Medcalf et al., 1986; Frisch und Ruley, 1987; Offringa et al., 1988). Ziel meiner Arbeit war es, den Mechanismus aufzuklären, durch den die Hormone diese negative Kontrolle ausüben. Die Erforschung der Vorgänge, die zur negativen Kontrolle der Kollagenase-I durch Glucocorticoide führen, ist nicht nur durch das generelle Interesse an der negativen Regulation von Genen begründet. Die genauere Kenntnis der

Repression der Kollagenase-I Expression könnte darüber hinaus neue Wege in der klinischen Glucocorticoid-Therapie von Entzündungskrankheiten, rheumatischer Arthritis und anderer Krankheiten erschließen; diese Therapie beruht bis heute weitgehend auf empirischen Daten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß Glucocorticoide die Expression der Kollagenase-I auf Transkriptionsebene hemmen. Diese Hemmung erfolgt unabhängig von der Neu-Synthese von Proteinen, wird durch den Glucocorticoidrezeptor vermittelt und zielt auf das auf Phorbolster reagierende Element (TRE) des Kollagenase-I Promoters, an das der Transkriptionsfaktor AP-1 bindet. AP-1 wird nicht durch den aktivierten Glucocorticoidrezeptor von seiner Bindestelle in der Kollagenase DNA verdrängt. Auch wird weder die zur TRE-Bindung zur Verfügung stehende Menge an AP-1 reduziert, noch wird die Zusammensetzung dieses Transkriptionsfaktors durch die Hormonbehandlung geändert. Die zur Repression der Kollagenase-I Transkription erforderliche Konzentration an Glucocorticoidhormon ist etwa 10-fach niedriger als die zur Aktivierung Steroid-induzierbarer Gene. Mit Antikörpern, die spezifisch den Hormonrezeptor erkennen, wird auch Jun Protein aus Extrakten Glucocorticoid-behandelter Zellen ausgefällt, und umgekehrt wird in der AP-1-haltigen Fraktion bei der Affinitäts-chromatographischen Reinigung dieses Faktors aus Kernextrakten auch der aktivierte Rezeptor-Hormon-Komplex gefunden. Schließlich werden neben der Kollagenase-I weitere Gene, deren Transkription durch Bindung von AP-1 induziert ist, durch Glucocorticoide negativ reguliert.

Die vorgestellten Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß der aktivierte Glucocorticoidrezeptor die Kollagenase-I Transkription durch Blockierung der transaktivierenden Funktion von AP-1 hemmt, vermittelt durch direkte Protein-Protein Interaktion.

Materialien:

Acetyl Coenzym A	Pharmacia, Freiburg
Acridinorange	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar, -Hefe, -Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Biogel	Bio-Rad, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Chloroquin-Disphosphat	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DTBP	Pierce, über Atalanta, Heidelberg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dithiotreitol	BRL, Neu-Isenburg
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Schwalbach
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll	Serva, Heidelberg
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Glycerin	BRL, Neu-Isenburg
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Haftsilan	Wacker-Chemie, München
Harnstoff	Bio-Rad, München
Kieselgel-DC Platten	Macherey und Nagel, Düren
Linker DNA	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Boehringer, Mannheim
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio-Rad, München
NACS-Prepac Säulen	BRL, Neu-Isenburg

Nick-Translationskit	Amersham-Buchler, Braunschweig
Nitrocellulose-Filter	Schleicher und Schüll, Dassel
Nukleotid-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
Oligo-dT-Cellulose	Pharmacia, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
PMSF	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol	Sigma, Deisenhofen
Protein-A Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Protein-Molekulargewichts-Standard, kalt	Bio-Rad, München
Protein-Molekulargewichts-Standard, radioaktiv	Amersham-Buchler, Braunschweig
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
PVP	Sigma, Deisenhofen
Quickszint	Zinsser, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	ABL, Basel
	New England Biolabs, Schwalbach
	Promega-Biotec, Heidelberg
	Boehringer, Mannheim
	Pharmacia, Freiburg
RU 486	Roussel Uclaf, Romainville, Frankreich
S1-Nuklease	Pharmacia, Freiburg
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
Sequenzier-Primer	New England Biolabs, Schwalbach
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Schwalbach
TEMED	Bio-Rad, München
TPA	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl ; Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X 100	Bio-Rad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe

Tween 20	Serva, Heidelberg
Whatman 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkultur-Artikel	Falcon, Heidelberg
	Becton und Dickinson, Heidelberg
	Nunc, Roskilde, Dänemark

Radiochemikalien :

D-Threo-(dichloroacetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (7.4 MBq/ml, 1.96 GBq/mMol),
 γ -³²P ATP (370 MBq/ml, >185 TBq/mMol),
 α -³²SdATP (296 MBq/ml, >14.8 TBq/mMol),
 γ -³²PdCTP (370 MBq/ml, >15 TBq/mMol),
L-³⁵S-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/mMol) und
¹²⁵I-Protein-A (3.7 MBq/ml, 1665 MBq/mg)
wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen.
Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Zellen :

CV-1:	Affen-Nieren Epithelzellen
NFB-München:	Primäre Hautfibroblasten eines gesunden Menschen
HeLa-tk ⁻ :	menschliche Cervix-Carcinom-Zelllinie
NIH3T3:	Maus-Fibroblastenlinie
E.coli DH5 α :	F- L- recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , mk ⁺), Δ (lacZYA-argF)U169 Θ 80dlacZ Δ M15 supE44 thi-1 gyrA96
E.coli 71/18:	(F', lacJ lac z, M15, pro ⁺ , sup E)

Die verwendeten Zellen stammen aus der Zellbank des Instituts für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.

Antikörper:

Polyklonale anti-Jun-Antikörper wurden durch Überexpression des Fusionsproteins trp-Jun durch das Plasmid pTECjun von Dr. Peter Angel hergestellt (Angel et al., 1988b). Polyklonale Antikörper gegen Fos wurden von der Fa. Medac, Hamburg bezogen, und anti-Glucocorticoidrezeptor-Antikörper wurden von Herrn Dr. W.Hoeck zur Verfügung gestellt (Hoeck et al., 1989).

Methoden:

Die beschriebenen Methoden entsprechen größtenteils Laborprotokollen, die auf der Grundlage des Handbuches "Molecular Cloning -A Laboratory Manual" (Maniatis et al., 1982) oder der im folgenden zitierten Literatur entwickelt wurden.

1. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA in wässriger Lösung wurde deren optische Dichte bei 260 und 280 nm gemessen. Die optische Dichte $OD_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA. Das Verhältnis der Optischen Dichten OD_{280}/OD_{260} sollte für DNA etwa 0.7, für RNA etwa 0.5 betragen.

2. Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform:

In einem Extraktionsvolumen von mindestens 100 μl wurde die Nukleinsäure-Lösung mit gleichem Volumen TNE-gesättigtem Phenol (TNE: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA) und gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gut gemischt und anschließend zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die Nukleinsäurehaltige Oberphase wurde abgetrennt und noch zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

3. Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol:

Die Nukleinsäurelösung wurde mit 3 M Na-Acetat pH 4.8 auf eine Endkonzentration von 0.2 M und 2.5-fachem Volumen Ethanol versetzt. Nach 30 min Inkubation bei -80°C wurden die ausgefallenen Nukleinsäuren 10 min bei 8800xg abzentrifugiert, in 80%igem Ethanol aufgenommen, nochmals 5 min bei 8800xg abzentrifugiert und anschließend getrocknet.

4. Herstellung kompetenter Bakterien:

0.5 ml einer Übernachtskultur von E.coli DH5 α wurden in 500 ml SOB-Medium (2 % Bactotrypton; 0.5 % Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) bis zu einer optischen Dichte $OD_{550}=0.4$ unter starkem Schütteln kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis inkubiert und danach in der

Kühlzentrifuge bei 1048xg zentrifugiert. Das Sediment wurde auf Eis in 30 ml TFB (100 mM KCl; 45 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 3 mM Hexamin-Cobaltrichlorid; 15 % Glycerin; 10 mM K-MES, pH 6.2) resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaliger, 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C bei 1048xg wurde das Zellsediment in 6 ml TFB aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und zur Transformation eingesetzt bzw. in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff zur Lagerung eingefroren.

5. Transformation von kompetenten Bakterien:

200 µl kompetente Bakterien wurden mit je 2-5 ng supercoiled DNA bzw. 20 ng eines Ligationsansatzes gemischt. Nach 60 min Inkubation auf Eis folgte ein Hitze-Schock (45 sek bei 42°C), gefolgt von weiteren 2 Minuten Inkubation auf Eis. Anschließend wurde in 3 ml SOB-Medium (2 % Bactotrypton; 0.5 % Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄), dem 1% Glucose zugegeben wurde, für 45 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 0.1-0.2 ml der Zellkultur wurden dann auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Kolonien konnten nur von den Bakterien gebildet werden, die das Resistenzgen-haltige Plasmid aufgenommen hatten.

6. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen:

200 ml einer über Nacht bei 37°C in LB-Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin; 0.5 % Bacto-Hefeextrakt; 1% Bacto-Trypton, 1% NaCl) geschüttelten Bakteriensuspension wurden 10 min bei 4°C mit 6000xg abzentrifugiert. Der Zelniederschlag wurde in 10 ml LysozymbLösung (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mg/ml Lysozym) aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert, mit 20 ml alkalischer SDS-Lösung (0.2 N NaOH; 1% SDS) versetzt, 5 min weiterinkubiert und mit 15 ml 3 M Na-Acetat pH 4.8 versetzt. Nach weiteren 60 Minuten Inkubation auf Eis wurden Zellfragmente und hochmolekulare DNA 10 min bei 4°C mit 16800xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 ml Ethanol versetzt und 30 min bei -80°C inkubiert. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde 10 min bei 4°C mit 10800xg abzentrifugiert, in 10 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM Na-Acetat resuspendiert, erneut mit 25 ml Ethanol gefällt und nochmals abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde getrocknet, in 4 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA aufgenommen, mit CsCl auf eine Endkonzentration von 4.2 M versetzt und nach Zugabe von 0.5 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) für 16 Stunden bei 55000

rpm im Beckman Vertikalrotor VTI 65 zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit einer Spritze abgezogen und unter den selben Bedingungen erneut für 6 Stunden zentrifugiert. Nach erneutem Abziehen der Plasmid-DNA wurde 3x mit 2-fachem Volumen H₂O-gesättigtem Butanol extrahiert und die DNA anschließend durch Zugabe von 2.5 Volumen Ethanol zur wässrigen Phase gefällt.

Kurzprotokoll zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präp):

1.5 ml Bakteriensuspension wurden 5 min bei 8800xg abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 100 µl Lysozymlösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung versetzt, 5 min weiter inkubiert, mit 15 µl 3 M Na-Acetat pH 4.8 versetzt und 60 min auf Eis stehen gelassen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 8800xg wurde die DNA aus dem Überstand durch Ethanolfällung gewonnen, nochmals in 100 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA gelöst und erneut nach Ethanolfällung abzentrifugiert, mit 80%igem Ethanol gewaschen und getrocknet (Ausbeute ca. 10 µg).

7. Sequenzierung von DNA nach der Didesoxy-Methode:

3 µg doppelstränge DNA wurde in 20 µl Reaktionsvolumen 5 min bei RT in 0.2 M NaOH; 0.2 mM EDTA inkubiert. Nach Neutralisation mit 2 µl 2 M NH₄-Acetat wurde die denaturierte DNA mit 60 µl Ethanol ausgefällt, nach Zentrifugation mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit 5 µl Primer-Mix (50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 25 mM MgCl₂; 6 ng M13 Sequenzier-Primer) vermischt, 10 min bei 60°C inkubiert, und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Je 2 µl dieses Ansatzes wurde für die 4 Sequenzierreaktion (G, A, T, C) verwendet. Die 2 µl wurden in eine Mikrotiterplatte (Fa. Falcon) pipettiert. Danach wurden 2 µl vom jeweiligen dNTP/ddNTP-Mix zugegeben und 20 min bei 30°C inkubiert. Der dNTP/ddNTP-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

G-Lösung: 12,5 µM dGTP + 250 µM dCTP + 250 µM dTTP

A-Lösung: 250 µM dGTP + 250 µM dCTP + 250 µM dTTP

C-Lösung: 250 µM dGTP + 12,5 µM dCTP + 250 µM dTTP

T-Lösung: 250 µM dGTP + 250 µM dCTP + 12,5 µM dTTP

Die verwendeten ddNTP-Stocklösungen waren:

ddGTP: 0.32 mM ddATP: 0.02 mM

ddCTP: 0.16 mM ddTTP: 0.5 mM

Für den dNTP/ddNTP-Mix (z.B. für die A Reaktion) wurden gemischt (ausreichend für 5 Ansätze):

5 µl A-Lösung

5 µl ddATP-Lösung

1 µl ³⁵S-dATP

1 µl E.coli DNA Polymerase I Klenow Fragment (5 U/µl)

Danach wurden 2 µl einer Lösung zugegeben, die alle Desoxynukleotide in einer Konzentration von 25 mM enthielten, und weitere 20 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Probenpuffer beendet und anschließend 2 µl der Probe auf einem Acrylamid-Harnstoff Gel aufgetrennt.

8. Auftrennen von DNA-Fragmenten:

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

Agarosegel: 0.8-2% Agarose TypII oder TypVII (low gelling temperature) wurden mit 0.3 µg/ml Ethidiumbromid in 50 ml Laufpuffer TBE (90 mM Tris-HCl, pH 8.3; 90 mM Borsäure; 2.5 mM EDTA) gelöst. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 50-100 V.

Acrylamidgel: 6-8% Acrylamid 30:1 (29 Teile Acrylamid und 1 Teil N,N'-Methylenbisacrylamid) in Laufpuffer TBE wurden durch Zugabe von 0.02% TEMED und 0.025% Ammoniumpersulfat polymerisiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100-300 V.

Die DNA wurde in 5% Glycerol; 5 mM EDTA; 0.05% SDS; 0.02% Bromphenolblau aufgetragen.

9. Isolation von DNA aus Gelmaterial:

Agarosegel: Die DNA wurde in einem low gelling type Agarosegel aufgetrennt. Das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wurde 10 min bei 65°C geschmolzen und mit 4-fachem Volumen 0.25 M NaCl in TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.2; 1 mM EDTA) verdünnt. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 65°C wurde die Lösung auf 42°C abgekühlt und über eine NACS Prepac Säule gereinigt.

Eine NACS Prepac Säule wurde mit 3x 1 ml 2 M NaCl in TE hydratisiert und mit 5x 1ml Bindungspuffer (0.1 M NaCl in TE für Oligonukleotide, 0.2 M NaCl in TE für doppelsträngige DNA-Fragmente von weniger als 1 kb Länge, 0.5 M NaCl in TE für doppelsträngige DNA-Fragmente von mehr als 1 kb Länge) äquilibriert. Die DNA-Lösung wurde aufgetragen, mit 5x 1ml 42°C warmem Bindungspuffer gewaschen und mit 400 µl Ablösepuffer (1 M NaCl in TE bzw. 2 M NaCl in TE) eluiert.

Acrylamidgel: Die DNA wurde über Nacht bei 50°C in 0.2 M NaCl in TE bzw. 0.5 M NaCl in TE eluiert und bei Raumtemperatur wie oben beschrieben über eine NACS Prepac Säule gereinigt.

10. Restriktionsverdau:

Pro µg zu verdauender DNA wurden 2-4 Einheiten Enzym (wenn nicht anders vom Hersteller empfohlen) in 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei den je nach Enzym vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen.

11. Dephosphorylierung:

An 5'-Überhängen: Pro 100 pMol 5'-Enden wurde 1 Einheit alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 2x je 30 min in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA bei 37°C. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde ein weiteres Aliquot Enzym zugegeben. Nach der Reaktion wurde das Enzym durch 30 minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und durch anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt.

An 3'-Überhängen und stumpfen Enden: Die Dephosphorylierung erfolgte unter Pufferbedingungen wie bei 5'-Überhängen. Die Inkubation erfolgte jedoch alternierend für je 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C, bei 2-maliger Durchführung des Temperaturwechsels mit neuem Enzym im zweiten Durchgang.

12. Entfernen von Einzelstrang-Überhängen:

5'-Überhänge: Pro 100 pMol 5'-Enden wurde 1 Einheit Klenow-Fragment der E.coli DNA Polymerase I eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 25 µl Reaktionsvolumen für 30 min bei RT in 50 mM Tris-HCL, pH 7.2; 10 mM MgSO₄; 0.1 mM DTT; 100 µg/ml Rinderserum-Albumin; je 2 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP. Nach der Reaktion wurde das Enzym durch 5 minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert.

3'-Überhänge: Pro 100 pMol 3'-Enden wurde 1 Einheit T4-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 20 µl Reaktionsvolumen bei 37°C in 33 mM Tris-HCl, pH 7.9; 66 mM K-Acetat; 10 mM Mg-Acetat; 0.5 mM DTT; 100 µg/ml Rinderserum-Albumin; je 2 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP. Das Enzym wurde anschließend Hitze-inaktiviert.

13. Ligation von Linkern:

0.5 µg Linker-DNA wurden mit 2 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Die Inkubation erfolgte in 10 µl Reaktionsvolumen für 60 min bei 37°C in 66 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM ATP; 1 mM Spermidin; 10 mM MgCl₂; 15 mM DTT; 200 µg/ml Rinderserum-Albumin. Zur Linkerphosphorylierungs-Reaktionslösung wurden 400 ng DNA nach Entfernen von Einzelstrangüberhängen in 10µl des selben Puffers gegeben und 6 h bei 22°C mit 1 Einheit T4-DNA-Ligase inkubiert. Die Reaktionslösung wurde Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Die Linkerketten an der DNA wurden durch Restriktionsverdau mit 20 Enzym-Einheiten über Nacht geschnitten. Die DNA wurde durch Auftrennung auf einem Agarosegel von der überschüssigen Linker-DNA abgetrennt.

14. Ligation:

wässrige Lösung: Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis 1:1 eingesetzt. Pro pMol Enden mit Überhängen wurde 0.1 Einheit T4-DNA-Ligase verwendet, pro pMol Enden ohne Überhänge 1 Einheit. Die Inkubation erfolgte über Nacht in 20-50 µl Reaktionsvolumen bei 15°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP; 100 µg/ml Rinderserum-Albumin.

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

15. Mutagenese von Plasmid-DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden (Zoller u. Smith 1983; Skroch, 1987):

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

Herstellung transformationskompetenter Zellen: 100 ml LB (1% Bacto-Trypton; 0.5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 0.1% Glucose) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur E.coli K12 71/18 beimpft, bei 37°C im Schüttelwasserbad bis zu einer OD₆₀₀=0.2 inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 40 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert, erneut 10 min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert und in 1 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen.

Transformation: 100 µl kompetente Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA (ca. 10 ng) 30 min auf Eis inkubiert, für 2 min auf 37°C erwärmt, mit 0.5 ml LB versetzt und 60 min bei 37°C im Schüttelwasserbad weiterinkubiert. Anschließend wurden Aliquots von je 0.1 ml auf Selektiv-Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Präparation von einzelsträngiger DNA: 5 ml LB mit Selektionsantibiotikum wurden mit 100 µl einer Übernachtskultur transformierter Bakterien beimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad bis auf eine OD₆₀₀=0.2-0.4 inkubiert, anschließend mit IRI Phagen zur MOI=10 angeimpft (ca. 10¹² Phagen pro 0.2 OD₆₀₀) und 5.5 h weiterinkubiert. Portionen von je 1.5 ml wurden 10 min mit 8800xg abzentrifugiert, der Überstand wurde nochmals 10 min mit 8800xg abzentrifugiert, wiederum 1.2 ml des Überstands wurden mit 150 µl 20% PEG; 2.5 M NaCl versetzt, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagenpartikel wurden 10 min mit 8800xg abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die Phagenpartikel nochmals 2 min mit 8800xg zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Der Phagenniederschlag wurde in 200 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA resuspendiert, während 30 min bei Raumtemperatur gelöst und anschließend mit 100 µl Phenol (gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 10 mM EDTA) 30 sec. kräftig geschüttelt. Die Oberphase wurde 2x mit je 200 µl Chloroform extrahiert und die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 20 µl 4 M LiCl und 500 µl Ethanol über Nacht

bei -20°C gefällt. Die einzelsträngige DNA wurde 10 min mit 8800xg abzentrifugiert, mit 80%igem Ethanol gewaschen, unter Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen.

Kinasierung von Oligonukleotiden: 200 pMol Oligonukleotid-DNA wurden in 200 µl Reaktionsvolumen mit 4 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0.1 mM Spermidin; 0.1 mM EDTA; 0.5 mM ATP für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C beendet.

Hybridisierung von Oligonukleotiden an einzelsträngige DNA (Annealing): 0.5-1 pMol einzelsträngige DNA wurden zusammen mit 20 pMol phosphorylierter Oligonukleotid-DNA und 20 pMol Sequenzierprimer-DNA in 10 µl 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT für 5 min auf 55°C erhitzt, 5 min bei Raumtemperatur und 5 min auf Eis weiterinkubiert.

Kettenverlängerung (Extension) und Ligation: 10 µl 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; je 0.8 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 1 mM ATP; 3 Einheiten T4-DNA-Ligase, 2 Einheiten Klenow-Fragment der DNA Polymerase-I wurden auf Eis mit 10 µl DNA aus der Annealing-Reaktion gemischt und 6-12 h bei 15°C inkubiert.

16. Markierung von DNA mit Radionukleotiden:

Endmarkierung: Zur Markierung von 1 pMol dephosphorylierten 5'-Enden wurden 10 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (ca. 5000 Ci/mMol, 10 mCi/ml) in einer Konzentration von 0.8-1 µM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 25 µl Reaktionsvolumen 30 min bei 37°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0.1 mM Spermidin; 0.1 mM EDTA.

Nick Translation: Es wurde der "Nick Translation Kit" der Firma Amersham benutzt. 500 ng DNA wurden 3 h bei 15°C in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 2.5 Einheiten DNA Polymerase-I; 100 pg DNase-I; je 20 µM dATP, dGTP, dTTP; 3.33 µM $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (ca.400 Ci/mMol, 10 mCi/ml) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgSO₄; 0.1 mM DTT; 50 µg/ml Rinderserum-Albumin inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0.8% SDS; 20 µg carrier DNA. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Gelfiltration.

17. Gelfiltration:

Sephadex G50 bzw. Biogel P60 (Fraktionierbereich 3000-60000 Dalton) wurde in 50 mM NaCl; 0.5 mM EDTA über Nacht gequollen. Eine Pasteurpipette wurde mit Glaswolle gestopft und mit Säulenmaterial gefüllt. Die DNA wurde in einem Volumen von 100 µl aufgetragen und unter ständigem Nachfüllen von Puffer in 100 µl Fraktionen eluiert. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden durch Cerenkow-Zählung identifiziert.

18. Isolierung von mRNA aus eukaryontischen Zellen:

Etwa $5-10 \times 10^6$ Zellen wurden 2x mit kaltem PBS (0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂; 0.6 mM MgCl₂; 6.5 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen und in 10 ml STE (100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM EDTA) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit Proteinase K (300 µg/ml) und SDS (0.5%) versetzt, zur Zerkleinerung hochmolekularer DNA 30 sek im Ultra-Turrax Messerhomogenisator homogenisiert und danach 30-45 min bei 37°C inkubiert. Die Nukleinsäurelösung wurde nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion auf 0.5 M NaCl eingestellt und die polyA⁺-RNA über Nacht bei RT an 100 mg, in HSB (0.3 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM EDTA; 0.1% SDS) äquilibrierte Oligo-dT-Cellulose adsorbiert. Nach diesem Prozeß wurde 3x mit HSB gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte durch 3-maliges Aufnehmen der Oligo-dT-Cellulose in je 1 ml Wasser, anschließendes Zentrifugieren und Abtrennen des Sediments. Nach nochmaliger Zentrifugation der vereinigten Überstände wurden 300 µl zur Extinktionsbestimmung abgenommen, der Rest wurde zur Ethanolfällung der mRNA eingesetzt. Die getrocknete RNA wurde in einer Endkonzentration von 0.5 - 1 µg/µl in Wasser aufgenommen.

19. Northern Transfer:

Auftrennung: Je 10 µg RNA wurden mit Ethanol gefällt und in 20 µl PB-Denaturierungspuffer (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6.85; 50% DMSO; 6% Glyoxal), 3 min auf 50°C erwärmt; auf Eis gestellt und mit 4 µl Ladepuffer (50% Glycerol; 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6.85; 0.1% Bromphenolblau) versetzt. Die RNA wurde bei 100 V in einem Agarosegel (1% Agarose in Laufpuffer PB) aufgetrennt und anschließend durch 15-minütiges Inkubieren des Gels in 0.03 mg/ml Acridinorange in PB, gefolgt durch 3x 15 min Baden in PB, sichtbar gemacht.

Blot: Nitrocellulosefilter wurden durch je 5-minütiges Baden in 6x SSC (20x SSC: 3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat, pH 6.5) und 20x SSC vorbereitet. In einer Plastikwanne wurden ein Schwamm, 3 mit 20x SSC getränkte Lagen 3MM Papier, das Agarosegel, der Nitrocellulosefilter, 2 mit 20x SSC getränkte Lagen 3MM Papier, 2 Lagen trockenes 3MM Papier und ein Pack Papierhandtücher gestapelt. Als Laufmittel wurde 10x SSC verwendet. Nach dem Transfer wurde der Nitrocellulosefilter 10 min in 6x SSC; 0.05% SDS gewaschen, an der Luft getrocknet und 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

20. Hybridisierung von nick-translatierter DNA an auf Nitrocellulosefilter fixierte Nukleinsäuren:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nitrocellulosefilter 1h bei 65°C in Vorhybridisierungslösung (4x SSC; je 0.02% Rinderserum-Albumin, PVP, Ficoll; 0.1% SDS; 3.3% PiPPi: 0.5 M Na₂HPO₄ /NaH₂PO₄, pH 7.3; 1.5% Na₄P₂O₇) inkubiert und nach Zugabe von 20µg /ml carrier DNA für 1h weiterinkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über 20 h bei 65°C in 4x SSC; 10 mM EDTA; 0.1% SDS; 20 µg/ml carrier DNA; 20-50 ng/ml nick-translatierter DNA (spez. Aktivität 0.5-4x10⁸cpm/µg). Das Volumen der Hybridisierungslösung errechnet sich nach: Fläche des Filters in cm² x 13 µl + 30% Überschuß Wasser. Carrier DNA und nick-translatierte DNA wurden 10 min gekocht, auf Eis abgekühlt und mit den restlichen Lösungen versetzt. Unspezifisch gebundene DNA wurde entfernt durch 4-maliges Waschen der Filter für je 30 min bei 65°C in SSC; 0.1% SDS; 3% PiPPi, wobei die SSC-Konzentration von 2x über 1x auf 0.5x abgesenkt wurde. Die Filter wurden naß in Folie eingeschweißt und autoradiographiert.

21. Auftrennung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen:

Aufarbeitung der Probe: Die Nukleinsäuren wurden in 3 µl Sanger Sequenzierungs Probenpuffer (98% deionisiertes Formamid; 20 mM EDTA; 0.03% Xylencyanol; 0.03% Bromphenolblau) aufgenommen, 3 min gekocht, sofort auf Eis gestellt und möglichst rasch auf das Gel aufgetragen.

Gel: 30 ml einer Lösung aus 6% Acrylamid (19 Teile Acrylamid und 1 Teil N,N'-Methylenbisacrylamid) mit 8 M Harnstoff in TBE (90 mM Tris-HCl, pH 8.3; 90 mM Borsäure; 2.5 mM EDTA) wurden nach Zugabe von 0.1% Ammoniumpersulfat und

0.05% TEMED mit Hilfe von 2 Glasplatten und 2 Abstandshaltern zu einem Gel des Formats 40x20x0.015 cm verarbeitet. Eine der Glasplatten wurde mit 0.3% Haftsilan in Ethanol beschichtet, die andere mit 5% Dimethyldichlorsilan in CCl₄. Nach einem Vorlauf von 30 min bei einer Leistung von 30 W erfolgte die Auftrennung der Nucleinsäure-Fragmente ebenfalls bei 30 W (ca. 1200-1800 V). Nach der Elektrophorese wurde die silikonisierte Glasplatte abgehoben und das auf der anderen Glasplatte haftende Gel 10 min in 10%iger Essigsäure gewaschen, unter fließendem Wasser gespült, bei 80°C getrocknet und autoradiographiert.

22. S1-Analyse:

Bis zu 50 µg Gesamt-RNA bzw. 5 µg poly-A⁺-RNA wurden zusammen mit 0.01-0.05 pMol endmarkierter DNA mit Ethanol gefällt und in 10 µl Hybridisierungspuffer (80% deionisiertes Formamid; 40 mM PIPES pH 6.4; 1 mM EDTA; 400 mM NaCl) aufgenommen. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 85°C wurden die Proben ohne zwischenzeitliche Abkühlung bei einer durch Vorversuche ermittelten Temperatur (ca 45-50°C) über Nacht hybridisiert. Anschließend wurden die Proben 40 min bei 30°C mit 60 Einheiten S1 Nuklease in 100 µl 0.3 M NaCl; 30 mM Na-Acetat, pH 4.8; 3 mM ZnSO₄; 2 µg carrier DNA behandelt. Die Lösung wurde Phenol/Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 8 µg Hefe RNA ohne zusätzliches Salz mit Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 2 µl Probenpuffer aufgenommen und unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

23. Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen:

Gesamtzellextrakte: 1-10x10⁶ Zellen wurden 2x mit PBS (0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂; 0.6 mM MgCl₂; 6.5 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit einem Gummischaber von der Kulturschale geschabt. Nach kurzer Zentrifugation bei 8800xg wurde das Zellsediment in 100-300 µl des jeweils weiter verwendeten Puffers aufgenommen und anschließend 3x abwechselnd in Trockeneis/Methanol eingefroren und bei 37°C aufgetaut (jeweils ca. 5 min). Nach diesem Vorgang wurde 10 min bei 20000xg zentrifugiert und der klare Proteinüberstand vom Sediment getrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry (siehe Punkt 24, "Proteinbestimmung nach Lowry"). Die Extrakte wurden bei -80°C aufbewahrt.

Kernextrakte: Die Zellen wurden vor dem ersten Einfrieren in einem 0.25 molaren HEPES-Puffer (pH 7.2), dem 0.5% NP40 zugesetzt waren, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend kurz bei 1048xg zentrifugiert. Aus den sedimentierten Kernen wurde der lösliche Proteinextrakt wie bei Gesamtzellextrakten isoliert.

Den Extrakten für die Bindung an das immobilisierte TRE wurden Protease-Inhibitoren zugesetzt, die auch bei der Weiterverarbeitung der Proteine in jedem Puffer enthalten waren: Leupeptin (1 µg/ml); Pepstatin A (1 µg/ml); Aprotinin (10 µg/ml); Benzamidin (100 µM); PMSF (100 µM).

24. Proteinbestimmung nach Lowry:

Zu 10 µl des Proteinextraktes wurden 90 µl Lösung 1 aus 2% Na₂CO₃ in 0.2 M NaOH pipettiert. Danach wurden 250 µl Lösung 4 (Lösung 1, ergänzt mit je 2.5 µl 2 % Na-K-Tartrat; 2% CuSO₄) zugegeben und für 20 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 30 µl verdünntes Folin-Reagenz (1:1 mit H₂O) hinzupipettiert, für weitere 30 min inkubiert und nachfolgend die Extinktion bei 600 nm bestimmt. Nach Erstellung einer Eichkurve mit Rinderserum-Albumin-Proben bekannter Konzentration wurde die Proteinkonzentration der Extrakte berechnet. Die Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte bei Raumtemperatur.

25. Konzentrierung einer Proteinlösung:

Zur wässrigen Protein-Lösung wurden 20 Vol.% einer 50%igen TCA-Lösung oder 4 Volumen Aceton gegeben und anschließend auf Eis für 20 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 8800xg wurde das Protein-Sediment mit einer 1:1-Mischung Ethanol/Aceton gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet. Das getrocknete Protein-Sediment wurde in der gewünschten Puffermenge, meist ca. 1/10 des Ausgangsvolumens, aufgenommen.

26. Aufbereitung von Oligonukleotiden zur Ligation:

Die Oligonukleotide wurden auf einem "Gene Assembler" der Firma Pharmacia hergestellt. Die Oligonukleotide wurden über Nacht in 1 ml 25% Ammoniak vom Trägermaterial abgespalten. Von komplementären Oligonukleotiden wurden jeweils 1 µl vereinigt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100 µl 6.25 mM Tris-HCl, pH 8.5; 3 mM MgCl₂ aufgenommen. Nach Phosphorylierung der Oligonukleotide wurde eine 1:100 Verdünnung im gleichen Puffer zur Annealing-Reaktion auf 100°C gebracht und

anschließend langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt, um eine Paarung der komplementären Stränge zu ermöglichen. 2 µl von diesem Ansatz wurden mit 40 ng Vektor in 20 µl Volumen nach Standardprotokoll ligiert.

27. Reinigung von Oligonukleotiden:

Die Oligonukleotide wurden wie in der vorstehend beschriebenen Methode über Nacht bei 50°C in 1 ml 25%igem Ammoniak vom Trägermaterial getrennt. Die Ammoniaklösung wurde danach eingetrocknet und die Oligonukleotide in 500 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 1 mM EDTA pH 8.0) aufgenommen. 100 µl Oligonukleotide wurden über ein präparatives 20%iges Polyacrylamid-Harnstoff Gel (66.7 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30:0.8; 10 ml 10x TBE (89 mM Tris-Base, pH 8.3; 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA); 50 g Harnstoff; 0.8 ml APS und 64 µl TEMED; ad 100 ml mit H₂O) aufgetrennt (Laufzeit 6 Stunden bei 1000V). Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt. Die längste Bande stellte das vollständig synthetisierte Oligonukleotid dar. Ein entsprechendes Gelstück wurde ausgeschnitten und über Nacht eluiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte über NACS Säulen (siehe Punkt 9, "Isolation von DNA aus Gelmaterial").

28. Protein-Bindung an DNA, Band-Shift Assay (Stein et al., 1989a):

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl (250-500 µl) wurden 10 µg (500-1000 µg) Gesamtzellextrakt bzw. 5 µg (250-500 µg) Kernextrakt für 10 min auf Eis mit 0.5 µg (75 µg) poly-dIdC in Band-Shift-Puffer (25 mM Hepes pH 7.8; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 4% Ficoll; 1 mM PMSF) inkubiert. Anschließend wurden 2 fMol (300 fMol) radioaktiv endmarkiertes Oligonukleotid zugegeben und weitere 30 min bei RT oder auf Eis inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden anschließend direkt auf ein 4%iges Acrylamidgel aufgetragen und bei 10 V/cm elektrophoretisiert, bis ein parallel aufgetragener Farbmaler (BPB) ca. 2/3 der Gellänge zurückgelegt hatte. Das Gel wurde anschließend getrocknet und autoradiographiert. Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf den Reaktionsansatz, der anschließend einer Crosslink-Reaktion unterworfen wurde.

29. Proteinbindung an DNA mit Crosslink (Gillespie und Eisenman, 1989):

Die Inkubation von Proteinextrakten mit radioaktiv markierter DNA wurde wie für den einfachen Band-Shift-Assay durchgeführt (unter den dort in Klammern angegebenen Bedingungen). Vor Auftragung auf das Gel wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf Eis mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt (ca. 80000 J/m²). Anschließend wurde entweder erst ein chemisches Vernetzen der Proteine durch 30 minütiges Inkubieren auf Eis mit 0.5 mg/ml DTBP durchgeführt oder der Ansatz direkt zur Immunpräzipitation eingesetzt.

30. Bindung von Proteinextrakten an Sepharose-immobilisierte Oligonukleotide (Kadonaga und Tjian, 1986):

Das verwendete TRE-Sepharose-Material wurde von Herrn Dipl.Biol. Stephan Gebel nach einem Protokoll von Kadonaga und Tjian hergestellt.

Das immobilisierte Oligonukleotid (ca. 30 ng) wurde durch 1x Waschen in Regenerationspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 2.5 M NaCl; 0.5 mM EDTA), 3x Waschen in Aufbewahrungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.3 M NaCl; 1 mM EDTA; 0.02% NaN₃ und 5xliges Waschen in Bindepuffer (25 mM Hepes, pH 7.8; 60 mM KCl; 1 mM EDTA) vorbereitet. Nach 10 minütiger Inkubation von 250-500 µg Kernextrakt in Bindepuffer in einem Reaktionsvolumen von 250-300 µl mit poly-dIdC (2 µg/250 µg Kernextrakt) wurde die Oligonukleotid-Sepharose-Suspension zugegeben (Endvolumen ca. 500 µl). Nach 1 Stunde auf der Drehscheibe bei 4°C wurde leicht zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment 3x mit Bindepuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch 3xliges Waschen in Elutionspuffer (25 mM Hepes, pH 7.8; 400 mM KCl; 1 mM EDTA). Die eluierten Proteine wurden entweder durch Acetonfällung konzentriert und zur Gelelektrophorese oder ohne Fällung zur Immunpräzipitation eingesetzt.

31. SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970):

Es wurden 2 unterschiedliche Gelgrößen verwendet: 8x6 cm (Mighty Small Minigele; Hoefer, SanFrancisco) und 12x15 cm. Die Acrylamidkonzentration der Gele wurde für die unterschiedlichen Versuche ebenfalls variiert (5%, 7.5%, 10%). Niederprozentige Acrylamid-Gele (5%, 7.5%) wurden für eine bessere Auftrennung im hochmolekularen Bereich verwendet, während mit 10%igen Gelen gearbeitet wurde, wenn auch Proteine

<40 kD erfaßt werden sollten. Bei einem 10%igen Polyacrylamidgel aus einer Stammlösung mit 30 Gew.% Acrylamid und 0.8 Gew.% N,N'-Methylenbisacrylamid war die Endkonzentration im Trenngel 375 mM Tris-Base, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.025% TEMED und 0.02% Ammoniumperoxodisulfat. Das Sammelgel enthielt: 5% Acrylamid (Stammlösung 30 Gew.% Acrylamid und 0.8% Gew.% N,N'-Methylenbisacrylamid), 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% TEMED und 0.05% Ammoniumperoxodisulfat. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Puffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base, pH 8.3; 0.1 % SDS; 0.03 % BPB) bei RT mit einer Stromstärke von 25 mA. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hatte. Je nach Versuchsverlauf wurden die aufgetrennten Proteine entweder mit Coomassie Brilliant Blue im Gel angefärbt oder auf PVDF-Membran transferiert. Bei Zellextrakten mit radioaktiv markierten Proteinen (³⁵S-Methionin), wurden die Gele nach der Elektrophorese durch PPO-Einlagerung aktiviert, auf Whatman 3MM-Papier transferiert, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

32. Western Analyse (Kyhse-Andersen, 1984):

Unter Western Analyse versteht man eine Technik bei der Proteine auf eine Membran transferiert werden. Die transferierten Proteine können auf der Membran angefärbt, oder mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

Elektrophorese und Transfer: Proteinlysat (80-150 µg/Spur) wurde durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (7.5% Mighty Small Minigele). Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15 min in Transferpuffer (150 mM Glycin; 25 mM Tris-Base, pH 10.4; 20 % Methanol) äquilibriert. Der Transfer wurde mit dem 1-Puffersystem analog der Technik von Kyhse-Andersen durchgeführt. Für jede Transfereinheit wurden 3 Lagen Blotting-Papier benötigt, welche auf Gelgröße (8x6cm) zugeschnitten und in der entsprechenden Pufferlösung getränkt wurden. Eine Transfereinheit war folgendermaßen aufgebaut: Kathode des Blotting Geräts; Blotting-Papier, getränkt in Transferpuffer; Gel; PVDF-Membran; Blotting-Papier, getränkt in Transferpuffer; Anode des Blotting Geräts. Die PVDF-Membran mußte vor dem Transfer mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert werden. Der Transfer erfolgte von der Kathode zur Anode bei einer Stromstärke von 2.5 mA/cm² und einer Spannung von 100 Volt für 45 min.

Hybridisierung: Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit PBS (0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂; 0.6 mM MgCl₂; 6.5 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM NaH₂PO₄) abgewaschen und nachfolgend in einer Lösung von 10% fettfreiem Milchpulver in PBS für 60 min inkubiert. Dieser Vorgang diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Danach konnte die Membran direkt zur Hybridisierung mit Antikörper verwendet werden. Die Membran wurde in Plastikfolie eng eingeschweißt und mit 2 µl Antikörper-Serum in 4 ml Hybridisierungslösung (10% Milchpulver in PBS, 0.3% Tween 20) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 min auf einer Drehscheibe bei RT. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurde die Membran 3x 10 min mit PBS/0.3% Tween 20 gewaschen. Die Membran wurde nun für weitere 60 min mit ¹²⁵J-markiertem Protein A in einer Verdünnung von 1:100 (50 µl Protein-A/5 ml Hybridisierungslösung) inkubiert. Abschließend wurde die Membran 6x 10 min mit PBS/0.3% Tween 20 gewaschen, an Luft getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

33. Immunpräzipitation:

100–200 µg Protein aus Zellextrakten bzw. der Ansatz aus einer Band-Shift-Inkubation (mit oder ohne Protein Cross-Link) wurden in einem Volumen von 300 µl des jeweiligen Puffers für 1 Stunde auf Eis mit 2 µl Pre-Immunsereum inkubiert, anschließend mit einer 1:1-Mischung aus Puffer und Protein-A Sepharose versetzt und bei 1048xg zentrifugiert. Zu den Überständen wurden 1-2 µl der spezifischen Antikörper gegeben und wieder 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das an Sepharose gekoppelte Protein A abzentrifugiert (30 sek., Tischzentrifuge) und 4x 10 min mit Lysierpuffer (50 mM Tris-Base, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 % TritonX100) gewaschen. Nach 3 weiteren Waschvorgängen (2x PBS/0.3% Tween 20, 1x mit sterilem Wasser) wurden die Proben in 50 µl Proteinprobenpuffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 9.75% Glycerol; 0.01% Bromphenolblau; 2.5% β-Mercaptoethanol) aufgenommen, 2 min bei 95°C gekocht und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum Western-Blot eingesetzt oder mit DMSO entwässert, mit PPO übernacht aktiviert, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

34. Zellkultur:

Die Zellen wurden in verschieden großen Gewebekulturschalen- oder flaschen bei 5.5% CO₂ in DMEM; 10 % FCS; 1 % P/S (Penicillin: 100 U/ml; Streptomycin: 100 µg/ml) gezogen. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und rekultiviert.

Trypsinbehandlung: Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 5 ml PBS (0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂; 0.6 mM MgCl₂; 6.5 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM NaH₂PO₄) gewaschen und mit 1 ml 0.25% Trypsin bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde abgesaugt, die abgelösten Zellen in frischem Medium resuspendiert und mit einer Dichte von 5-10x10⁵ Zellen/ 9 cm Gewebekulturschale ausgesät. Für die Experimente wurden die Zellen 24-48 Stunden vor Gebrauch ausgesät.

Aufbewahrung der Zellen: Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsiniert, gezählt und bei 330xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden zu 2-5x10⁶ in 1 ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann mehrere Stunden bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die Zellen sehr rasch bei 37°C aufgetaut. Nachfolgend wurden sie in 10 ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

35. Transiente Transfektion (Kawai und Nishizawa, 1984; Graham und van der Eb, 1973):

DEAE-Dextran-Methode (HeLa-tk⁻-Zellen): Die Zellen wurden zu 5x10⁵ bis 1x10⁶ pro 9 cm Gewebekulturschale 24 bis 36 Stunden vor Transfektion angesetzt. Vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml 1x TBS (20x TBS: 25 mM Tris-HCl, pH 7.4; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 0.5 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 1x TBS: 475 ml H₂O + 25 ml 20x TBS + 300 µl 1 M Na₂HPO₄) gewaschen. Nach Absaugen des TBS wurden 1 ml DNA-DEAE-Dextran Lösung (10 µg DNA in 500 µl DEAE-Dextran; 500 µl 1 x TBS) auf die Zellen gegeben. Die Gewebekulturschalen mit den Zellen blieben 30 min bei Zimmertemperatur stehen und wurden alle 5. min leicht geschwenkt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 10 ml 1x TBS gewaschen und 10 ml Medium zugegeben, das 10 µl 0.1 M Chloroquine-Diphosphat enthält. Nach 8-12 Stunden wurden die Zellen nochmals mit 1x TBS gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion durch TPA bzw. Dexamethason oder RU 486.

Calciumphosphat-Methode (CV-1, NFB-München und NIH3T3-Zellen): 10 µg Plasmid-DNA in 1 ml einer 1:1-Mischung aus 0.25 M CaCl₂ und 2x Hepes (283 mM NaCl; 50 mM Hepes, pH 7.1; 1.5 mM Na₂HPO₄) wurden auf die Zellen in das Kulturmedium gegeben. CV-1-Zellen wurden nach 6-8 Stunden mit 15 % Glycerin in 1x Hepes nach

Absaugen des Mediums für 2 min geschockt, anschließend mit 1x TBS gewaschen und mit frischem Medium, dem TPA bzw. Dexamethason bereits zugesetzt waren, bis zur Ernte inkubiert. NIH3T3-Zellen wurden bis zur Ernte in DMEM mit 0.5% FCS kultiviert. Bei NIH3T3- und NFB-München-Zellen erfolgte der Zusatz von TPA bzw. Dexamethason 8 Stunden nach Transfektion bei Mediumwechsel. Die Zellen wurden durchschnittlich 40 - 48 Stunden bis zur Ernte inkubiert.

36. Bestimmung der Chloramphenicol Acetyltransferase Aktivität (CAT-Assay; Gorman et al., 1982a)

2 μ l 14 C-Chloramphenicol (53 mCi/mmol; 200 μ Ci/ml) wurden in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und in 80 μ l 1x TBS (20x TBS: 25 mM Tris-HCl, pH 7.4; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂ x 2H₂O; 0.5 mM MgCl₂ x 6H₂O; 1x TBS: 475 ml H₂O + 25 ml 20x TBS + 300 μ l 1 M Na₂HPO₄) aufgenommen, das die gewünschte Menge Proteinextrakt enthält. Nach Zugabe von 20 μ l Acetyl-CoEnzym A (3.52 mg/ml 1x TBS) wurde die Reaktion 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Die obere Phase wurde in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt, in 20 μ l Ethylacetat aufgenommen, und auf eine DC-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein Chloroform-Methanol Gemisch (9:1) verwendet. Nach der Chromatographie wurde die Platte an der Luft getrocknet und mit einem Kodak X-AR Film autoradiographiert. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (pMol acetyliertes Chloramphenicol pro mg Proteinextrakt pro Stunde) wurden die radioaktiven Flecken der DC-Platte ausgeschnitten und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Die CAT-Aktivität berechnet sich aus dem Bruch:

$$\frac{(\text{pMol Chloramphenicol} \times \text{cpm acetyliertes Chloramphenicol})}{(\text{mg Proteinextrakt} \times \text{cpm eingesetztes Chloramphenicol} \times \text{h})}$$

Plasmid-Konstruktionen:

Die Kollagenase-I Promoter-CAT Konstrukte -1200/+63, -517/+63 und -73/+63 wurden bereits in der Literatur beschrieben (Angel et al., 1987a). Sie wurden, wie alle verwendeten CAT-Plasmide auf pBLCAT2- bzw. pBLCAT4-Basis, in den Vektor pBLCAT5 umkloniert (siehe dazu Abschnitt III im Ergebnisteil). Im Kollagenase-I-CAT Konstrukt -517/+63 m TRE wurde der Kollagenase-Promoter mutiert :

von -72 (TGAGTCAGACAC) -61 in -74 (TGACGGATCAGCTT) -61. Die Mutation wurde durch die Kombination zweier Plasmide erhalten: -60/+63CAT und -517/-70CAT. Das Konstrukt -60/+63CAT wurde durch Bal31-Deletion des Konstrukts -73/+63CAT hergestellt (Angel et al., 1987a): -517/-70CAT wurde als *HindIII/FokI*-Restriktionsfragment aus -517/+63CAT erhalten. Nach Addition von *BamHI*-Linkern an der aufgefüllten *FokI*-Schnittstelle wurde das Fragment in den *HindIII/BamHI*-verdauten Vektor pBLCAT4 inseriert. -60/+63CAT wurde *HindIII/NcoI*-verdaut, der Überhang an der *HindIII*-Schnittstelle aufgefüllt und das Fragment in das *BamHI/NcoI*-geschnittene, an der *BamHI*-Schnittstelle aufgefüllte Konstrukt -517/-70CAT eingesetzt.

pBLCAT4 und pBLCAT5: Das Kollagenase-I TRE ähnliche Sequenzelement im pUC-Hintergrund der Vektoren (5'-CTGACACAT-3'), das 402 bp 5' vor der *HindIII*-Schnittstelle der Vektoren pBLCAT2 bzw. pBLCAT3 (Luckow und Schütz, 1987) liegt, wurde durch die Deletion des 267 bp *Eco0109/NdeI*-Restriktionsfragmentes (Positionen -482 bis -215, bezogen auf die *HindIII*-Schnittstelle) entfernt: Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen wurden die Überhänge mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend religiert. (Siehe dazu Abbildung 4 in Abschnitt III).

Die Plasmide pRSVCAT und pSVCAT sind in der Literatur beschrieben (Gorman et al., 1982 a,b).

Minimalpromoter-Konstrukte wurden durch die Modifizierung des Plasmids TATA68wt (Ryffel et al., 1989) erhalten. Die G-freie Cassette wurde durch *XHOI*-Verdau und anschließende Religation entfernt, der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pL-T. Das 1xTRE Oligonukleotid wurde in den *HindIII/BamHI*-geschnittenen Vektor, das nach Vorligation pentamere 5xTRE (alternative Orientierung der AP-1 Erkennungssequenz) in den *HindIII/BglII*-geschnittenen Vektor inseriert (vergleiche das bereits beschriebene 5xTREtkCAT in Angel et al., 1987b). In der vorliegenden Arbeit wird das 5xTRE-

Konstrukt unter verschiedenen Bezeichnungen aufgeführt: 5xTRECAT = 5xTRE-TATAAAA = 5xTRE-TATA.

4xSRE-TATAAAA: Dieses Konstrukt entspricht dem Plasmid p(DSE)TATA (König et al., 1989). Die SRE -Sequenz 5'-GGATGTCCATATTAGGACATCT-3' des *c-fos*-Promoters (Positionen -320 bis -299) war als tetrameres Kopf-Schwanz-Addukt in die *AccI*-Stelle des Minimalpromoter-Vektors pL-T inseriert worden.

1xSVE-TATAAAA: Das 233 bp *PvuII/NcoI* Restriktionsfragment (Positionen 270 bis 37) des SV40 t-Antigenpromoters, das dessen gesamte Enhancerelemente enthält, wurde nach Auffüllen der Überhänge an den Schnittstellen mit Klenow-Polymerase in die *Sall*-Schnittstelle des Vektors pL-T inseriert, deren Überhänge ebenfalls mit Klenow-Polymerase aufgefüllt waren. Die Nummerierung des SV40-Promoters bezieht sich auf Buchman et al., 1980.

Die verschiedenen TATA-Box Sequenzen wurden als Oligonukleotide gegen das entsprechende *BglIII/XhoI*-Fragment des Vektors pL-T ausgetauscht.

Das Fos-Expressionsplasmid SVfos und der entsprechende Vektor pSV sind in der Literatur beschrieben (Schönthal et al., 1988a). Für RSVfos wurde das *AccI*-Fragment aus SVfos, das den für Fos codierenden Bereich enthält, in den Vektor RSVneo inseriert (Offringa et al., 1989).

Die Expressionsplasmide der Glucocorticoidrezeptor-Konstrukte sind beschrieben (Hollenberg und Evans, 1988) oder wurden wie folgt erhalten: Δ 380-465 wurde durch Verdau des Wildtyp-Konstrukts phGR- α mit *BstXI* (Aminosäure-Position 380) und *Clal* (Aminosäure-Position 465) und nachfolgende Religation mit dem Adapter-Oligonukleotid 5'-CCGATTGCATCAT-3' / 5'-CGATGATGCAATCGGATCC-3' hergestellt. Δ 465-777: Das Wildtyp-Rezeptorplasmid wurde mit *Clal* verdaut und nach Auffüllen der Überhänge mit Klenow-Polymerase religiert, so daß eine Leserahmen-Verschiebung ab Aminosäure-Position 465 auftrat. Δ 598-777 wurde durch Verdau mit *ScaI* (Aminosäure-Position 598) und *MstII* (Aminosäure-Position 676), Auffüllen der Überhänge mit Klenow-Polymerase und Religation hergestellt. Δ 559-777 wurde von Dr. Hollenberg erhalten: Es enthält eine Deletion zwischen der *Sau3A*- (Aminosäure-Position 559) und der *BamHI*-Restriktionsschnittstelle (Aminosäure-Position 696) des Wildtyp-Rezeptors.

Die *c-jun*-Promoter-CAT Konstrukte sind beschrieben (Angel et al., 1988a). -1600/+740 entspricht dem in der Literatur angegebenen -1100/+740CAT-Konstrukt; die zusätzlichen Sequenzen wurden erst bei einer späteren Kontroll-Sequenzierung entdeckt (P. Angel, pers. Mitteilung).

Das Metallothionein-IIA-Promoter-CAT Konstrukt -620/+73 wurde aus dem beschriebenen Konstrukt pHSI (Karin et al., 1984) durch Verdau mit *PstI* (Position -620) und *NcoI* (Position +73) und Ligation dieses Fragments nach Auffüllen des Überhangs an der *NcoI*-Schnittstelle mit Klenow-Polymerase in den *PstI/BamHI*-geschnittenen Vektor pBLCAT5 hergestellt; der Überhang an der *BamHI*-Schnittstelle des Vektors wurde ebenfalls aufgefüllt. -302/+73 wurde durch Einsetzen des *HgiAI/XhoI*-Fragments (Positionen -302 und + 84) des Plasmids -620/+73 in das gleiche Plasmid -620/+73, das mit *PstI* und *XhoI* geschnitten war, erhalten. -212/+73, -134/+73 und -71/+73 wurden analog durch Umklonierung von *AvaI*-, *BssH2*- und *EagI/XhoI*-Fragmenten erhalten, wobei das 5'-Ende jeweils mit Klenow-Polymerase aufgefüllt wurde und das Zielplasmid -620/+73 *HindIII/XhoI* geschnitten und an der *HindIII*-Stelle aufgefüllt wurde. -96/+73 ist eine Bal31-Deletionsmutante, die von Dr.M.Karin zur Verfügung gestellt und in den Vektor pBLCAT5 durch Austausch eines *PvuII*-Fragmentes umkloniert wurde. -302/+73 mTRE wurde durch gezielte Mutagenese mit Hilfe des Oligonukleotids 5'-AGCCGCAAGTGTCTAGACGCGGGGCGT-3' hergestellt. Das Oligonukleotid hybridisierte zwischen den Positionen -115 und -89 und veränderte die TRE-ähnliche Sequenz an vier Stellen (fett gedruckt), wodurch für den Nachweis der erfolgreichen Mutagenese durch einfachen Restriktionsverdau die neue Restriktionsstelle *XbaI* eingeführt wurde.

MMTVCAT, GRE22 und GREpal1 wurden beschrieben (Cato et al. 1986; Strähle et al., 1987). MMTV-GRE ist identisch mit dem beschriebenen Konstrukt pHRECAT (Cato et al., 1986).

Sämtliche selbst hergestellten bzw. umklonierten CAT-Konstrukte wurden mehrfach durch Sequenzierung im Promoterbereich überprüft.

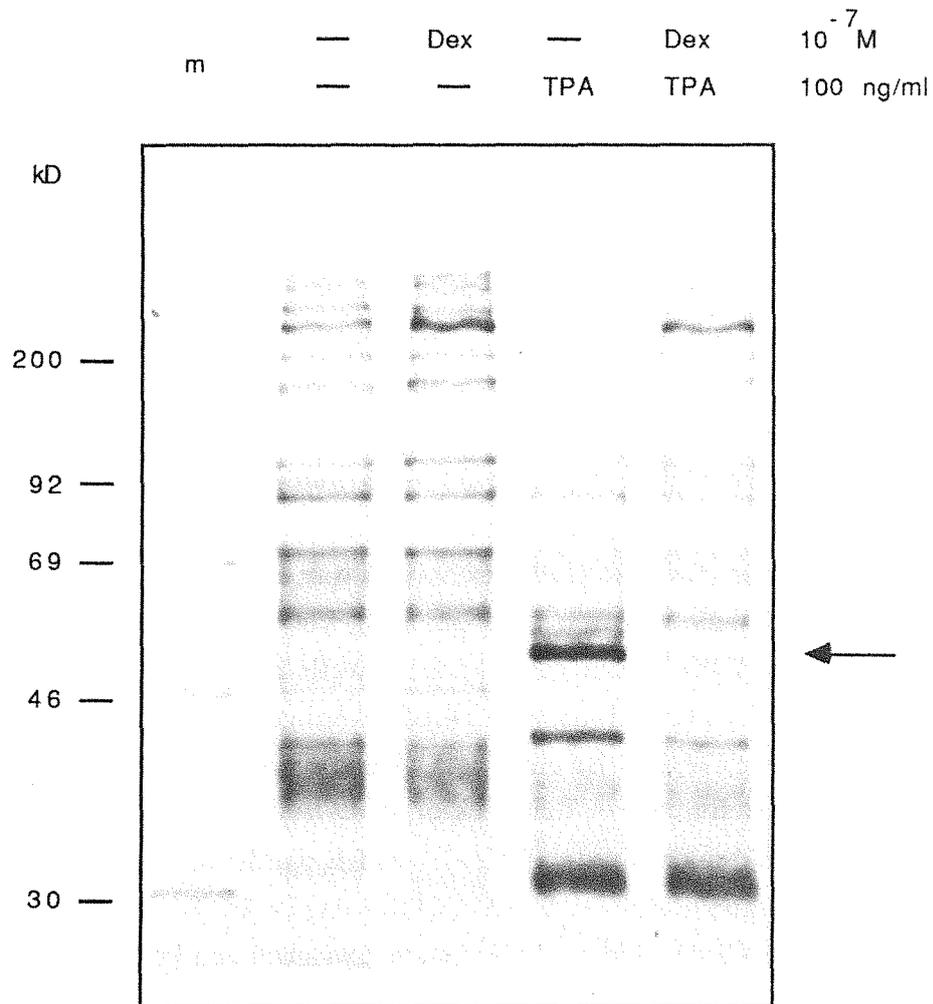


Abbildung 1: Die spezifische Inhibition TPA-induzierter Kollagenase-I Synthese durch Dexamethason.

Logarithmisch wachsende HeLa-tk⁻-Zellen wurden für 12 Stunden mit den angezeigten Mengen TPA, Dexamethason (Dex), oder beiden Agenzien zusammen behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 2.5 Stunden in Methionin-freiem Medium, dem 100 μ Ci ³⁵S-Methionin (ca. 100 pMol) zugesetzt wurden, inkubiert. Die sezernierten Proteine wurden dann nach TCA-Fällung aus dem zellfreien Überstand auf 10%igem Gel in denaturierender SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden jeweils 20000 cpm in der Elektrophorese eingesetzt. Kollagenase-I ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Ergebnisse:

I) Die Phorbolster-induzierte Synthese von Kollagenase-I wird durch Dexamethason spezifisch gehemmt.

Die Unterdrückung der Phorbolster-induzierten Kollagenase-I Synthese durch das synthetische, nicht metabolisierbare Glucocorticoidhormon Dexamethason (9α -fluoro- 16α -methyl- 11β , 17α , 21 -Trihydroxypregna- $1,4$ -dien- $3,20$ -dion) wurde zunächst durch die metabolische, radioaktive Markierung der Proteine von HeLa-tk⁻-Zellen mit ³⁵S-Methionin gezeigt. Kollagenase-I wird nach seiner Synthese von den Zellen sezerniert, d.h. aus den Zellen in die umgebende Matrix abgegeben. Es wurde daher der Überstand der Zellkultur auf den Gehalt an radioaktiv markierten Proteinen untersucht.

Die Phorbolster-Behandlung von HeLa-tk⁻-Zellen führt zur verstärkten Neu-Synthese und Sezernierung von wenigstens vier Proteinen, die nach Ausfällung aus dem Kulturmedium in eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden können: Proteine mit Molekulargewichten von etwa 55 kD, 52 kD, 42 kD und 30 kD (Abbildung 1). Die Kollagenase-I ist durch ein ausgeprägtes Signal bei 52 kD repräsentiert (Whitham et al., 1986; Angel et al., 1986, 1987a), in Abbildung 1 durch den Pfeil gekennzeichnet. Dexamethason allein führt nicht zur Induktion der Kollagenase-I, verstärkt aber die Expression mindestens zweier Proteine, bei 250 kD und 46 kD. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Dexamethason und Phorbolster (TPA) wird die Expression der 55 kD, 52 kD und 42 kD Proteine vermindert, während die Synthese des 30 kD Proteins unbeeinflusst bleibt (Abbildung 1). Gleichzeitig bleibt die Expression von wenigstens einem der durch Dexamethason induzierten Proteine (250 kD) unverändert hoch. Die Syntheserate von Kollagenase-I ist in unbehandelten HeLa-tk⁻-Zellen so niedrig, daß die Menge des während der Markierungszeit neu produzierten Proteins unterhalb des Detektionsniveaus der verwendeten Technik bleibt. In den im folgenden beschriebenen Experimenten wird gezeigt werden, daß auch die basale Expression der Kollagenase-I durch Dexamethason reprimiert wird.

Das Experiment zeigt, daß die Behandlung von HeLa-tk⁻-Zellen mit Dexamethason nicht zu einer generellen Unterdrückung der Proteinproduktion führt, sondern daß das Hormon spezifisch negative und positive Reaktionen in der Synthese und Sekretion von Proteinen bewirkt. Die Kollagenase-I-Expression wird durch Dexamethason reprimiert.

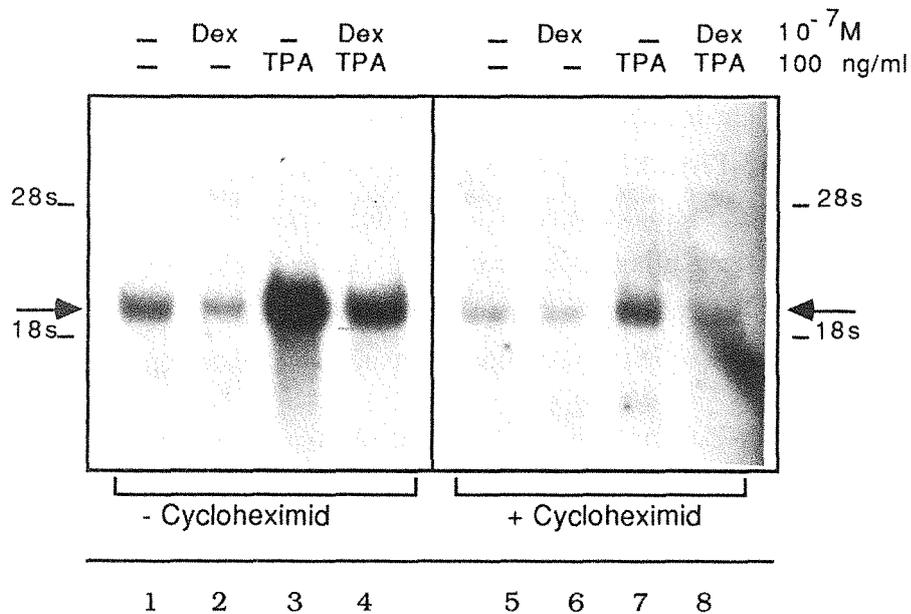


Abbildung 2: Die Repression der Kollagenase-I Expression durch Dexamethason spiegelt sich wider in der Verminderung der mRNA-Akkumulation.

Je 5 μ g polyA⁺-RNA aus logarithmisch wachsenden menschlichen Hautfibroblasten (NFB-München), die für 10 Stunden mit den angegebenen Mengen TPA und Dexamethason (Dex) in Anwesenheit (Spuren 5-8) und Abwesenheit (Spuren 1-4) des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid (10^{-5} M) behandelt waren, wurden nach Größenauftrennung im "Northern-Blot"-Verfahren auf ein Nitrocellulose-Filter übertragen. Die Hybridisierung der RNA erfolgte durch Inkubation des Filters mit dem Nick-translatierten, ³²P-markierten Kollagenase-I cDNA-Plasmid pCllase-I (Angel et al., 1987a). Das Kollagenase-I-spezifische Signal ist mit dem Pfeil gekennzeichnet.

II) Repression der Kollagenase-I mRNA Akkumulation durch Dexamethason.

Aufgrund von *in vitro* Translationsexperimenten in zellfreien Systemen wurde bereits vermutet, daß die negative Kontrolle der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide auf pre-translatorischem Niveau stattfindet (Bauer et al., 1985). Tatsächlich spiegelt sich die Inhibition der Proteinsynthese in der verminderten Akkumulation der Kollagenase-I mRNA in Dexamethason-behandelten Zellen wieder.

Die Northern-Analyse von primären menschlichen Hautfibroblasten (NFB-München) zeigt, daß die Glucocorticoidbehandlung zu einer Verminderung der Kollagenase-I mRNA-Menge führt (Abbildung 2). Die hormonbedingte Verminderung der zur Translation zur Verfügung stehenden mRNA Menge findet nicht nur in Phorbol-ester-behandelten Zellen statt (Abbildung 2, Spuren 3 und 4). Auch die nicht mit TPA behandelten Zellen weisen nach 14-stündiger Inkubation mit dem Hormon einen geringeren Gehalt an spezifischer RNA auf (Abbildung 2, Spuren 1 und 2). In beiden Fällen verbleibt aber trotz der Hormonbehandlung eine deutlich meßbare Menge an Kollagenase-I mRNA in den Zellen, ein Befund, der sich mit der in der Literatur beschriebenen nur 85 %igen Inhibition Trypsin-aktivierbaren Kollagenase-I-Enzyms in dem verwendeten Zelltyp deckt (Bauer et al., 1985). In HeLa-tk⁻-Zellen dagegen, in denen die Kollagenase-I Proteinsynthese durch Dexamethason vollständig blockiert wird (Abbildung 1), wird durch die Hormonbehandlung auch die Kollagenase-I RNA-Konzentration auf ein nicht detektierbares Maß gesenkt (Abbildung 7). Der in Abbildung 2 ebenfalls dargestellte Einfluß von Cycloheximid auf die Repression von Kollagenase-I durch Dexamethason wird in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit diskutiert.

Die Transkription des Kollagenase-I Gens erfolgt von mehreren Startstellen aus, die alle in gleicher Weise zur verstärkten RNA-Synthese nach Phorbol-ester-Induktion genutzt werden (Angel et al., 1987a). Um festzustellen, ob die Repression durch Glucocorticoide ebenfalls alle produzierten mRNA-Spezies der Kollagenase-I trifft oder eventuell nur bestimmte Transkriptionsstartstellen im Gen durch die Hormonbehandlung blockiert werden und dadurch eine "Restaktivität" des Gens verbleibt, wurde eine Nuclease-S₁ Analyse mit poly-A⁺ RNA aus CV-1-Zellen durchgeführt. Da dieser Zelltyp nicht über einen endogenen Steroid-Rezeptor verfügt (Griguere et al., 1986), wurden die Zellen 36

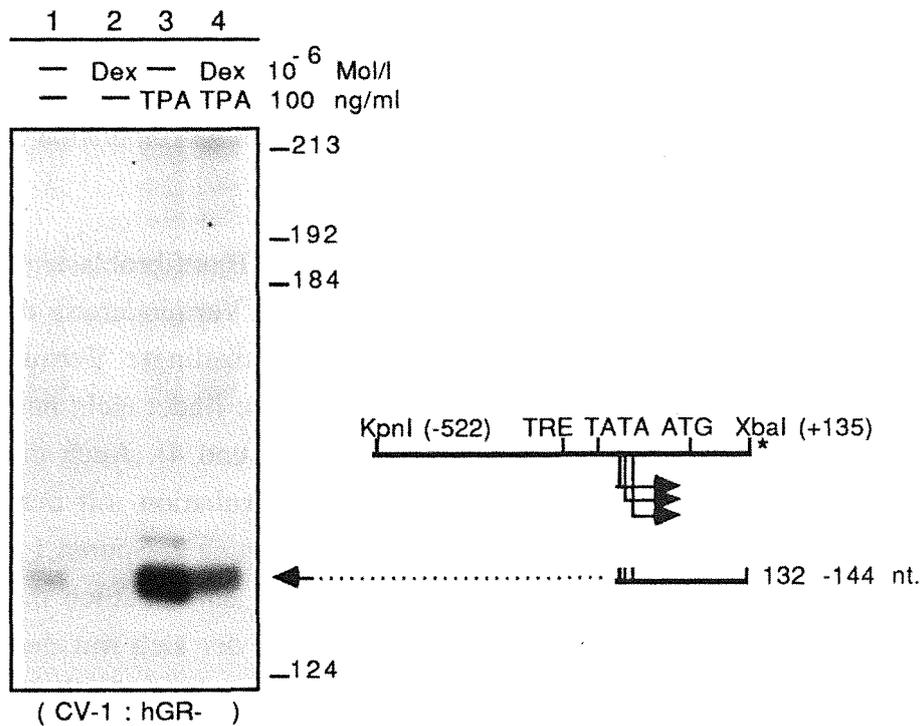


Abbildung 3: Durch Dexamethason werden die von verschiedenen Startstellen aus transkribierten mRNA-Spezies in gleicher Weise reprimiert.

Logarithmisch wachsende CV-1 Zellen wurden mit je 5 µg des Rezeptor-Expressionsplasmids phGR-α transfiziert und 24 Stunden mit den angegebenen Mengen TPA und Dexamethason (Dex) behandelt. Anschließend wurde die polyA⁺-RNA isoliert, deren Gehalt an spezifischen Kollagenase-I Transkripten durch Nuclease-S₁ Analyse mit jeweils 5 µg polyA⁺-RNA bestimmt wurde. Als spezifische Probe wurde ein ³²P-markiertes, 656 bp langes *KpnI/XbaI*-Restriktionsfragment des Kollagenase-I Subklons pClase-I verwendet (Angel et al., 1987a). Die Probe wird durch Kollagenase-I Transkripte mit Längen von 139 bis 144 bp vor dem Nuclease-Verdau geschützt.

Stunden vor Präparation der RNA mit einem Expressionsplasmid für den menschlichen Glucocorticoidrezeptor (phGR- α) transfiziert. Auf diesen Aspekt des Experiments wird in einem späteren Kapitel eingegangen. Als Hybridisierungsprobe wurde ein *KpnI/XbaI*-Fragment der Kollagenase-I cDNA verwendet, das an der *XbaI*-Schnittstelle radioaktiv markiert war. Die Länge der als DNA-RNA-Hybride vor dem Nuclease-Verdau geschützten Fragmente gibt dadurch den Abstand zwischen der *XbaI*-Schnittstelle, die im codierenden Bereich des Gens lokalisiert ist, und der jeweiligen Transkriptionsstartstelle an (Abbildung 3).

In unbehandelten Zellen sind, wie erwartet, eine Reihe von spezifischen Transkripten mit einer Länge von 132 bp bis 144 bp als relativ schwache Signale identifizierbar (Abbildung 3, Spur 1). Die 6-stündige Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster TPA führt zur Verstärkung dieser Signale, wobei jedes der spezifischen Transkripte in gleicher Weise induziert scheint (Abbildung 3, Spur 3). Gibt man gleichzeitig Dexamethason, dann ist die RNA-Konzentration sowohl in unbehandelten als auch in Phorbolster-behandelten Zellen reduziert, und zwar sind alle spezifischen Transkripte in gleichem Maße betroffen (Abbildung 3, Spuren 2 und 4). Dies zeigt, daß die Hormonbehandlung alle Transkriptionsstartstellen in gleichem Maße reprimiert. Auch in diesem Experiment verbleibt trotz der Dexamethason-Behandlung der Zellen eine deutlich meßbare Menge an Kollagenase-I mRNA. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Inhibition der Kollagenase-I-Synthese auch in dieser Zelllinie nur unvollständig erfolgt. Aufgrund der Tatsache, daß die Inhibition nur in Zellen mit funktionellem Glucocorticoidrezeptor erfolgt (siehe Abschnitt VII) und daß die transfizierte Rezeptor cDNA nicht in allen zur RNA-Präparation verwendeten CV-1-Zellen exprimiert worden sein kann, ist diese "Restmenge" an Kollagenase-I RNA wahrscheinlich in den nicht auf das Hormon reagierenden Zellen produziert worden.

Kollagenase-I und Kontrollkonstrukte	-TPA		Relative Aktivität	+TPA		Relative Aktivität
	-Dex	+Dex		-Dex	+Dex	
-1200/+63	622 ±79	137 ±16	0.22 ±0.05	23636 ±879	6145 ±291	0.26 ±0.02
-517/+63	1117 ±85	173 ±25	0.15 ±0.02	34385 ±1668	6550 ±970	0.19 ±0.04
-73/+63	1423 ±426	192 ±64	0.15 ±0.09	22119 ±8784	4106 ±1004	0.19 ±0.03
-517/+63 mTRE	41 ±6	38 ±7	0.93 ±0.15	51 ±9	39 ±5	0.78 ±0.17
pBLCAT ₅	19 ±4	17 ±3	0.93 ±0.36	24 ±4	27 ±6	1.10 ±0.07
pSV ₂ CAT	7999 ±117	7528 ±203	0.94 ±0.02	8176 ±570	8044 ±410	0.98 ±0.02
pRSVCAT	6433 ±877	7023 ±682	1.09 ±0.04	8220 ±760	7965 ±575	0.97 ±0.02

Tabelle 1: Der Einfluß der Dexamethason- und TPA-Behandlung auf die Expression transient transfizierter Kollagenase-I-CAT Konstrukte.

Je 5 µg der aufgelisteten Kollagenase-I-CAT Konstrukte wurden in 1×10^6 HeLa-tk⁻-Zellen transfiziert und mit 100 ng/ml TPA bzw. 1×10^{-6} M Dexamethason für 40 Stunden inkubiert. Die CAT-Aktivität wurde nach dem im Methodenteil angegebenen Protokoll bestimmt.

III) Die Repression der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide findet auf Transkriptionsebene statt.

Um aufzuklären, ob Glucocorticoide die Expression der Kollagenase-I durch eine Inhibition der Transkriptionsinitiation reprimieren und um, gegebenenfalls, ein für diese Hormonwirkung verantwortliches cis-wirkendes DNA-Element in der Kollagenase-DNA zu lokalisieren, wurde eine Reihe von Transfektionsexperimenten mit chimären Kollagenasepromoter-Reporter Genkonstrukten durchgeführt.

Die bisher ermittelten, für die Transkriptionsregulation der Kollagenase-I verantwortlichen, cis-wirkenden DNA-Sequenzen wurden in der 5'-flankierenden Region des Gens gefunden. Als wesentliches Kontroll-Element wurde das auf den Phorbolster TPA reagierende, induzierbare Enhancer-Element TRE identifiziert (Angel et al., 1987a; Stein et al., 1989a). Tatsächlich wird auch die negative Regulation der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide durch den 5'-flankierenden Bereich des Gens vermittelt. Die Expression chimärer Gen-Konstrukte, in denen Kollagenase-I Promoter-Sequenzen von Position -1200 bis +63 bzw. -517 bis +63 mit dem codierenden Bereich des bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gens (CAT) gekoppelt sind, wird durch den Einfluß des Steroids reprimiert. Sowohl die basale Expression als auch die Phorbolster-induzierte Synthese des CAT-Enzyms werden durch die Hormonbehandlung der transient mit den entsprechenden Genkonstrukten transfizierten Zellen stark vermindert. (Tabelle 1).

Die in dieser Arbeit angegebenen Daten für die CAT-Aktivität aus transfizierter, transient exprimierter DNA beruhen auf mindestens drei, vielfach bis zu zehn gleichartigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind in den Tabellen jeweils unter den entsprechenden Mittelwerten angegeben. Die sich aus den Standardabweichungen ableitenden, mit bis zu 50 % sehr großen Schwankungen der absoluten Enzymaktivität lassen sich auf die starke Variation der Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Experimenten zurückführen. Streng zu vergleichen sind daher nur die CAT-Aktivitäten aus einem Experiment; hier sind alle Zellen mit der gleichen DNA-Lösung behandelt worden, so daß die Transfektionseffizienz in den Parallelansätzen gleich sein sollte. Die relativen Aktivitäten, also das Verhältnis zwischen der CAT-Expression in unbehandelten Zellen und der in behandelten Zellen, scheint dagegen weitgehend unabhängig von der Transfektionseffizienz zu sein. Die sehr kleinen Standardabweichungen der relativen

Aktivität belegen, daß die Faktoren, um die die jeweilige CAT-Produktion mit Phorbolster induziert bzw. mit Glucocorticoidhormon reprimiert wird, von der absoluten Menge an synthetisiertem Enzym kaum beeinflußt sind.

Mit Ausnahme des CAT-Konstruktes -517/+63 mTRE, bei dem das AP-1 bindende Sequenzelement im Promoter durch unspezifische Linker-Sequenzen ersetzt ist und das ich erst im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisiert habe, sind die in Tabelle 1 angegebenen Kollagenase-I-Promoter Konstrukte bereits früher, bei der Ermittlung des auf Phorbolster reagierenden Elements der Kollagenase-I, eingesetzt worden (Angel et al., 1987a). Damals stellte sich heraus, daß auch das verwendete Expressionsvektor-System pBLCAT₂/pBLCAT₃ (Luckow und Schütz, 1987) selbst durch Phorbolster induziert war. Um ein Vektorsystem zur Verfügung zu haben, das keinen eigenen Beitrag zur Regulation des transfizierten Genkonstrukts leistet, habe ich versucht, die Ursache dieser Vektorinduktion durch Phorbolster zu ermitteln und zu beseitigen. Die Analyse der Vektorsequenzen ergab, daß sich in einer Entfernung von 402 Basenpaaren zur Insertionsstelle der jeweiligen Promotersequenzen ein Element der Sequenz 5'- CTG ACA CAT -3' im Vektorplasmid befindet. Diese Sequenz entspricht, umgekehrt komplementär, bis auf ein Basenpaar dem im Kollagenase-I Promoter identifizierten TRE (Angel et al., 1987a). Die Deletion eines 267 bp großen *Eco0109/NdeI*-Restriktionsfragmentes aus pBLCAT₂ bzw. pBLCAT₃, das das "Vektor-TRE" enthielt, führte zu einem Verlust der Phorbolster-Induzierbarkeit der Vektoren. In Abbildung 4 ist die Vektor-Modifizierung exemplarisch für pBLCAT₂(4) dargestellt. Die Deletion des Restriktionsfragmentes hat in unbehandelten Zellen nur geringen Einfluß auf die Aktivität des Vektors, der über einen eigenen, relativ starken Promoter verfügt (Abbildung 4, Spuren 1 und 3). Die etwa 10-fache Steigerung der CAT-Synthese des Ausgangsplasmids pBLCAT₂ nach Phorbolster-Induktion erfolgt beim verkürzten Vektor pBLCAT₄ nicht (Abbildung 4, Spuren 2 und 4). Umgekehrt läßt sich die Induzierbarkeit des verkürzten Vektors pBLCAT₄ wieder herstellen, wenn ein synthetisches Oligonukleotid der oben genannten Sequenz in die "multiple cloning site" (MCS), die Klonierungsstelle für Fremd-Sequenzen, inseriert wird. Die Induzierbarkeit dieses Konstruktes ist vergleichbar mit der Phorbolster-Aktivierbarkeit eines Konstruktes, bei dem ein synthetisches Oligonukleotid der Kollagenase-I TRE-Sequenz an gleicher Stelle inseriert ist.

Die Deletion des *Eco0109/NdeI*-Fragmentes aus pBLCAT₂ bzw. pBLCAT₃ führte nicht nur zum Verlust der Phorbolster-Induktion dieser Vektoren. Auch die Kontrolle der

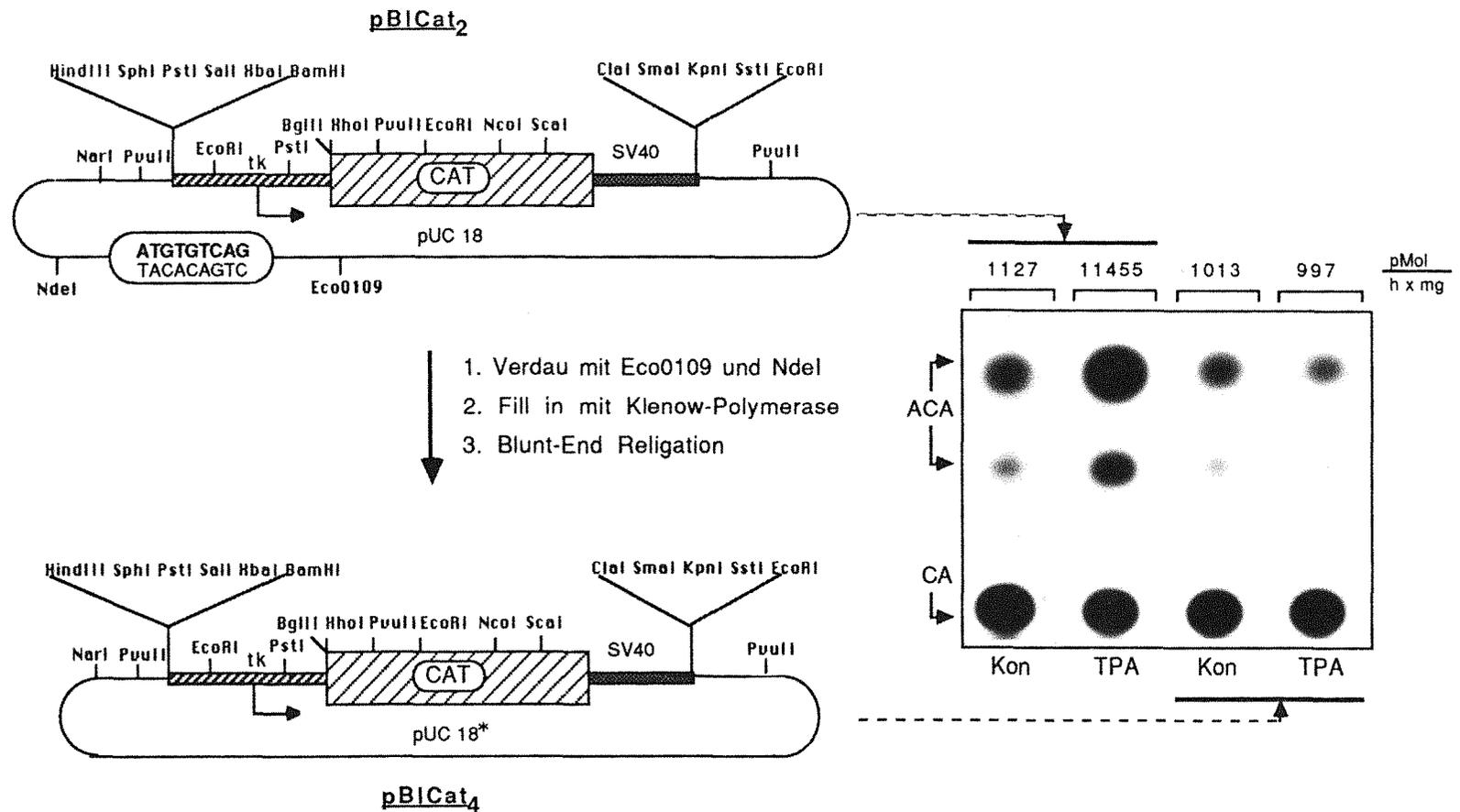


Abbildung 4: Die verwendeten CAT-Vektoren sind nicht mit TPA induzierbar.

Durch die Deletion des Eco0109/NdeI Restriktionsfragmentes aus den verwendeten CAT-Vektoren konnte deren TPA-Induzierbarkeit ausgeschaltet werden. Die Auswirkung der Deletion auf die Expression in unbehandelten oder TPA-behandelten HeLa-tk⁻-Zellen ist im Vergleich zum Ausgangsvektor dargestellt. (Kon = unbehandelt; TPA = 100 ng/ml). Transfektion und CAT-Assay erfolgten nach den im Methodenteil angegebenen Standard-Protokollen.

Expression über Vektorsequenzen durch andere Regulatoren, z.B. UV-Licht, Mitomycin C und Interleukin 1, war nach der Modifizierung verhindert. Da das in pBLCAT2 und pBLCAT3 ermittelte TRE im pUC-Hintergrund dieser Vektoren liegt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Reporter-gen-Konstrukte in die Vektoren pBLCAT4 bzw. pBLCAT5 umkloniert, oder die entsprechende Sequenz aus dem pUC-Hintergrund der verwendeten Plasmide deletiert.

Durch die Insertion von Enhancerelementen, die selbst nicht durch Dexamethason reguliert werden, konnte gezeigt werden, daß auch die Wirkung des Hormons auf die Kollagenase-I Expression nicht über Vektorsequenzen vermittelt wird sondern von der Anwesenheit der Kollagenase-I Promotersequenzen abhängig ist (Abbildung 6). Obwohl die für Tabelle 1 verwendeten Kollagenase-I-Promoter Konstrukte noch 63 Basenpaare untranslatierten, codierenden Bereich enthalten, in dem RNA-stabilisierende Regulationselemente lokalisiert sein könnten, deutet die Verminderung der Expression des zu Kollagenase-I vollkommen unterschiedlichen CAT-Gens stark auf eine Transkriptionskontrolle durch Glucocorticoide hin. Eindeutig belegt werden konnte diese Vermutung durch die Ermittlung der negativ regulierten Ziel-Sequenz der Hormone im Kollagenase-Promoter (Tabelle 2, nächster Abschnitt) und durch ein "nuclear run on"-Experiment, mit dem eindeutig die Blockierung der RNA-Synthese der Kollagenase-I nach Glucocorticoid-Behandlung der Zellen gezeigt werden konnte (R.Offringa, pers. Mitteilung).

IV) Das auf Phorbolster reagierende Element (TRE) ist die Zielsequenz für die negative Regulation des Kollagenase-I Promoters durch Dexamethason.

Für den negativen Effekt von Glucocorticoidhormonen auf die Kollagenase-I Expression ist das wichtigste Regulationselement des Promoters, das auf Phorbolster reagierende TRE, erforderlich. Dieser Enhancer befindet sich zwischen den Positionen -73 und -65, bezogen auf den proximalen Transkriptionsstart. Durch die Insertion von unspezifischen Linker-Sequenzen in das chimäre Konstrukt -517/+63, die zu einer Veränderung der Sequenzen zwischen -73 und -60 führte (Abbildung 5), verringerte sich die basale Aktivität des Promoters um etwa 95 Prozent, so daß die CAT Expression des mutierten Konstruktes nur noch etwa doppelt so stark wie die des Vektors (pBLCAT5) allein war (Tabelle 1, Zeilen 4 und 5). Neben der Verminderung der Aktivität in unbehandelten

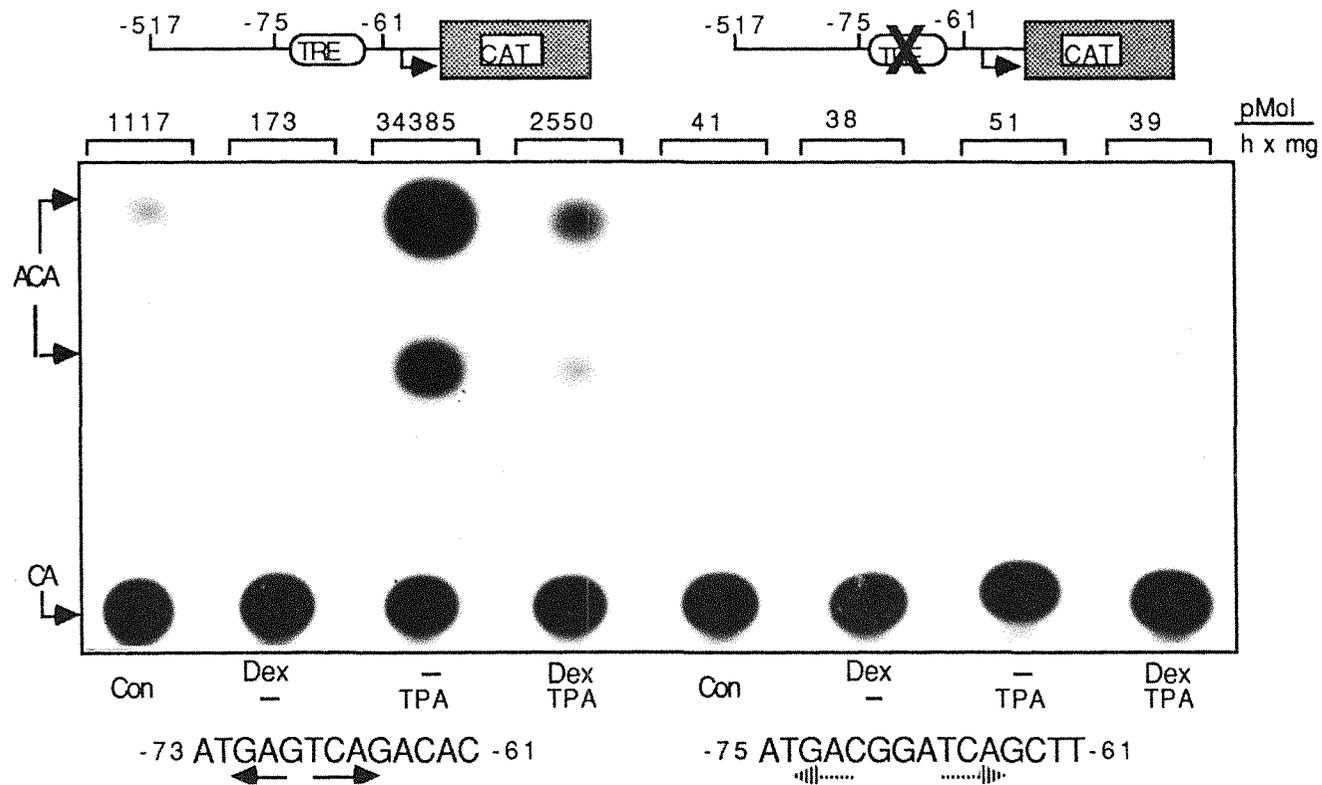


Abbildung 5: Das TRE ist für die spontane und TPA-induzierte Aktivität des Kollagenase-I Promoters erforderlich.

Je 5 µg der schematisch dargestellten Kollagenase-Konstrukte -517/+63-CAT bzw. -517/+63mTRE wurden transient in HeLa-tk⁻-Zellen transfiziert. Die im mutierten Konstrukt veränderte Sequenz im Bereich der AP-1-Bindestelle (rechts) ist gegenüber der Wildtyp-Sequenz (links) gezeigt. Die Zellen wurden für 40 Stunden unbehandelt, mit 100 ng/ml TPA, mit 10⁻⁶ M Dexamethason (Dex) oder beiden Agenzien gleichzeitig inkubiert und anschließend auf ihren Gehalt an CAT-Enzym untersucht. Die spezifische Aktivität der Umsetzung von Chloramphenicol (CA) zu acetyliertem Chloramphenicol (ACA) ist angegeben.

Zellen wurde durch die Zerstörung der TRE-Sequenz auch die Induzierbarkeit des Kollagenase-I Promoters durch Phorbolster-Behandlung verhindert (Abbildung 5; Tabelle 1). Die Behandlung der Zellen mit Dexamethason allein oder in Kombination mit TPA hatte ebenfalls keinen negativen Einfluß mehr auf die Expression des im TRE mutierten Kollagenase-I-CAT Konstrukts (Abbildung 5; Tabelle 1). Durch das Experiment ist die zentrale Stellung des TRE im Kollagenase-I Promoter erneut bestätigt: für die basale und die Phorbolster-induzierte Transkription des Gens ist dieser Enhancer erforderlich. Seine Beteiligung an der negativen Regulation des Gens durch Glucocorticoidhormone wird durch das Experiment nicht deutlich, da der mutierte Promoter bereits fast vollständig inaktiv ist.

Der Kollagenase-I Promoter enthält neben der AP-1 bindenden TRE-Sequenz weitere, bisher nicht charakterisierte Regulationselemente, die einen modulierenden Einfluß auf die Aktivierbarkeit des Gens durch Phorbolster haben (Jonat et al., 1989). Die Deletion der 5' vom TRE befindlichen Sequenzen erbrachte aber keine Änderung in der Expressionshemmung der entsprechenden Gen-Konstrukte durch Glucocorticoidhormone. Auch das am weitesten 5'-deletierte Promoter-CAT Konstrukt -73/+63, das das AP-1 bindende TRE noch enthält, war durch Dexamethason noch reprimiert (Tabelle 1, Zeile 3).

Der eindeutige Beweis, daß das TRE nicht nur für die Regulation des Kollagenase-I Promoters essentiell ist, sondern allein sowohl für die Aktivierung durch Phorbolster als auch für die Reprimierung durch Glucocorticoidhormone ausreicht, wurde durch Transfektionsexperimente mit Genkonstrukten erbracht, die außer der AP-1 Bindungsstelle keine weiteren Kollagenase-I Sequenzen enthielten. Diese Konstrukte wurden durch einfache bzw. mehrfache Insertion von synthetischen Oligonukleotiden der TRE-Sequenz 5'-ATG AGT CAG-3' in ein Derivat des promoterlosen Vektors pBLCAT5 hergestellt. Dieses Vektorderivat (pL-T; TATAAAA in Tabelle 2, Zeile 5) enthält zwischen der Insertionsstelle für Fremdsequenzen und dem für CAT codierenden Bereich nur eine von Linker-Sequenzen flankierte, synthetische TATA-Box (schematische Darstellung in Abbildung 6), so daß eine Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren als dem TATA-Faktor kaum möglich erscheint und eine Regulation der Transkription nur über inserierte Enhancer-Elemente erfolgen kann.

Enhancer Konstrukte	-TPA		Relative Aktivität	+TPA		Relative Aktivität
	-Dex	+Dex		-Dex	+Dex	
1xTRE-TATAAA (Collagenase -73/-65)	62 ±10	12 ±3	0.20 ±0.08	192 ±16	38 ±8	0.20 ±0.06
5xTRE-TATAAA (Collagenase -73/-65)	2755 ±423	505 ±114	0.18 ±0.02	24837 ±1568	4555 ±198	0.18 ±0.004
4xSRE-TATAAA (Fos -320/-299)	1145 ±242	1185 ±188	1.04 ±0.06	11360 ±786	10473 ±1058	0.96 ±0.04
1xSVE-TATAAA (SV40 early -261/-37)	11341 ±839	10888 ±977	0.96 ±0.02	12112 ±763	12364 ±970	1.02 ±0.03
TATAAA (Vector)	10 ±6	9 ±5	0.89 ±0.10	9 ±6	11 ±7	1.25 ±0.07
MMTV-LTR (Mouse Mammary Tumor Virus -631/+125)	125 ±36	14168 ±4465	113.30 ±9.50			

Tabelle 2: Das TRE der Kollagenase-I vermittelt spezifisch die Repression durch Dexamethason.

Je 5 µg der angegebenen Enhancer-CAT Konstrukte im Minimalvektor TATAAAA (pL-T) wurden in HeLa-tk⁻-Zellen transfiziert. Die Bedingungen entsprachen den in Tabelle 1 und im Methodenteil aufgeführten. Zum Vergleich der Aktivität wurden das 1xTRE-Konstrukt aus Tabelle 4 und das MMTV-Konstrukt aus Tabelle 3 mit aufgeführt. Für MMTV-CAT wurde keine Dexamethasonbehandlung in Anwesenheit von TPA durchgeführt.

Das Promoter-Konstrukt, das nur ein synthetisches Kollagenase-I TRE enthält, wurde durch Phorbol ester etwa 3-fach induziert. Sowohl die basale als auch die TPA-induzierte CAT-Synthese wurden durch Dexamethason um etwa 80 % reduziert (Tabelle 2, Zeile 1). Die basale Expression des Konstruktes mit fünf inserierten AP-1 Bindungsstellen war dramatisch erhöht und auch seine Induktion durch Phorbol ester war stärker ausgeprägt. Die Hormon-Behandlung der Zellen führte aber auch bei diesem synthetischen Promoter zu einer Verminderung der Expression in einem Ausmaß, das der Repression des 1xTRE bzw. des Wildtyp-Promoters entspricht (Tabelle 2, Zeile 2).

Die Experimente zeigen, daß die Repression der Kollagenase-I Expression durch Dexamethason auf Transkriptionsebene erfolgt und durch das cis-wirkende DNA-Element zwischen den Positionen -73 und -65 vermittelt wird.

V) Die Expressionshemmung durch Glucocorticoide ist für das auf Phorbol ester reagierende Element (TRE) der Kollagenase-I spezifisch.

Wie bereits in Abbildung 1 gezeigt wurde, bewirkt die Behandlung von Zellen mit Dexamethason keine generelle Hemmung der Proteinsynthese. Die Inhibition der Expression scheint eher spezifisch für einige Gene, darunter auch Kollagenase-I, zu erfolgen. Die Spezifität der hormonellen Transkriptionsrepression für das TRE der Kollagenase-I konnte durch Transfektionsexperimente mit Promoter-Konstrukten, die andere Enhancer-Elemente als das TRE enthielten, bewiesen werden. Für diese Experimente wurden sowohl Promoter-Konstrukte eingesetzt, die in den transfizierten HeLa-tk⁻-Zellen durch Phorbol ester aktivierbar sind als auch solche, die in diesen Zellen nicht durch TPA reguliert werden.

In HeLa-tk⁻-Zellen konnte die Aktivität des frühen Promoters für das kleine t-Antigen von SV40 nicht durch Phorbol ester-Behandlung gesteigert werden (pSV₂CAT in Tabelle 1; Karin und Herrlich, 1989), obwohl dieser Promoter AP-1 bindende Sequenzelemente enthält. Im Kontext der SV40-Sequenzen scheinen diese Enhancer-Elemente allerdings nur unwesentlich zur Transkriptionsaktivität des Promoters beizutragen (Sassone-Corsi und Borelli, 1986; Nomiyama et al., 1987). Ebenso ist die Aktivität des Promoters des Rous-Sarkoma-Virus (RSV) in HeLa-tk⁻-Zellen nicht durch TPA beeinflusst (pRSVCAT in Tabelle 1; Angel et al., 1987b). Beide Promotoren wurden auch durch die Behandlung der Zellen mit Dexamethason nicht inhibiert (Tabelle 1). Ein 5'-deletierter Promoter des

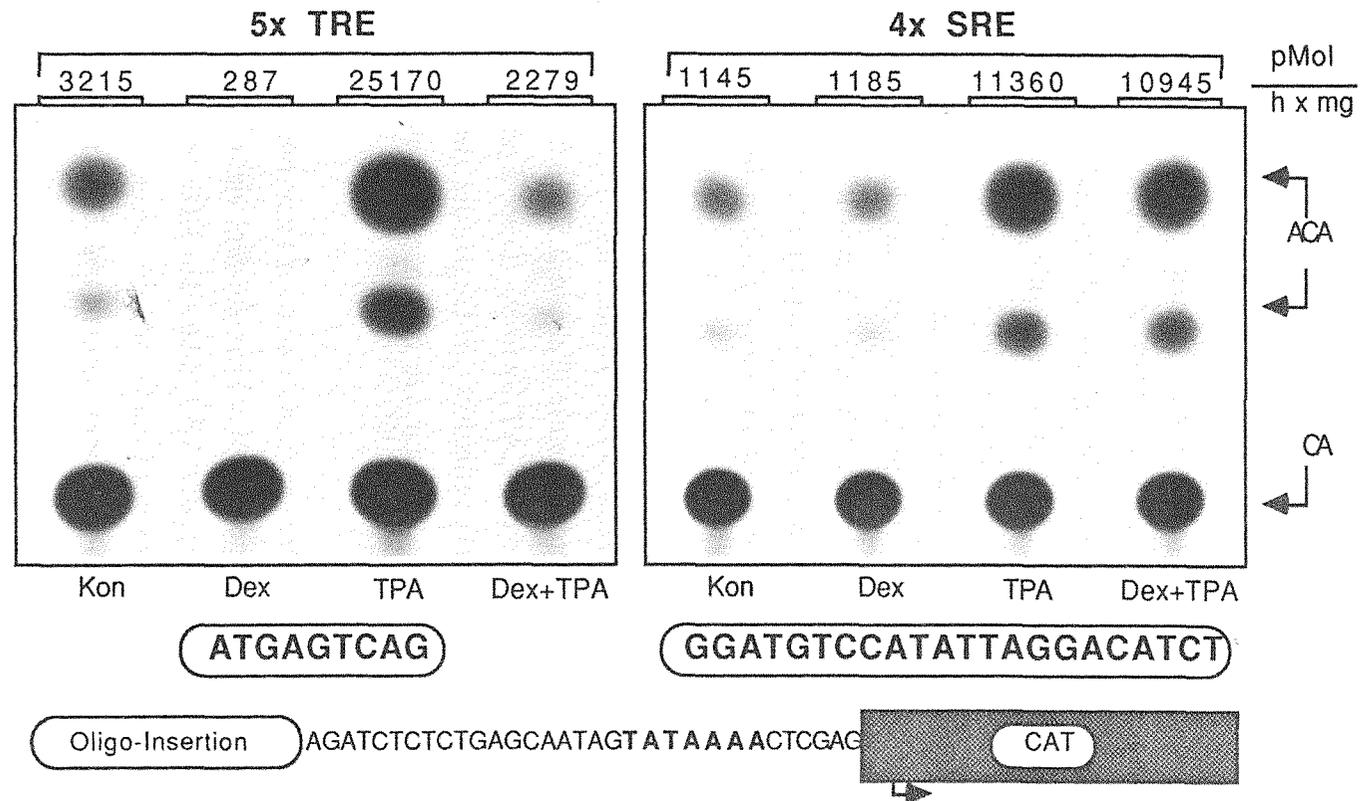


Abbildung 6: Die Repression der Transkription durch Deexamethason wirkt spezifisch auf das TRE.

Die Sequenz zwischen TATA-Box (fett gedruckt) und Oligonukleotid-Insertionsstelle des Vektors pL-T ist dargestellt. 5xTRE ist eine pentamere Insertion (alternierende Orientierung) der links angegebenen TRE-Sequenz (inklusive zusätzlicher, nicht abgebildeter Linker, 5'-*HindIII*-*BamHI*-3'), 4xSRE ist eine tetramere Insertion (Kopf-Schwanz Addukt) der rechts dargestellten SRE-Sequenz (in *AccI*). Die Bedingungen des Experiments sind in Abbildung 5 angegeben.

menschlichen Metallothionein-IIA Gens dagegen, bei dem der Hormon-induzierbare Enhancer (GRE) und das AP-1 bindende Sequenzelement entfernt wurden, war weiterhin durch Phorbolster induziert (siehe Abschnitt XIV). Trotzdem wurde auch die Transkriptionsaktivität dieses Promoters nicht durch Dexamethason gehemmt (Abbildung 21, rechter Teil).

Weitere Beweise für die Sequenz-Spezifität der Transkriptionshemmung durch Glucocorticoide wurden durch die Transfektion von CAT-Konstrukten mit synthetischen Promotoren erhalten: auch isolierte Enhancer-Elemente aus SV40- und *c-fos*-Promotoren wurden, inseriert vor die synthetische TATA-Box des Minimal-Vektors pL-T (siehe oben), nicht durch Dexamethason reguliert. Die SV40-Sequenzen von Position 270 (*PvuII*) bis 37 (*NcoI*; Nummerierung des SV40-Genoms nach Buchman et al., 1980), die die gesamte Enhancer-Struktur des frühen Promoters des kleinen t-Antigens repräsentieren, vermittelten eine sehr starke, Phorbolster-unabhängige Spontanexpression des Konstrukts, die durch Dexamethason nicht beeinflusst war (SVE in Tabelle 2). Die vierfach-Insertion des durch Serumfaktoren induzierten "dyad symmetry element" des *c-fos*-Gens (*c-fos* Promoter von Position -320 bis -299, bezogen auf die Startstelle der Transkription; 4xSRE), verursachte eine deutlich meßbare Expression des Genkonstrukts in unbehandelten Zellen, die durch Phorbolster-Behandlung etwa 10-fach gesteigert werden konnte (Tabelle 2, Zeile 3; Büscher et al., 1988). Weder die basale noch die induzierte CAT-Synthese dieser Konstrukte wurden jedoch durch Dexamethason-Behandlung reduziert, im Gegensatz zur Inhibition der Expression eines parallel transfizierten, bis auf die Enhancer-Insertion identischen 5xTRE-Konstruktes (Tabelle 2; Abbildung 6).

Offensichtlich wird also durch Dexamethason nicht ein durch Phorbolster induzierter, genaktivierender Signalweg in der Zelle generell blockiert, sondern vielmehr die Funktion eines bestimmten Transkriptionselementes, des AP-1 bindenden TRE, negativ beeinflusst. Die Spezifität der Wirkung des Hormons wird noch dadurch verdeutlicht, daß ein zur Kontrolle der Hormonbehandlung bei den oben genannten Experimenten parallel transfiziertes Genkonstrukt, das den Promoter des Glucocorticoid-induzierbaren Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV) enthielt, durch die Hormonbehandlung jeweils stark aktiviert wurde (Tabelle 2, Zeile 6).

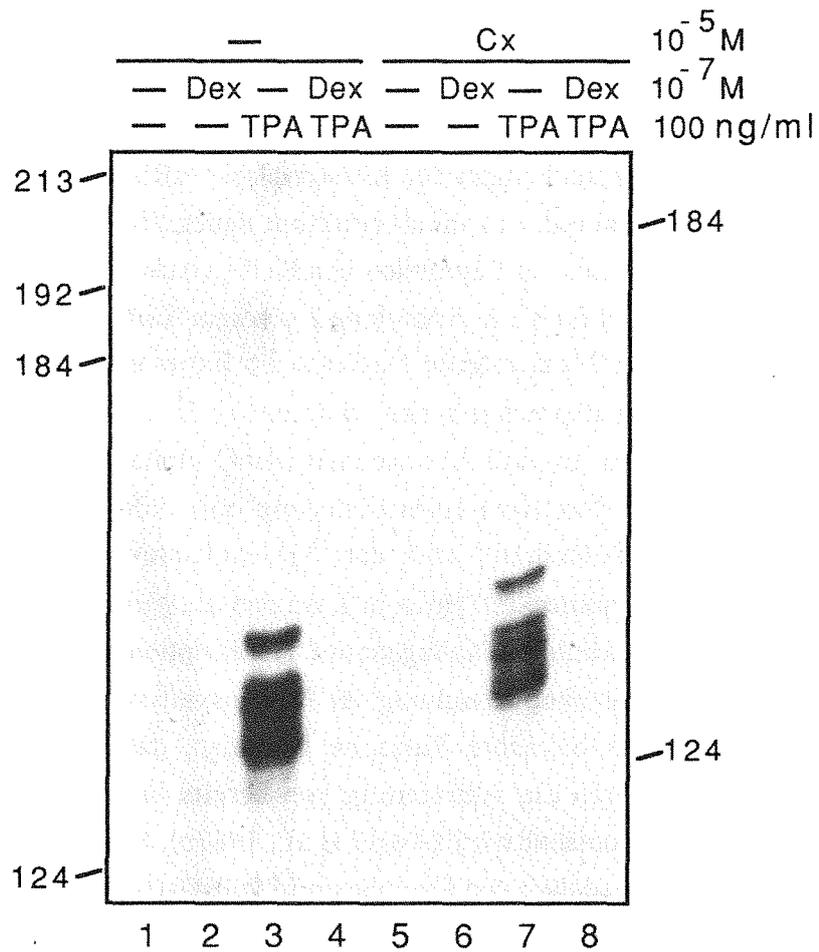


Abbildung 7: Die Repression der TPA-induzierten Kollagenase-I mRNA-Akkumulation durch Dexamethason erfolgt auch ohne die Neu-Synthese von Protein.

Das Autoradiogramm zeigt die S₁-Analyse von je 5 µg polyA⁺-RNA aus HeLa-tk⁻-Zellen, die für 6 Stunden mit Dexamethason (Dex), Phorbol ester (TPA) oder beiden Agenzien zusammen in Abwesenheit (Spuren 1-4) oder Anwesenheit (Spuren 5-8) des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid (Cx) behandelt wurden. Die S₁-Analyse erfolgte wie in Abbildung 3 beschrieben. Cx wurde 30 Minuten vor TPA bzw. Dex zugegeben.

VI) Die Repression der Kollagenase-I Transkription erfolgt unabhängig von Protein Neu-Synthese.

Die Inhibition der Kollagenase-I Transkription könnte durch ein TRE-spezifisches Repressor-Protein verursacht sein, dessen Synthese durch die Hormonbehandlung der Zellen induziert wird. Untersuchungen der Kollagenase-I mRNA-Akkumulation unter dem Einfluß von Cycloheximid, das die Produktion neuer Proteine blockiert, lassen diesen möglichen Mechanismus der Repression von Kollagenase-I sehr unwahrscheinlich erscheinen: Die RNA sowohl für die in Abbildung 2 gezeigte Northern-Hybridisierung als auch für das in Abbildung 7 dargestellte Nuclease-S₁ Experiment wurde jeweils aus Zellen präpariert, die - entsprechend der Indizierung in den Abbildungen - mit Dexamethason bzw. TPA in An- und Abwesenheit von Cycloheximid behandelt waren. Beide Experimente, die Northern-Hybridisierung mit RNA aus menschlichen Hautfibroblasten (NFB-München) und der S₁-Nucleaseverdau mit RNA aus menschlichen Cervix-Karzinomzellen (HeLa-tk⁻), zeigten das gleiche Resultat: unter dem Einfluß von Cycloheximid wurde die Kollagenase-I Transkription induziert, wenn auch in einem schwächeren Maß als ohne Hemmung der Proteinsynthese (Angel et al., 1987a). Dadurch wird die bereits bekannte Tatsache bestätigt, daß ein großer Teil der Phorbolster-Induktion durch die Aktivierung von bereits in der Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren verursacht wird (Angel et al., 1987b). Dexamethason inhibierte die Induktion auch in Anwesenheit von Cycloheximid vollständig. Die negative Wirkung des Hormons auf die RNA-Produktion des Kollagenase-I Gens scheint also ohne die Synthese eines neuen Proteins, das als "second messenger" dienen würde, möglich zu sein.

Die Induktion eines TRE-spezifischen Repressor-Proteins durch Dexamethason, das an Stelle von AP-1 an das TRE bindet, konnte auch durch ein *in vitro* Protein-Bindungsexperiment ("gel retardation-" oder "band-shift-assay") nicht gefunden werden. Für dieses Experiment wird radioaktiv endmarkiertes Oligonukleotid mit zellulären Proteinextrakten inkubiert. Bei der anschließenden, nativen Gel-Elektrophorese wird die durch Protein komplexierte Fraktion der markierten Probe durch Verlangsamung der Wanderung im Gel von freiem, ungebundenem Oligonukleotid abgetrennt. Durch unterschiedlich starke Beeinflussung der Laufeigenschaft der markierten Probe im Gel können verschiedene, das Oligonukleotid bindende Proteine, voneinander unterschieden

werden. Das in Abbildung 8 dargestellte Ergebnis eines solchen Experiments zeigt die Bindung von Proteinen aus HeLa-tk⁻-Zellen an ein Oligonukleotid der Kollagenase-I TRE-Sequenz. Es ist zu erkennen, daß in den Zellen, die mit Dexamethason behandelt waren, die gleichen TRE-bindenden Proteine produziert wurden wie in jenen, die nur mit TPA inkubiert wurden oder unbehandelt waren. Die in allen Spuren des Gels auftretende Hauptbande wurde durch die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 verursacht (vergleiche Abschnitt VIII; markiert in Abbildung 8 durch den Pfeil). Das darunter befindliche, ebenfalls in allen Spuren vorhandene Signal wird durch die nicht weiter charakterisierte, unspezifische Bindung von Protein verursacht. Unter Bedingungen, die die Produktion von Protein zulassen, wird unter dem Einfluß von TPA mehr AP-1 synthetisiert als in unbehandelten Zellen (Abbildung 8, linker Teil; Angel et al., 1987b). Die schwache Erhöhung der AP-1 Konzentration in den Zellen nach Phorbol ester-Behandlung auch unter dem Einfluß von Cycloheximid läßt vermuten, daß die Hemmung der Proteinsynthese durch das Agens nicht vollständig erfolgt (Abbildung 8, rechter Teil), wengleich die vermehrte Bindung von AP-1 auch auf die post-translatorische Modifizierung bereits vorhandenen Faktors zurückzuführen sein könnte (Angel et al., 1987b). Dexamethason scheint jedoch weder bei gehemmter noch bei ungehemmter Proteinsynthese die Bindung eines anderen Faktors als AP-1 an das TRE zu bewirken.

Unter der Voraussetzung, daß ein neues TRE-bindendes Protein nicht in nur so geringer Menge nach Hormon-Induktion produziert wird, daß der gebildete Protein-DNA Komplex selbst unter Bedingungen ungehemmter Proteinsynthese unterhalb der Detektiongrenze des Experiments bleibt, wird durch dieses Resultat die Unabhängigkeit der Kollagenase-I Repression durch Glucocorticoide von Protein-Neusynthese bestätigt. Daß die Repression der Kollagenase-I Transkription durch entsprechend wenige, Hormon-induzierte Repressor-Moleküle verursacht wird, erscheint sehr unwahrscheinlich, da auch die Expression transfizierter chimärer Genkonstrukte durch Dexamethason gehemmt wird. In diesem Fall müßte eine sehr viel höhere und dementsprechend nachweisbare Konzentration von Hormon-induzierten Repressor-Molekülen in der Zelle vorhanden sein, um die gegenüber dem endogenen Gen durch die transfizierte DNA wesentlich gesteigerte Anzahl von TRE-Elementen blockieren zu können.

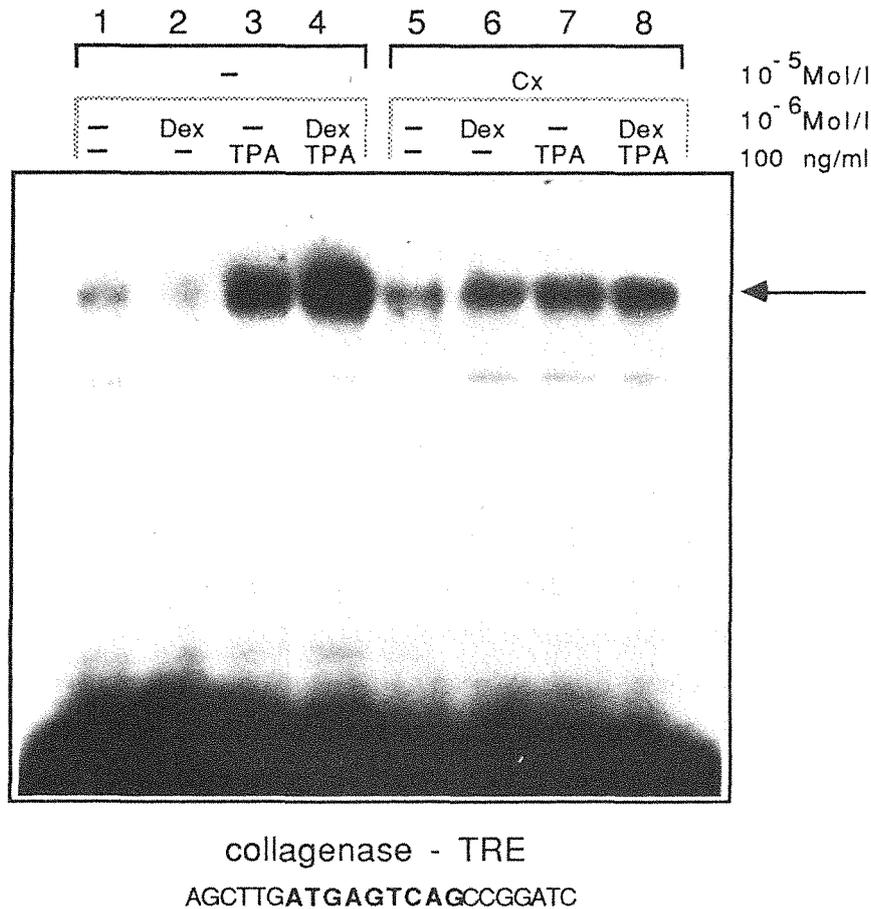


Abbildung 8: Dexamethason induziert die Bindung von AP-1 an das Kollagenase-I TRE auch in Anwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid.

Das Protein-Bindungs-Experiment (Band-Shift-Assay) wurde nach dem im Methodenteil angegebenen Protokoll durchgeführt. 10 µg Gesamtzellextrakt aus HeLa-tk⁻-Zellen, die wie angegeben mit Dexamethason (Dex) und TPA in Abwesenheit (Spuren 1-4) oder Anwesenheit (Spuren 5-8) des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid (Cx) für 2 Stunden behandelt waren, wurden mit je 2 fMol des radioaktiv endmarkierten Oligonukleotids der dargestellten Sequenz inkubiert. Cx wurde 30 Minuten vor Dex bzw. TPA zu den Zellen gegeben. Durch den Pfeil ist das AP-1/TRE-Komplex spezifische Signal gekennzeichnet.

An Stelle der Induktion eines Repressor-Proteins zeigt das Protein-Bindungsexperiment, daß Dexamethason, wie TPA, zu einer Erhöhung der AP-1 Konzentration in der Zelle führt (Abbildung 8, linker Teil). Dieses, in Bezug auf die gegensätzliche Regulation der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide und Phorbolster, widersprüchliche Ergebnis wird in Abschnitt IX diskutiert.

VII) Die Rolle des Glucocorticoidrezeptors in der negativen Regulation des Kollagenase-I Gens durch Dexamethason.

Für die Inhibition der Kollagenase-I Transkription durch Dexamethason ist der Glucocorticoidrezeptor erforderlich. Dieses Ergebnis konnte durch Transfektionsexperimente mit verschiedenen Genkonstrukten in Rezeptor-defizienten CV-1-Zellen (Griguere et al., 1986) erhalten werden. In dieser Zelllinie wird ein MMTV-CAT Konstrukt nur dann durch Dexamethason induziert, wenn neben dem Reporterplasmid auch ein den Glucocorticoidrezeptor exprimierendes Genkonstrukt in die Zelle eingeschleust wurde (Abbildung 9; Tabelle 3, Zeilen 1 und 9). Die allein transfizierten Kollagenase-I Promoter- und 5xTRE-CAT-Konstrukte werden in CV-1-Zellen in etwa dem gleichen Maß wie in HeLa- tk^- -Zellen durch Phorbolster induziert, wobei die Induktion durch TPA unabhängig von gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Dexamethason erfolgt (Abbildung 9; Tabelle 3, Zeile 9; Ko-Transfektion mit Vektor pRSh-R⁻). Die Repression dieser Konstrukte durch das Hormon wird aber durch die Ko-Transfektion eines Expressionsplasmids für den Glucocorticoidrezeptor möglich (Abbildung 9; Tabelle 3, Zeile 1; Ko-Transfektion mit dem Wildtyp-Rezeptor Plasmid phGR- α). Die Repression der Kollagenase-I Expression durch Dexamethason wird also durch den Glucocorticoidrezeptor vermittelt.

Die Repression der Kollagenase-I Transkription könnte durch die Erhöhung der Rezeptorkonzentration in den Zellen verursacht sein. Es wurde daher die Expression des Rezeptorgens in TPA- und Dexamethason-behandelten Zellen untersucht. Die Northern-Hybridisierung von RNA aus CV-1-Zellen, die mit einem Rezeptor-Expressionsplasmid transfiziert waren, zeigte, daß bei gleichzeitiger Regulation des endogenen Kollagenase-I Gens die Zellen unabhängig von der Behandlung mit Dexamethason bzw. TPA gleiche Mengen an Rezeptor-mRNA enthielten (Abbildung 10, rechter Teil). Die Repression der endogenen Kollagenase-I in Rezeptor-transfizierten CV-1-Zellen war auch bereits durch ein Nuclease-S₁ Experiment gezeigt worden (Abbildung 3). In nicht transfizierten CV-1-

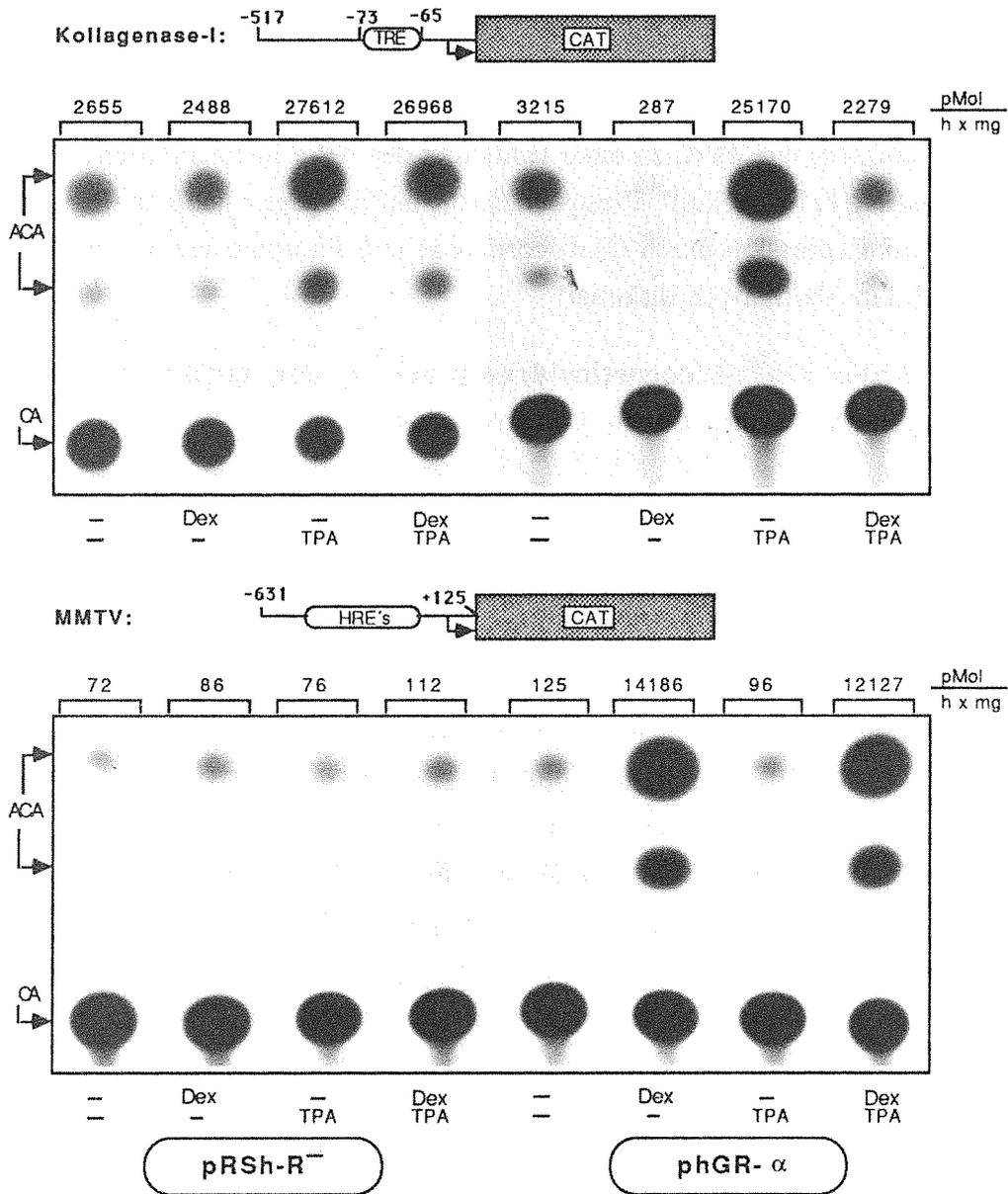


Abbildung 9: Der Glucocorticoidrezeptor ist für die Repression des Kollagenase-I Promoters durch Dexamethason erforderlich.

5x10⁵ CV-1-Zellen wurden mit je 8 µg des Promoter-CAT-Konstrukts und 2 µg des Glucocorticoidrezeptor-cDNA Plasmids phGR-α (rechter Teil der Abbildung) bzw. 2 µg des Vektors pRSh-R⁻ (linker Teil) transfiziert. Als Promoter-CAT-Konstrukte wurden Kollagenase-I -517/+63 (oben in der Abbildung) oder MMTV-CAT (unten) eingesetzt. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie in Abbildung 5 beschrieben.

Zellen dagegen war kein Hormonrezeptor-spezifisches Transkript nachweisbar, und dementsprechend war die endogene Kollagenase-I mRNA nur durch TPA induziert und nicht durch Dexamethason reprimiert (Abbildung 10, linker Teil oben). Durch das Experiment ist neben der grundsätzlichen Erfordernis des Glucocorticoidrezeptors erneut die Spezifität der Repression für den Kollagenase-I Promoter gezeigt; die Rezeptor-Transkription im transfizierten Expressionplasmid wird durch den nicht regulierten RSV-Promoter gesteuert (vergleiche Tabelle 1, Zeile 7). In HeLa-tk⁻-Zellen war eine Beeinflussung der (endogenen) Rezeptormenge auch auf Protein-Ebene nicht zu beobachten. Nach 2-stündiger Behandlung der Zellen mit Dexamethason war die Menge des immunopräzipitierbaren Rezeptorproteins im Extrakt nicht geringer als im Extrakt unbehandelter Zellen, und auch die TPA-Behandlung hatte keinen merklichen Einfluß auf die Menge des präzipitierbaren Rezeptorproteins (Abbildung 19 B; Abschnitt XII). Im Unterschied dazu wird die Expression des endogenen Glucocorticoidrezeptors in NIH3T3-Zellen reguliert: Dexamethason bewirkt nach 3-stündiger Behandlung der Zellen eine Reduktion des Rezeptor-mRNA Niveaus auf etwa 25 %, und nach 8-stündiger Behandlung mit dem Hormon ist auch die Konzentration des Rezeptor-Proteins um die Hälfte reduziert (Hoeck et al., 1989). Die Erhöhung der Glucocorticoidrezeptormenge als Ursache für die Repression der Kollagenase-I Transkription durch Dexamethason kann demnach ausgeschlossen werden, zumal eine Verringerung der Rezeptormenge durch das Hormon wie in NIH3T3-Zellen wegen der generellen Erfordernis des Rezeptors für die Repression eher gegen einen solchen Mechanismus spricht. Die Verringerung des zellulären Rezeptor-Levels bei längerer Inkubation mit Dexamethason könnte eher die Ursache für die unterschiedlich starke Repression der endogenen Kollagenase-I Expression in verschiedenen Zelllinien (siehe vorn, NFB-München/HeLa-tk⁻) oder die geringere Repression transient exprimierter Genkonstrukte (Inkubationszeit mit Hormon 40 Stunden) gegenüber dem endogenen Gen in HeLa-tk⁻-Zellen sein (RNA-Bestimmung nach 6-stündiger Hormonbehandlung).

Der 777 Aminosäuren umfassende menschliche Glucocorticoidrezeptor ist ein Ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der die Expression spezifischer Gene nach Aktivierung durch Glucocorticoide reguliert. Durch die Klonierung der cDNA (Hollenberg et al., 1985), Sequenzanalysen und umfangreiche Gen-Transfer-Experimente konnte die molekulare Struktur dieses Proteins ermittelt werden (Griguere et al., 1986; Carlstedt-Duke et al., 1987; Hollenberg et al., 1987; Rusconi und Yamamoto, 1987; Hollenberg

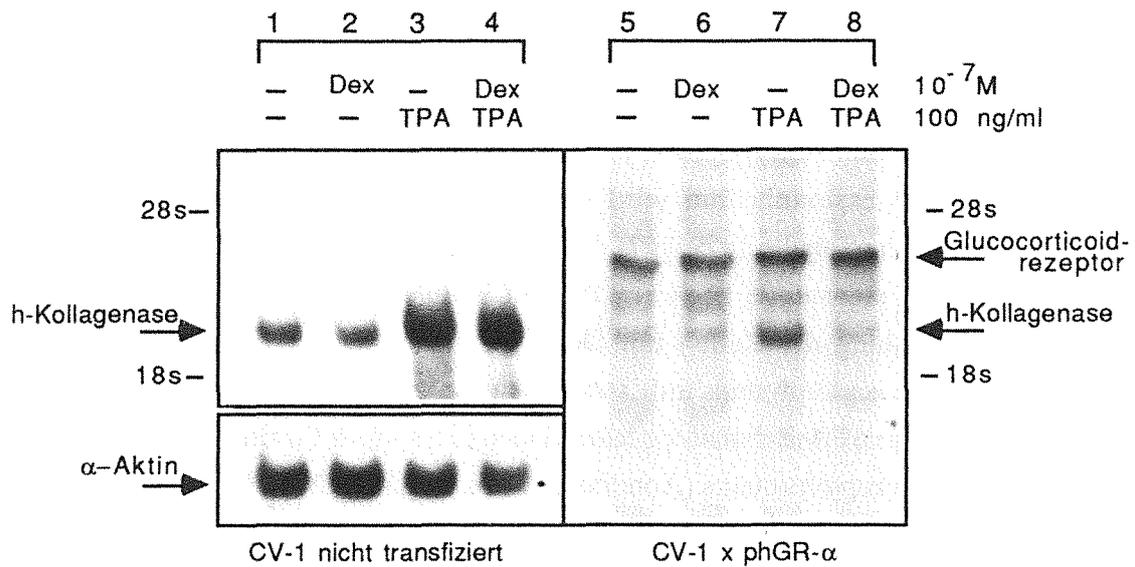


Abbildung 10: Bestimmung der Glucocorticoidrezeptor mRNA Konzentration in transfizierten CV-1-Zellen.

Je 5 µg polyA⁺-RNA aus CV-1-Zellen, die für 8 Stunden mit den angegebenen Mengen Dexamethason (Dex) bzw. TPA behandelt waren, wurden nach Agarose-Gelelektrophorese im Northern-Blot-Verfahren auf ein Nitrocellulose-Filter übertragen. Die Hybridisierung mit ³²P-Nick-translatierten Proben wurde unter Standard-Bedingungen durchgeführt. Der linke, obere Teil der Autoradiographie zeigt den mit der Kollagenase-spezifischen Probe hybridisierten Filter (Spuren 1-4, Probenbeschreibung in Abbildung 2), der linke Teil unten zeigt den Filter eines Parallelansatzes mit Aliquots der RNA, hybridisiert mit Aktin zur Kontrolle gleichmäßigen Probenauftrags. Der rechte Teil der Abbildung zeigt einen Filter nach Hybridisierung mit der Kollagenase-spezifischen Probe und einer Probe für den Glucocorticoidrezeptor (Nick-translatiertes phGR-α). Die RNA für dieses Experiment wurde aus CV-1-Zellen präpariert, die 24 Stunden vor der Dexamethason- bzw. TPA-Behandlung mit phGR-α transfiziert worden waren.

und Evans, 1988). Das Rezeptorprotein läßt sich danach in drei Domänen einteilen: einen carboxyterminalen Bereich, der zur Bindung des Hormons dient, die zentrale DNA-Bindungsdomäne und einen N-terminalen Teil, der für die Effizienz der Transaktivierung durch den Rezeptor-Liganden-Komplex wichtig ist (Gustafsson et al., 1987; Severne et al., 1988; Hollenberg und Evans, 1988). Der Einfluß dieser Domänen auf die transreprimierende Funktion des Rezeptorproteins für den Kollagenase-I Promoter wurde durch Ko-Transfektions-Experimente von 5xTRE-CAT und verschiedenen, mutierten Rezeptor-cDNA-Konstrukten in CV-1-Zellen untersucht. Eine schematische Darstellung der verwendeten Rezeptor-Konstrukte ist in Abbildung 11 wiedergegeben:

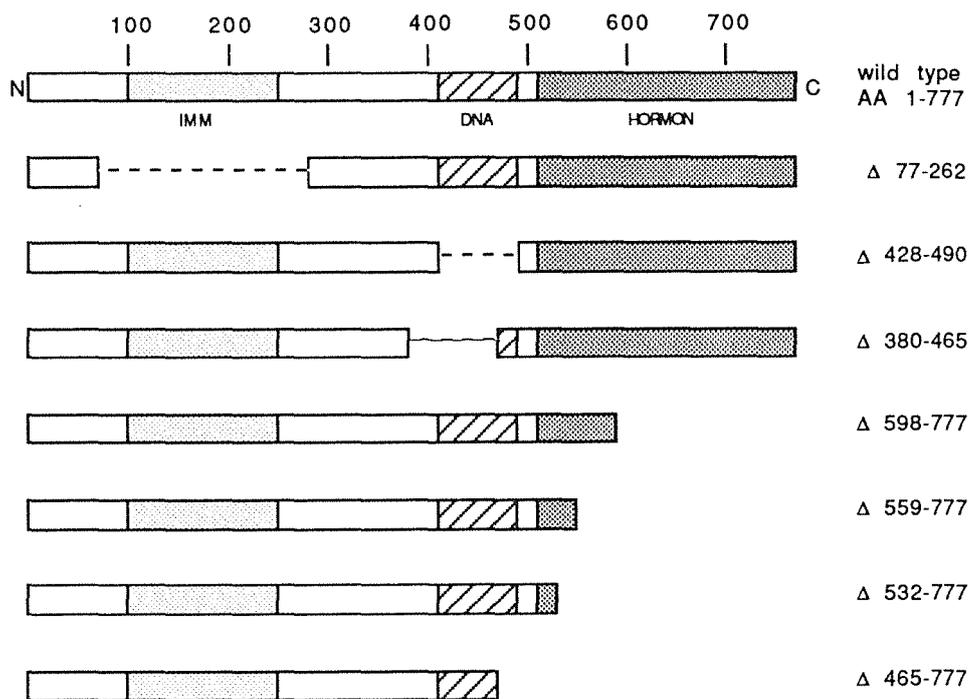


Abbildung 11: Schematische Darstellung der eingesetzten Rezeptor-Mutanten.

Die Darstellung zeigt schematisch die Domänenstruktur des Glucocorticoidrezeptor Proteins sowie die Struktur der durch mutierte cDNA's exprimierten Rezeptor-Proteine. Die mit Δ markierten Zahlen bezeichnen die in den mutierten Proteinen nicht enthaltenen Aminosäuren, betogen auf die Sequenz des Wildtyp-Rezeptorproteins.

Die N-terminalen 403 Aminosäuren des Rezeptorproteins sind weder für die Bindung des Liganden, noch für die Bindung des aktivierten Rezeptors an die DNA oder die induzierte trans-Aktivierung des Zielgens absolut notwendig (Hollenberg et al., 1987). Sie verstärken aber die Effizienz der trans-Aktivierung, wie durch die verringerte Induktion des MMTV-Promoters durch die aktivierte Rezeptormutante $\Delta 77-262$ gezeigt ist (vergleiche CAT-Expression des MMTV-Promoters in Tabelle 3, Zeilen 1 und 2). Das Rezeptorprotein $\Delta 77-262$ vermittelt ebenfalls die Repression der basalen und TPA-induzierten CAT-Expression des 5xTRE-Konstrukts. Wie die Effizienz der Aktivierung ist auch die Effizienz der Repression reduziert (Tabelle 3, Zeilen 1 und 2).

Die Aminosäuren der Positionen 401 bis 491 sind für die Bindung des aktivierten Rezeptorproteins an das cis-wirkende Element der DNA (GRE) und auch für die Vermittlung des trans-aktivierenden Potentials des Rezeptors auf den Promoter essentiell. Durch den Einsatz von Deletionsmutanten der Rezeptor-cDNA im Transfektionsexperiment lassen sich diese beiden Eigenschaften dieser Domäne nicht strukturell unterscheiden (Hollenberg et al., 1987). Mit Deletionsmutanten dieser Region (Deletionen der Aminosäuren 428-490 bzw. 380-465) konnte die Expression des ko-transfizierten MMTV-Konstruktes dementsprechend nicht Hormon-induziert werden, die mutierten Rezeptorproteine vermittelten aber die Repression der 5xTRE-CAT Expression. Die Effizienz der Repression für die im DNA-Bindungsbereich mutierten Rezeptorproteine scheint aber deutlich vermindert zu sein (Tabelle 3, Zeilen 1, 3 und 4). Die generelle Möglichkeit dieser Rezeptorproteine zur trans-Repression der 5xTRE-CAT Expression deutet darauf hin, daß der Rezeptor zur Hemmung der Transkription nicht an die Promoter-DNA direkt binden muß. Darüber hinaus scheint die Effizienz der Repression der nicht DNA-bindenden Rezeptorproteine von der Effizienz der jeweiligen Transfektion abhängig zu sein; je höher die Menge der in den Zellen produzierten CAT-Aktivität war, desto stärker wirkte sich auch die Repression durch Dexamethason-Behandlung aus. Dieses Resultat ist am Beispiel des mutierten Rezeptorproteins $\Delta 428-490$ durch den Vergleich der Einzelerperimente, die als Mittelwert in Tabelle 3 zusammengefaßt sind, dargestellt (Tabelle 3A). Es kann vorausgesetzt werden, daß die Expression beider Plasmide (Rezeptor-cDNA und CAT-Reportergen) aufgrund der gleichzeitig erfolgenden Transfektion in gleicher Weise von der Transfektionseffizienz abhängt, d.h. daß bei geringer Aufnahme des Reportergens auch nur eine geringe Menge an Rezeptor-cDNA in der Zelle exprimiert und so nur eine kleine Menge an Rezeptor-

Rezeptor- mutanten	5xTRE-CAT					MMTV-CAT				
	-DEX	-TPA +DEX	Relative Aktivität	-DEX	+TPA +DEX	Relative Aktivität	-DEX	-TPA +DEX	Relative Aktivität	Rezeptor- mutanten
Wildtyp	2755 ±238	505 ±72	0.18 ±0.01	24837 ±837	4555 ±151	0.18 ±0.01	125 ±36	14168 ±4465	113.30 ±9.50	Wildtyp
Δ 77-262	2189 ±351	1167 ±143	0.54 ±0.06	28213 ±508	11643 ±839	0.41 ±0.03	67 ±17	1983 ±89	30.75 ±9.12	Δ 77-262
Δ 428-490	2385 ±652	1497 ±231	0.65 ±0.13	24079 ±4869	14441 ±709	0.62 ±0.12	123 ±21	186 ±58	1.55 ±0.56	Δ 428-490
Δ 380-465	1681 ±166	1216 ±218	0.72 ±0.06	8779 ±967	6213 ±1072	0.71 ±0.04	10 ±1	8 ±3	0.83 ±0.40	Δ 380-465
Δ 598-777	2152 ±943	2010 ±866	0.94 ±0.01	27000 ±7098	24647 ±7169	0.91 ±0.03	62 ±23	62 ±9	1.04 ±0.24	Δ 598-777
Δ 559-777	1751 ±936	891 ±307	0.56 ±0.15	22254 ±10837	12878 ±4434	0.61 ±0.09	8622 ±3554	9539 ±3843	1.12 ±0.10	Δ 559-777
Δ 532-777	1503 ±674	1360 ±649	0.89 ±0.14	18592 ±8214	16357 ±8156	0.86 ±0.08	1674 ±491	1703 ±429	1.03 ±0.08	Δ 532-777
Δ 465-777	1852 ±86	1789 ±152	0.97 ±0.13	17763 ±849	15912 ±593	0.90 ±0.01				
Vektor	2416 ±347	2098 ±218	0.88 ±0.14	26931 ±809	27612 ±743	1.03 ±0.05	117 ±24	118 ±47	0.99 ±0.20	Vektor

Tabelle 3: Zur Repression der spontanen und TPA-induzierten TRE-abhängigen CAT-Expression durch Dexamethason in transient transfizierten CV-1-Zellen ist ein koexprimierter Glucocorticoidrezeptor erforderlich.

5×10^5 CV-1-Zellen wurden mit jeweils 2 μg der angezeigten Rezeptor-Plasmide und 8 μg 5xTRE-CAT bzw. MMTV-CAT transfiziert und für 40 Stunden unbehandelt, mit Dexamethason (Dex, 1×10^{-6} M), TPA (100 ng/ml) oder Dex und TPA zusammen inkubiert. Transfektion, Ernte und Bestimmung der Enzymaktivität wurden den Protokollen des Methodenteils entsprechend durchgeführt. (Wildtyp entspricht phGR- α ; Vektor entspricht pRSh-R).

$\Delta 428-490 + 5xTRECAT$					
-TPA		Relative Aktivität	+TPA		Relative Aktivität
-Dex	+Dex		-Dex	+Dex	
3176	1471	0.46	30628	14301	0.46
2618	1597	0.61	27132	13466	0.49
2495	1597	0.64	23212	14191	0.71
2247	1708	0.76	21079	14970	0.71
1389	1112	0.80	18344	15277	0.83
2385 ± 652	1497 ± 231	0.65 ± 0.13	24079 ± 4869	14441 ± 709	0.62 ± 0.15

Tabelle 3a: Der Einfluß der Transfektionseffizienz auf die Reprimierbarkeit des 5xTRE-Konstrukts durch Dexamethason bei ko-transfizierter Rezeptor cDNA.

Die fünf Ergebnisse der für den Mittelwert der Einzelbestimmungen mit dem nicht DNA-bindenden Rezeptor-Konstrukt $\Delta 428-490$ herangezogenen Experimente sind aufgeführt. Jede Zeile entspricht einem unabhängigen Experiment.

protein produziert wird. Eine mögliche Verminderung der Stabilität des Rezeptorproteins oder die generell geminderte Expression der cDNA aufgrund der eingeführten Mutation könnte in diesem Fall dazu führen, daß nicht genügend Rezeptor in der Zelle zur trans-Repression des Reportergens zur Verfügung steht. Expression und Stabilität der deletierten Rezeptorproteine wurden jedoch nicht untersucht.

Die Hormon-bindende Domäne zwischen Aminosäure-Position 532 und dem C-Terminus blockiert die Funktion des Rezeptors, solange der Ligand nicht an das Protein bindet. Im nicht aktivierten Zustand befindet sich der Glucocorticoidrezeptor im Zytoplasma der Zelle. Hier bildet er einen Komplex mit mehreren Faktoren, im wesentlichen dem 90 kD großen "Hitze-Schock"-Protein (HSP 90; Litwack, 1988). Durch die Bindung des HSP 90 wird das Rezeptorprotein in eine Konformation gebracht, in der N- und C-Terminus das komplexierte HSP 90 einschließen, wobei das Rezeptorprotein vermutlich in der zentralen DNA-Bindungsdomäne "gebogen" wird (schematische Darstellung in Abbildung 14; Gustafsson et al., 1987; Litwack, 1988). Nach dem Eindringen des

Hormons in die Zelle bindet dieses an den Carboxy-Terminus des Rezeptors, wodurch das HSP 90 freigesetzt und der Rezeptor in eine neue Konformation gebracht wird, die die Bindung des Rezeptorproteins an seine DNA-Erkennungssequenz (GRE) zuläßt (Gustafsson et al., 1987). Die Bindung des Hormons bewirkt außerdem die schnelle Verlagerung des Rezeptorproteins in den Zellkern (Hoeck et al., 1989), wo er seine trans-regulatorische Funktion auf die DNA-Expression ausübt. An der Transkriptions-aktivierenden Funktion des Rezeptors ist die Hormon-bindende Domäne selbst nicht beteiligt (Hollenberg et al., 1987). Das um 179 Aminosäuren C-terminal verkürzte Rezeptorprotein ist zwar nicht in der Lage, die Expression von MMTV-CAT zu induzieren; die Aktivität des MMTV-Promoters ist sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Hormons sehr gering (Rezeptorprotein $\Delta 598-777$; Tabelle 3, Zeile 5). C-terminal verkürzte Rezeptorproteine, die noch über mehr als 559 Aminosäurereste verfügen, scheinen aber generell in einer vollkommen inaktiven Konformation in der Zelle vorzuliegen (S. Hollenberg, pers. Mitteilung). Bei weiterer C-terminaler Verkürzung des Rezeptors bis zu den Aminosäure-Positionen 559 bzw. 532 sind die resultierenden Proteine in der Lage, die MMTV-CAT Expression konstitutiv zu induzieren (unabhängig von Hormon). Diese mutierten Rezeptorproteine nehmen also von vornherein eine Konformation an, die die Verlagerung in den Zellkern und die Bindung an DNA ermöglicht. In Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Daten (Hollenberg et al., 1987) wurde für die größere Deletionsmutante des Rezeptors eine hohe (Tabelle 3, Zeile 6), für das kleinere Protein eine geringe konstitutive Aktivierung der MMTV-CAT Expression gefunden (Tabelle 3, Zeile 7).

Die trans-aktivierende Funktion der C-terminal deletierten Rezeptormutanten spiegelt sich nur zum Teil in ihrer Fähigkeit zur trans-Repression der Expression des 5xTRE-CAT wider. Die Expression des ko-transfizierten Reportergens wird durch das Rezeptorprotein $\Delta 598-777$ erwartungsgemäß nicht beeinflusst (siehe vorn; Tabelle 3, Zeile 5). Aufgrund der mangelnden Reproduzierbarkeit der einzelnen Experimente kann nicht entschieden werden, ob die beiden Rezeptor-Deletionsmutanten $\Delta 532-777$ bzw. $\Delta 559-777$ eine konstitutive Repression der 5xTRE-CAT Expression bewirken (Tabelle 3, Zeilen 6 und 7). Das Rezeptorprotein $\Delta 559-777$ zeigt aber, zumindest in Experimenten mit hoher Transfektions-Effizienz (siehe oben), eine Hormon-abhängige Repression. Die Expression des 5xTRE-CAT Konstrukts wird in unbehandelten und nur TPA-behandelten Zellen kaum reprimiert (Tabelle 3, Zeile 6 und 9), Dexamethason-Behandlung dagegen bewirkt eine deutliche Verminderung der CAT-Synthese (Zeile 6). Dieses Ergebnis deutet

darauf hin, daß das deletierte Rezeptorprotein $\Delta 559-777$ noch über eine "Rest-Affinität" für das Hormon verfügt, obwohl für ein mutiertes Ratten-Rezeptorprotein ähnlicher Größe *in vitro* keine Bindung des Steroidhormons mehr festgestellt werden konnte (Rusconi und Yamamoto, 1987). Eine schwache Wechselwirkung mit dem Hormon könnte zur Verstärkung der trans-reprimierenden Funktion des Moleküls ausreichen, z.B. in dem das Rezeptorprotein zur Änderung der Konformation veranlaßt wird. Die Wechselwirkung mit dem Hormon ist aber möglicherweise für den *in vitro* Bindungstest mit radioaktiv markiertem Dexamethason nicht stabil genug. Eine Verstärkung der trans-aktivierenden Funktion des Rezeptorproteins $\Delta 559-777$ durch das Hormon wurde für die Induktion des MMTV-Promoters nicht gefunden (Tabelle 3, Zeile 6); möglicherweise wirkt sich eine Hormonbindung dieser Rezeptormutante im Vergleich zur Hormon-unabhängigen Induktion der MMTV-Expression durch spontane Bindung des Rezeptors an das GRE nur so geringfügig auf die trans-Aktivierung aus, daß der Effekt im Experiment nicht erkannt wird. Der Einfluß des Hormons auf die Effizienz der trans-Regulation des mutierten Rezeptorproteins $\Delta 559-777$ könnte aber auch spezifisch für seine reprimierende Funktion sein. Die Rezeptormutante $\Delta 465-777$, bei der sowohl der gesamte C-Terminus als auch ein Teil der DNA-Bindungsdomäne deletiert sind, vermittelt eine schwache, Hormon-unabhängige Repression der CAT-Expression des 5xTRE-Konstrukts (Tabelle 3, Zeile 8). Die Wirkung dieses Rezeptorproteins auf den MMTV-Promoter wurde nicht getestet.

Die beschriebenen Experimente mit den deletierten Rezeptorproteinen erlauben keine eindeutige Zuordnung bestimmter Segmente der Primärstruktur zur trans-reprimierenden Funktion des Glucocorticoidrezeptors. Möglicherweise sind mehrere Abschnitte der Aminosäuresequenz an der Repression beteiligt, da die Inhibition der 5xTRE-CAT Expression bei allen getesteten Rezeptormutanten mehr oder weniger stark beeinträchtigt war. Die Experimente ermöglichen aber die Unterscheidung der trans-reprimierenden von der trans-aktivierenden Funktion des Rezeptorproteins. Für die Aktivierung des MMTV-Promoters ist in jedem Fall die Bindung des Rezeptors an die DNA erforderlich, wogegen für die Repression des TRE-Promoters die DNA-Bindungsdomäne des Rezeptors nicht benötigt wird. Dieses Ergebnis bestätigt auch das Resultat, daß die Repression der Kollagenase-I Expression über das AP-1 bindende TRE des Promoters vermittelt wird, das keine Sequenzhomologie zu Rezeptor-bindenden DNA Elementen (GRE's) anderer Gene aufweist (Abbildung 12).

	GGT ACA nnn TGT TCT	GRE Consensus-Sequenz
-85	ATG TTA TAA AGC <u>ATG AGT CAG</u> ACA CCT CTG GCT TTC TGG	Kollagenase-I
-85	GAA GGC CTT GGG <u>GTG ACATCAT</u> GGG CTA TTT TTA GGG GTT	cJun
-117	TTG GAG CCG CAA <u>GTG ACT CAG</u> CGC GGG GCG TGT GCA GGC	hMT-IIA (a)
-102	AGC TTC GCG GGG <u>CGT GTG CAG</u> GCA GCG CCC GGC CGG GGC	hMT-IIA (b)
	GTG CCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> ACA CCT CTG GCT TTC TGG	Koll -73/+63
	GTG CCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> CCG GAT CCG GCC CCG CCC	1xTRE-tk
	GTG CCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> CCG GAT CCG GCT GAC TCA	5xTRE-tk (a)
	TCA TCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> CCG GAT CCG GCT GAC TCA	5xTRE-tk (b)
	GTG CCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> CCG GAT CTC TCT GAG CAA	1xTRE-Tata
	GTG CCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> CCG GAT CCG GCT GAC TCA	5xTRE-Tata (a)
	TCA TCA AGC TTG <u>ATG AGT CAG</u> CCG GAT CCG GCT GAC TCA	5xTRE-Tata (b)

Abbildung 12: Die flankierenden Sequenzen des Kollagenase-I TRE in Dexamethason-reprimierten Promoter-CAT-Konstrukten.

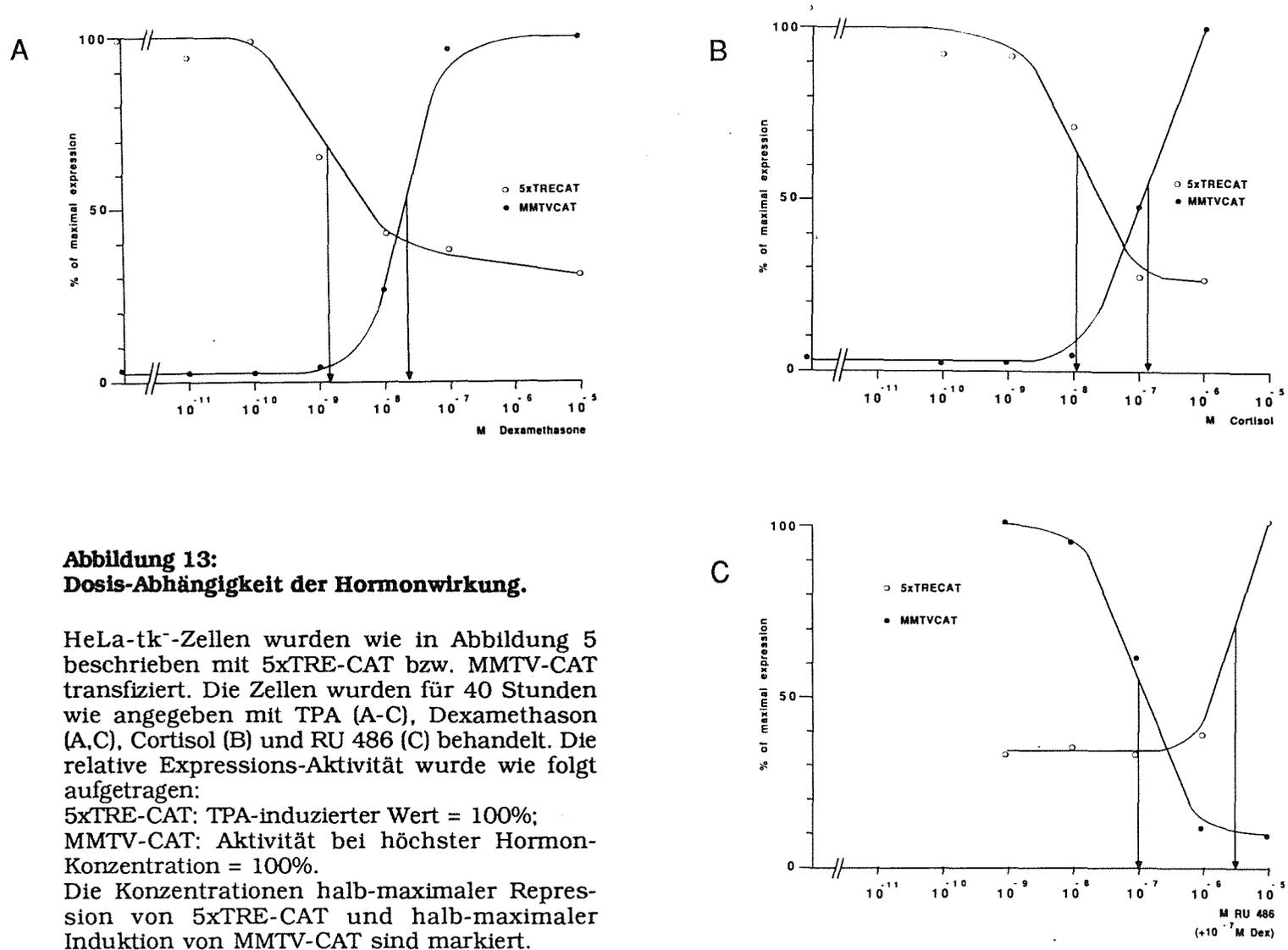
Die Position der angezeigten Sequenz im betreffenden Gen ist für die Konstrukte mit eigenem Promoter mit Ausnahme des Kollagenase-I Konstruktes -73/+63, das Kollagenase-fremde Sequenzen 5'-wärts von der AP-1 Bindestelle enthält, angegeben. Bei den übrigen Konstrukten war die AP-1 Bindestelle als Oligonukleotid mit HindIII- und BamHI-Enden in die Polylinker-Region der entsprechenden Vektoren inseriert worden. Die AP-1 Bindestelle ist unterstrichen; eine nicht funktionelle, TRE-ähnliche Sequenz im Metallothionein-IIA Promoter ist durch Strichelung hervorgehoben. Es ist keine Übereinstimmung der TRE-Promotersequenzen mit der angegebenen GRE-Consensus-Sequenz zu erkennen.

VIII) Zur Repression der Kollagenase-I Expression wird weniger aktivierter Glucocorticoidrezeptor benötigt als zur Induktion Hormon-induzierter Gene.

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, wird der zytoplasmatische, durch HSP 90 blockierte Glucocorticoidrezeptor durch Bindung des Steroidhormons an seinen Carboxy-Terminus aktiviert. Die Bindung des Liganden an das Protein erfolgt mit einer Dissoziationskonstante K_D von etwa 2×10^{-9} M, wie durch Experimente mit zytoplasmatischen Zellextrakten und affinitätschromatographisch gereinigtem Rezeptorprotein gezeigt wurde (Brandon et al., 1989). Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit der Genaktivierung durch Glucocorticoide in verschiedenen Zelllinien ergaben, daß eine halb-maximale Induktion der untersuchten Genexpression bei etwa 10^{-8} M Dexamethason gegeben ist (Wigler et al., 1975; Ringold et al., 1975; Young et al., 1975; Strähle et al., 1987; Cato et al., 1988; Wu und Pfahl, 1988; Simons et al., 1989). Die höhere Hormon-Konzentration, die zur Induktion von Genen erforderlich ist, weist auf weitere Prozesse hin, die neben der Aktivierung des Rezeptors für seine Bindung an cis-wirkende Elemente der DNA erforderlich sind. Ein solcher Prozeß könnte z.B. die Dimerisierung von Rezeptorproteinen sein (Chalepakos et al., 1988; siehe unten).

Der Vergleich der Dosisabhängigkeit der trans-Repression des TRE- mit der trans-Aktivierung des MMTV-Promoters ergab im Transfektionsexperiment in HeLa- tk^- -Zellen einen Unterschied in der erforderlichen Hormon-Konzentration. (Diese Zelllinie verfügt über einen endogenen Glucocorticoidrezeptor, es wurden also nur die entsprechenden Promoter-CAT Konstrukte transfiziert.) Die halb-maximale Repression der Expression des 5xTRE-CAT Konstrukts wurde bei einer Dexamethason-Konzentration von 2×10^{-9} M beobachtet, die Induktion der MMTV-CAT Expression erforderte die etwa 10-fach höhere Konzentration des Hormons: die halb-maximale Aktivierung des MMTV-Promoters erfolgte bei einer Dexamethason-Konzentration von 3×10^{-8} M (Abbildung 13 A).

Der Unterschied der zur trans-Repression des TRE- bzw. trans-Aktivierung des MMTV-Promoters notwendigen Hormon-Konzentrationen deutet auf einen wesentlichen Unterschied im molekularen Mechanismus hin, durch den der Glucocorticoidrezeptor die Aktivität des jeweiligen Promoters reguliert. Für die Aktivierung eines Gens durch Glucocorticoidhormone wurde die Notwendigkeit der Dimerisierung des aktivierten



Rezeptors erwogen (Chalepakis et al., 1988; siehe oben), analog zur Dimerisierung des Östrogenrezeptors bei der Regulation Östrogen-regulierter Gene (Kumar und Chambon, 1988) und der Dimerisierung des Progesteronrezeptors (Tsai et al., 1988, 1989). Die Dimerisierung des Glucocorticoidrezeptors ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zu bakteriellen regulatorischen Proteinen (Takeda et al., 1983; Pabo und Sauer, 1984) und der palindromischen Struktur der GRE's wahrscheinlich (Chalepakis et al., 1988), konnte aber bisher nur *in vitro* durch die Komplexbildung gereinigten Rezeptor-Proteins mit GRE-haltigen DNA Fragmenten gezeigt werden (Wrange et al., 1989). Da die trans-reprimierende Funktion des Rezeptors seine Bindung an DNA nicht zu erfordern scheint (siehe Abschnitt VII), erfolgt die Repression des TRE-Promoters möglicherweise ohne eine Dimerisierung des Proteins bei entsprechend niedrigerer Hormon-Konzentration.

Die Expression des Kollagenase-I Gens wird nicht nur durch das synthetische Steroidhormon Dexamethason inhibiert. Das hauptsächlich im menschlichen Organismus vorkommende Glucocorticoidhormon Cortisol (Soffer et al., 1961) bewirkt ebenfalls die Repression, gezeigt durch die Verminderung der CAT-Synthese eines 5xTRE-Konstruktes in HeLa-tk⁻-Zellen (Abbildung 13 B). Wegen der geringeren Effizienz des physiologischen Hormons (Baxter und Forsham, 1972) ist zur Erzielung der regulatorischen Wirkung gegenüber dem synthetischen Steroid Dexamethason eine etwa 10-fach höhere Konzentration erforderlich; der Unterschied in der erforderlichen Hormonkonzentration zwischen Repression und Aktivierung zeigt sich aber auch bei Verwendung von Cortisol (vergleiche 5xTRE- und MMTV-CAT in Abbildung 13 B).

IX) Das Antiglucocorticoid RU 486 blockiert die trans-reprimierende Funktion des Steroidrezeptors.

Der synthetische Glucocorticoid-Antagonist RU 486 (17 β -hydroxy-11 β -(4-dimethylaminophenyl)-17 α -(1-propynyl)-Östra-4,9-dien-3-on) behindert die trans-aktivierende Eigenschaft des Hormonrezeptors. Trotz der scheinbaren Aktivierung des Rezeptors durch Bindung an die Hormon-Bindungsdomäne (schematische Darstellung in Abbildung 14) ist der RU 486/Rezeptor-Komplex in den meisten der untersuchten Zellarten nicht in der Lage, die Expression Hormon-induzierbarer Gene zu steigern (Henderson, 1986; Simons et al., 1989). So wird auch die Dexamethason-Induktion des MMTV-CAT Konstrukts in HeLa-tk⁻-Zellen durch RU 486 vermindert (Abbildung 13 C), wobei das Hormon und der Antagonist um die Bindung an den Rezeptor kompetieren.

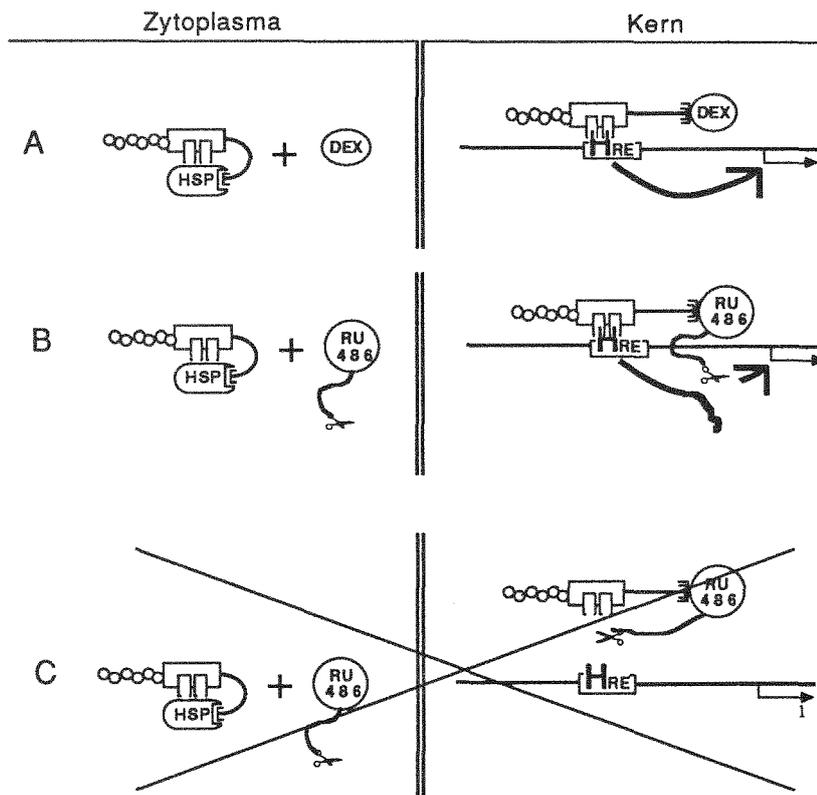


Abbildung 14: Der Rezeptor/Anti-Glucocorticoid RU 486-Komplex bindet an das GRE.

A
 Der Glucocorticoidrezeptor bildet im Zytoplasma der Zelle einen Komplex mit dem Hitze-Schock Protein HSP 90 (HSP). Bei Eindringen eines Hormons in die Zelle wird HSP aus dem Komplex verdrängt. Das Hormon bindet an den Carboxy-Terminus, die Konformation des Rezeptorproteins ändert sich und der Komplex wird in den Kern der Zelle verlagert. Hier kann der "aktivierte" Rezeptor nun an spezifische Erkennungssequenzen der DNA (HRE; auf Hormon reagierender Enhancer) binden und die Transkription des Gens regulieren.

B
 Die Bindung des Anti-Glucocorticoids an den Rezeptor im Zytoplasma bewirkt ebenfalls die Verlagerung des Komplexes in den Kern. Der Rezeptor kann jedoch nicht mehr Transkriptions-steigernd wirken. Wird ein durch Bindung einer spontan aktivierenden, in die Zelle eingeschleusten Rezeptormutante konstitutiv induziertes Gen durch RU 486-Behandlung de-aktiviert, bindet vermutlich der RU 486/Rezeptor-Komplex an Stelle der spontan aktivierenden Mutante an das HRE.

C
 Bleibt die Transkriptionsaktivität des konstitutiv induzierten HRE-Promoters hoch, bindet der RU 486/Rezeptor-Komplex wahrscheinlich nicht an die DNA. RU 486 würde demnach die trans-Aktivierung durch den Hormonrezeptor in anderer Weise stören. Im Experiment wurde gezeigt, daß RU 486 die Bindung des Rezeptors an DNA nicht verhindert.

Dexamethason und RU 486 binden an den Carboxy-Terminus des Rezeptorproteins mit etwa gleicher Affinität (Lazar und Agarwal, 1986; Agarwal et al., 1987). Bei einer Dexamethason-Konzentration von 10^{-7} M wird die halb-maximale Verminderung der induzierten CAT-Synthese des MMTV-Konstrukts durch RU 486 bei etwa gleicher Konzentration, 10^{-7} M, erreicht (Abbildung 13 C). RU 486 blockiert ebenfalls die Fähigkeit des Rezeptors, die Expression des 5xTRE-CAT Konstrukts zu reprimieren. Die halb-maximale Aufhebung der Repression durch 10^{-7} M Dexamethason findet aber erst bei einer RU 486-Konzentration von etwa 2×10^{-6} M statt (Abbildung 13 C), d.h. bei etwa 20-fachem Überschuß des Antagonisten. Der Anteil des Hormon-gebundenen, "aktiven" Rezeptors wird im Fall der halb-maximalen Repressions-Aufhebung also auf ca. 5 % reduziert, wogegen zur halb-maximalen Inhibition der Induktion dieser Anteil auf nur 50 % reduziert werden muß. Dieses Resultat bestätigt genau die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts, wonach die Repression des TRE-Promoters bei etwa 10-fach niedrigerer Rezeptorkonzentration erfolgt als die Induktion des MMTV-Promoters.

Über die Wirkungsweise des Glucocorticoid-Antagonisten RU 486 ist bis jetzt nicht viel bekannt. Die Bindung des RU 486/Rezeptor-Komplexes an GRE's der DNA scheint zwar möglich zu sein, wurde aber nur unter extrem unphysiologischen Bedingungen *in vitro* nachgewiesen (Willmann und Beato, 1986). Ein Transfektionsexperiment in CV-1-Zellen macht die Bindung des RU 486/Rezeptor-Komplexes an DNA dennoch wahrscheinlich: in die Zellen wurden neben dem MMTV-CAT Konstrukt der Wildtyp-Rezeptor (pGR- α) und die Rezeptor-Deletionsmutante $\Delta 559-777$ eingeschleust. Der deletierte Rezeptor führte zu einer Hormon-unabhängigen Induktion des Reportergens (siehe Abschnitt VII; Tabelle 3, Zeile 6). Die Behandlung der Zellen mit Dexamethason bewirkt die Aktivierung des Wildtyp-Rezeptors, der den deletierten exogenen Rezeptor vermutlich von der DNA verdrängte, um selbst an das GRE zu binden und die CAT-Expression weiter zu steigern (Abbildung 15, rechts; vergleiche Tabelle 3, Zeilen 1 und 6). RU 486-Behandlung dagegen blockierte die induzierte MMTV-Cat Expression. Eine direkte Wirkung des Antagonisten auf das mutierte Rezeptorprotein $\Delta 559-777$, wie sie für Dexamethason in Bezug auf die Repression von 5xTRE-CAT in CV-1-Zellen gefunden wurde (Abschnitt VII), ist in diesem Experiment nicht zu erkennen; auch das Hormon bewirkte keine Änderung in der spontanen Aktivierung von MMTV-CAT durch $\Delta 559-777$ (Abbildung 15, links; Ko-Transfektion von $\Delta 559-777$ mit dem Vektor pRSh-R⁻). Wenngleich die Inhibition der spontanen MMTV-Promoter Aktivität auch auf anderen Mechanismen

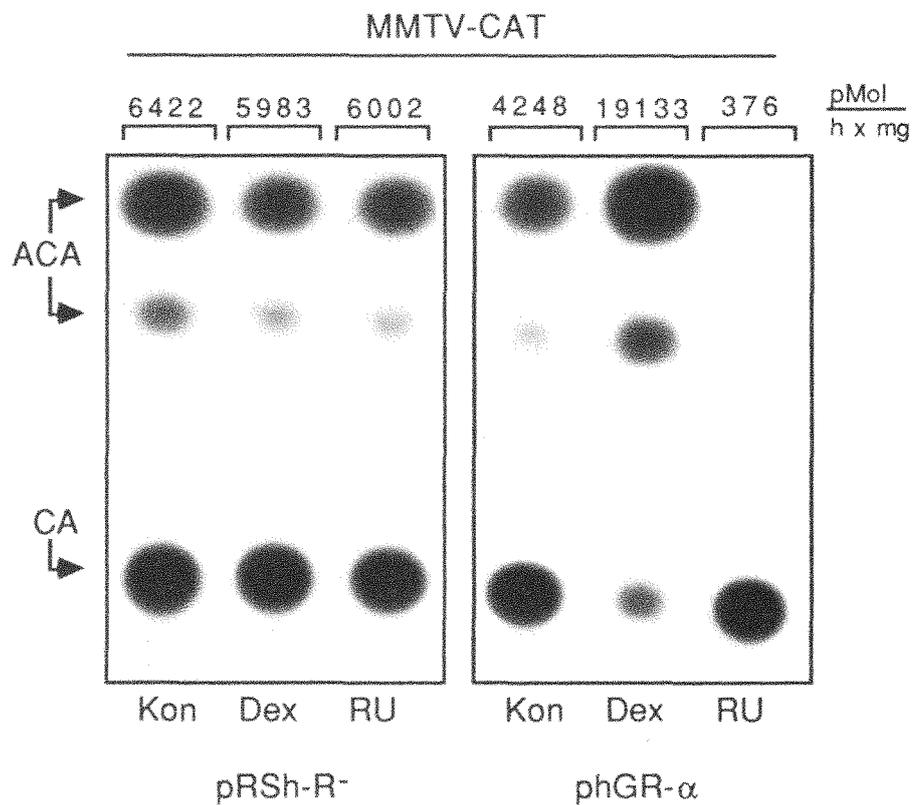


Abbildung 15: Konkurrenz zwischen Wildtyp-Rezeptor und konstitutiv aktivierender Mutante bei Hormon- und Antihormon-Behandlung.

5×10^5 CV-1-Zellen wurden mit je $4 \mu\text{g}$ MMTV-CAT, $1 \mu\text{g}$ $\Delta 559-777$ und $5 \mu\text{g}$ phGR- α bzw. $5 \mu\text{g}$ pRSh-R⁻ transfiziert. 8 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 40 Stunden mit Dexamethason (Dex) bzw. RU 486 (RU) behandelt und anschließend die CAT-Aktivität bestimmt. Die Hormon- bzw. Antihormon-Konzentration war jeweils 1×10^{-6} M.

beruhen könnte, z.B. der Interferenz mit der Dimerisierung der Rezeptorproteine, ist die Verdrängung des deletierten Rezeptorproteins von der DNA durch den inaktiven RU 486-Komplex auch hier die mögliche Ursache. Für den Komplex aus RU 486 und dem Progesteronrezeptor, für den das Agenz ebenfalls als Antagonist zum Hormon wirkt, wurde die DNA-Bindung bereits beschrieben (Bailly et al., 1986). Bei einer unveränderten Bindung des Glucocorticoidrezeptors an das GRE sollte das Protein dann aber nach Bindung von RU 486 in einer anderen Weise gegenüber dem Hormon-aktivierten Zustand verändert sein, die sowohl die trans-aktivierende als auch die trans-reprimierende Funktion des Rezeptors blockieren kann. Bis jetzt ist ein solcher Unterschied nur für den Liganden-abhängigen Phosphorylierungszustand des Rezeptorproteins bekannt (Hoeck et al., 1989).

Unabhängig davon, daß die beschriebenen Experimente mit dem Glucocorticoid-Antagonisten RU 486 keine neuen Erkenntnisse über dessen molekularen Wirkungsmechanismus erlauben, konnten drei wichtige Ergebnisse erhalten werden:

Die generelle Erfordernis des Glucocorticoidrezeptors für die Repression des TRE-Promoters wurde bestätigt.

Es wurde gezeigt, daß der Rezeptor zur Repression des TRE-Promoters durch das Hormon aktiviert werden muß.

Der Unterschied der zur Repression bzw. Aktivierung der Genexpression erforderlichen Hormon-Konzentration, der einen unterschiedlichen Mechanismus von Inhibition bzw. Stimulierung der Aktivität des jeweiligen Zielgens vermuten läßt, wurde bestätigt.

X) Die Blockierung der trans-aktivierenden TRE-Funktion durch Glucocorticoide erfolgt unabhängig von weiteren Promoter-Elementen.

Die Repression des Kollagenase-I Promoters durch Glucocorticoide könnte durch die Störung der aktivierenden Interaktion des TRE-bindenden Transkriptionsfaktors AP-1 mit anderen Promoter-bindenden Faktoren erfolgen. Die Spezifität der Repression für den Kollagenase-I Promoter würde demnach möglicherweise darauf beruhen, daß nur bestimmte Kombinationen von AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren durch den Hormonrezeptor negativ beeinflußt werden. Aus den bisher beschriebenen Experimenten mit dem 5xTRE-CAT Konstrukt geht bereits hervor, daß ein solcher Einfluß auf die Repression des TRE-Promoters nur die Interaktion von AP-1 mit dem TATA-Box-bindenden Faktor betreffen kann, da der verwendete Promoter über keine weiteren

Erkennungssequenzen für andere Transkriptionsfaktoren verfügt. Die Tatsache, daß Transkriptionsfaktoren mit TATA-Box bindenden Proteinen in Abhängigkeit der Sequenz der TATA-Box unterschiedlich stark interagieren können, wurde durch Experimente zur Induktion des "Hitze-Schock-Proteins 70" (HSP 70) durch das Adenovirus-E1_A Protein gezeigt (Simon et al., 1988; Homa et al., 1988). Das E1_A-Protein scheint nicht direkt an DNA zu binden (Ferguson et al., 1985; Lillie und Green, 1989). Es ist deshalb besonders interessant, weil es - wie der aktivierte Glucocorticoidrezeptor - die aktivierende Funktion des TPA-induzierbaren Enhancers (TRE) der Kollagenase-I hemmt (Offringa et al., 1988).

Es wurde deshalb untersucht, ob die Blockierung der TRE-Funktion durch den Glucocorticoidrezeptor durch die Kombination des Enhancers mit unterschiedlichen TATA-Box Sequenzmotiven beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden verschiedene TRE-CAT Konstrukte, bei denen die Enhancer-Sequenz als einfache Oligonukleotid-Insertion im Minimalvektor des Typs pL-T (siehe Abschnitt IV) mit unterschiedlich mutierten TATA-Box Sequenzen kombiniert war, in HeLa-tk⁻-Zellen im transienten Expressionsexperiment getestet. Zu den untersuchten TATA-Box Motiven zählten auch die mit E1_A preferentiell interagierende Sequenz (Simon et al., 1988) und das TATA-Box Motiv des frühen t-Antigens von SV40, dessen Expression trotz seiner AP-1-bindenden Enhancerelemente nicht durch Glucocorticoide blockiert war (siehe Abschnitt V; Tabelle 1, Zeile 6). Die Dexamethason-Behandlung der Zellen führte bei allen transfizierten TATA-Box Konstrukten zu einer Verminderung der Promoteraktivität. Sowohl die basale Expression als auch die TPA-induzierte CAT-Synthese, die ebenfalls durch die Sequenz der TATA-Box nicht beeinflusst war, wurden für jede TRE/TATA-Box Kombination in etwa gleicher Weise durch das Glucocorticoidhormon gehemmt (Tabelle 4). Eine Kombination aus dem SRE ("dyad symmetry element" des c-fos Gens, siehe Abschnitt V) und einer der reprimierbaren TATA-Boxen war dagegen zwar durch TPA leicht induziert, nicht aber durch Dexamethason gehemmt (Tabelle 4, Zeile 6; vergleiche Tabelle 2, Zeile 3). Die Expression des Kontrollplasmids, bei dem das TATA-Motiv zu einer wahrscheinlich nicht Protein-bindenden Sequenz (GAGAAAA) mutiert worden war, blieb unterhalb der Nachweisgrenze (Tabelle 4). Es ist nicht bekannt, ob die verschiedenen TATA-Sequenzen verschiedene TATA-Faktoren binden oder ein TATA-Faktor in unterschiedlicher Weise an die DNA bindet und so in unterschiedlicher Weise mit Enhancer-bindenden Faktoren interagieren kann. Davon unabhängig zeigen die Experimente, daß die trans-aktivierende Funktion des TRE nicht nur im Zusammenspiel

mit bestimmten TATA-Box Sequenzen durch den Glucocorticoidrezeptor blockiert wird. Darüber hinaus wird deutlich, daß die negative Wirkung des Hormonrezeptors, die zweifellos die Interaktion zwischen dem TRE-bindenden Faktor AP-1 und dem TATA-Box-bindenden Faktor verändert, auf den TRE-bindenden Faktor zielt.

XI) Auch im Dexamethason-reprimierten Zustand des Promoters bindet der Transkriptionsfaktor AP-1 an das Phorbol-ester-induzierbare Enhancerelement TRE.

In Bezug auf den Mechanismus, durch den der Glucocorticoidrezeptor die Promoteraktivierende Wirkung des TRE-bindenden Transkriptionsfaktors hemmen kann, bestehen prinzipiell drei Möglichkeiten:

Die Verhinderung der Bindung von AP-1 an das TRE, z.B. durch Erniedrigung der AP-1 Konzentration in der Zelle.

Die Veränderung der Zusammensetzung des heterodimeren Proteinkomplexes AP-1.

Die Blockierung der trans-aktivierenden Funktion des Transkriptionsfaktors, z.B. durch post-translatorische Modifizierung der Proteine oder direkte Interaktion mit einem Repressor-Faktor.

Bereits in Abschnitt VI war gezeigt worden, daß die Repression des Kollagenase-I Promoters durch Glucocorticoide keine Neu-Synthese von Protein erfordert. Eine Dexamethason-abhängige Verringerung der zellulären AP-1 Konzentration müßte demnach durch die beschleunigte Degradation des Faktors erfolgen. Um die jeweilige Menge an AP-1 zu bestimmen, wurden "Band-Shift"-Experimente mit Proteinextrakten aus unbehandelten, Dexamethason- und TPA-behandelten HeLa-tk⁻-Zellen durchgeführt, die mit einem hohen Überschuß an radioaktiv endmarkiertem Oligonukleotid der TRE-Sequenz inkubiert wurden (Abbildungen 16 und 8; vergleiche auch Abschnitt VI). Die Messungen ergaben, daß die Konzentration des TRE-bindenden Faktors in den Extrakten durch Dexamethason-Behandlung der Zellen überraschend eher erhöht als erniedrigt waren. Die Extrakte unbehandelter Zellen enthielten wenig TRE-bindendes AP-1. Die Hormonbehandlung allein führte zu einem geringen Anstieg, wogegen die starke, Phorbol-ester-induzierte Zunahme der AP-1-Bindung an das TRE durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Dexamethason und TPA deutlich gesteigert war (Abbildung 16).

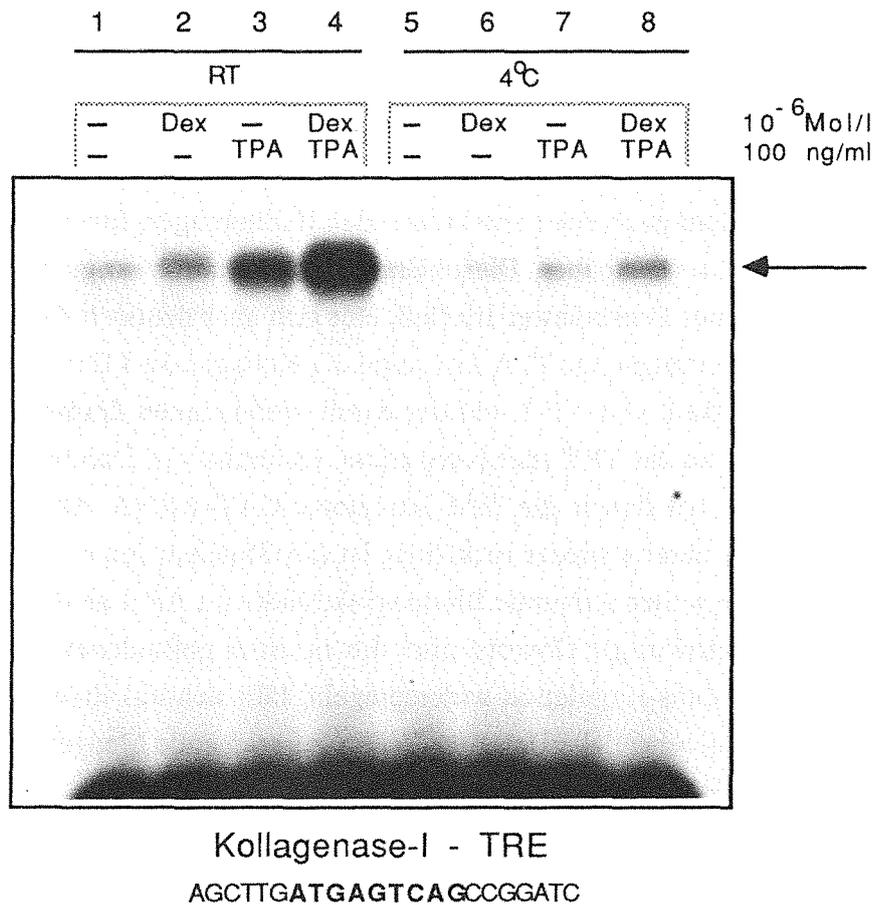


Abbildung 16: Dexamethason induziert die Bindung von AP-1 an das Kollagenase-I TRE.

Das Protein-Bindungs-Experiment (Band-Shift-Assay) wurde nach dem im Methodenteil angegebenen Protokoll durchgeführt. 10 µg Gesamtzellextrakt aus HeLa-tk⁻-Zellen, die wie angegeben mit Dexamethason (Dex) und TPA für 2 Stunden behandelt waren, wurden mit je 2 fMol des radioaktiv endmarkierten Oligonukleotids der dargestellten Sequenz inkubiert. Das Experiment wurde bei Raumtemperatur (Spuren 1-4) und auf Eis (Spuren 5-8) durchgeführt, um möglicherweise temperaturlabile Komplexe nicht zu zerstören.

Durch den Pfeil ist das AP-1/TRE-spezifische Signal gekennzeichnet.

Das *in vitro* Experiment macht sehr wahrscheinlich, daß die Repression der TRE-Funktion durch den Glucocorticoidrezeptor nicht durch eine Verminderung der AP-1-Bindung an dieses Enhancer-Element verursacht wird. Es zeigt allerdings das widersprüchliche Ergebnis, daß die Zellen nicht nur unter Kollagenase-I induzierenden Bedingungen, sondern auch unter reprimierenden Bedingungen eine erhöhte Menge des TRE-bindenden Faktors enthalten. Dieses Ergebnis korreliert zwar gut mit der Erhöhung der Genaktivität unter Phorbolster-Einfluß, läßt sich aber dennoch nicht direkt auf die Situation *in vivo* übertragen; die TPA-Induktion der Kollagenase-I Expression findet auch ohne die Neu-Synthese von AP-1 und der damit verbundenen dramatisch vermehrten Bindung von AP-1 an das TRE statt (vergleiche Abschnitt VI). Darüber hinaus wird bei Inkubationszeiten, bei denen die TPA-induzierte CAT-mRNA Akkumulation eines 5xTRE-Konstrukts bereits wieder rückläufig ist (>3 Stunden; Jonat et al., 1989) in den Zellen *in vitro* eine weiter steigende Bindungsaktivität von AP-1 an das TRE gefunden (B.Stein, pers. Mitteilung). Obwohl also die *in vitro* gefundenen Daten nicht den Mechanismus der trans-Regulation widerspiegeln, läßt sich aus ihnen entnehmen, daß auch Dexamethason-behandelte HeLa-tk⁻-Zellen ausreichende Mengen an Kollagenase-I aktivierendem, TRE-bindenden Faktor enthalten.

Die Steigerung der TRE-bindenden AP-1 Menge in Hormon-behandelten Zellen ließ vermuten, daß die AP-1 Synthese durch Dexamethason induziert wird. Diese Annahme konnte durch Experimente zur Regulation der Gene c-jun und c-fos, deren Produkte den Faktor AP-1 bilden, bestätigt werden. Der c-jun Promoter wird durch Dexamethason aktiviert, was zu einer Erhöhung der zellulären c-jun mRNA-Konzentration führt (Abbildung 17, Spur 2). Das "Northern"-Experiment zeigt außerdem, daß die Menge an spezifischem c-jun Transkript durch Phorbolster-Induktion erhöht ist (Angel et al., 1988b). Bei gleichzeitiger, vollständiger Inhibition der TPA-induzierten Kollagenase-I mRNA-Synthese bleibt die c-jun mRNA-Menge unverändert hoch (Abbildung 17; Spuren 7,8 und 3,4). Es ist bereits bekannt, daß die Aktivität des c-jun Promoters und seine Phorbolster-Induktion durch AP-1 bzw. einen AP-1-verwandten Faktor gesteuert werden (Angel et al., 1988b; Stein et al., 1989b). In Abschnitt XIV wird gezeigt werden, daß dieser Teil der Regulation des c-jun Promoters durch Dexamethason reprimiert wird. Die Akkumulation der c-jun mRNA in Hormon-behandelten HeLa-tk⁻-Zellen ist daher die Summe der positiven und negativen Wirkungen von Dexamethason auf den Promoter. Dies könnte die Ursache dafür sein, daß die Konzentration der c-jun mRNA in Zellen, die

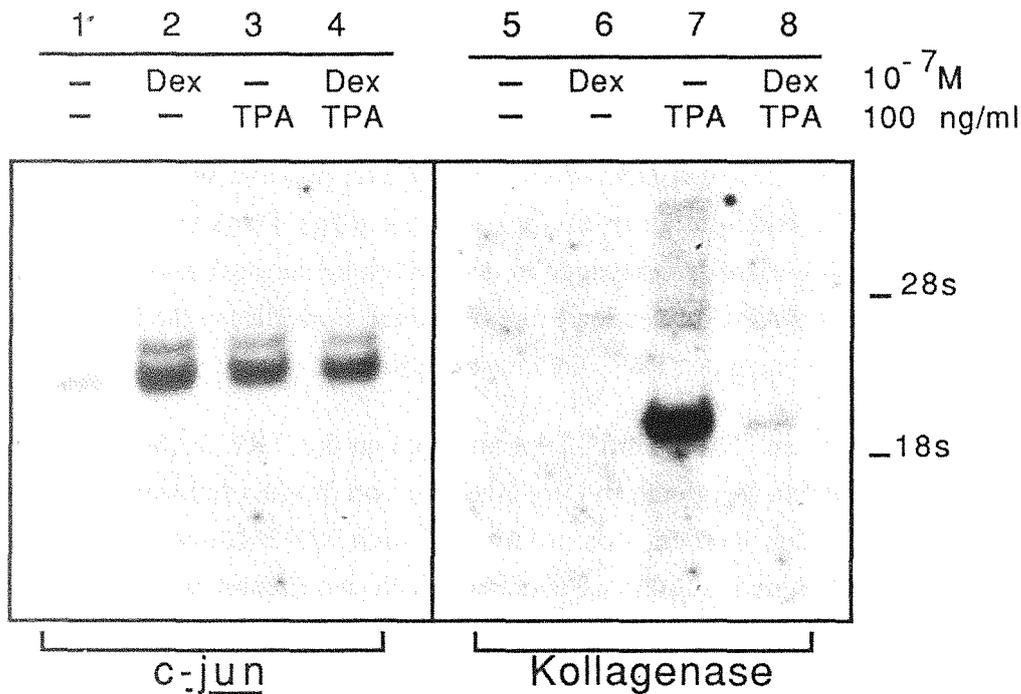


Abbildung 17: Dexamethason aktiviert c-jun und reprimiert die Phorbolster-induzierte Kollagenase-I Expression.

5 μ g polyA⁺-RNA aus HeLa-tk⁻-Zellen, die für 6 Stunden mit den angegebenen Mengen Dexamethason (Dex) bzw. TPA behandelt waren, wurden nach Agarose-Gelelektrophorese im Northern-Blot-Verfahren auf ein Nitrocellulose-Filter übertragen. Die Hybridisierung mit ³²P-Nick-translatierten Proben wurde unter Standard-Bedingungen durchgeführt. Der linke Teil der Autoradiographie zeigt den mit einem 1414 bp langen *SmaI-HindIII* Restriktions-Fragment aus dem c-Jun cDNA-Plasmid pchJ-1 (Angel et al., 1988a) hybridisierten Filter (Spuren 1-4), der rechte Teil der Abbildung zeigt den selben Filter nach de-Hybridisierung und anschließender re-Hybridisierung mit einer Kollagenase-spezifischen Probe (vergleiche Abbildung 2).

mit Hormon und Phorbol ester gleichzeitig behandelt waren, nicht höher ist als in Zellen, die nur mit Dexamethason bzw. TPA allein inkubiert wurden. Die Untersuchungen des Einflusses von Dexamethason auf das Niveau der zellulären *c-fos* mRNA in TPA-behandelten HeLa-*tk*⁻-Zellen ergaben ebenfalls eine eher positive Wirkung der Hormon-Behandlung auf die Akkumulation an spezifischem *c-fos* Transkript. Wenngleich die Messung der jeweiligen mRNA-Mengen in den Zellen keine direkten Rückschlüsse auf die Konzentration der AP-1-bildenden Proteine zuläßt, korrelieren die Ergebnisse doch sehr gut mit den Resultaten der TRE-Bindungsexperimente.

Die Identität des in den "Band-Shift"-Experimenten an das TRE bindenden Faktors als AP-1 konnte durch den Vergleich mit der Bindung von *in vitro* translatierten Proteinen Jun und Fos bestätigt werden. Außerdem ließ sich die Bildung des spezifischen Komplexes aus DNA und zellulären Proteinen durch den Einsatz von Antikörpern, die gegen Jun bzw. Fos gerichtet waren, verhindern (B.Stein, pers. Mitteilung). Das Verhältnis zwischen Jun und Fos im TRE-bindenden Faktor in Proteinextrakten, die aus Phorbol ester- bzw. Phorbol ester/Dexamethason-behandelten HeLa-*tk*⁻-Zellen gewonnen wurden, konnte darüber hinaus sichtbar gemacht werden: nach kovalenter Vernetzung der TRE-bindenden Proteine mit der DNA durch UV-Bestrahlung und anschließende Immun-Präzipitation konnten die Komponenten von AP-1 durch Auftrennung des präzipitierten Materials in denaturierender SDS-Gelelektrophorese voneinander getrennt werden (Abbildung 18, rechts). Bei der Immun-Präzipitation werden, auch bei Verwendung nur eines der spezifischen Antikörper gegen Jun oder Fos, beide Proteine ausgefällt, da beide direkt an die DNA binden und nicht nur untereinander durch Protein-Protein Wechselwirkung vernetzt sind. Beide Proteine sind daher auch in der Autoradiographie des Trenngels sichtbar, da sie jeweils mit der radioaktiv markierten DNA-Probe verbunden sind. Die Mengen an präzipitierten Fos- und Jun-TRE Komplexen korrelieren mit den Ergebnissen, die aus den einfachen Protein-Bindungsexperimenten erhalten wurden (Abbildung 18, linker und rechter Teil). Sie zeigen ebenfalls an, daß in Phorbol ester-behandelten HeLa-*tk*⁻-Zellen die Konzentration an AP-1 durch Hormongabe nicht vermindert wird. Außerdem ergibt das Experiment, daß sich die Zusammensetzung des heterodimeren AP-1 Proteinkomplexes durch die Hormoneinwirkung nicht verändert: die Mengen der immun-präzipitierbaren TRE/Fos- und TRE/Jun-Komplexe sind in gleicher Weise in Extrakten Dexamethason-behandelter Zellen gesteigert (Abbildung 18, rechts). Schließlich zeigt auch das "UV-Crosslink"-Experiment, daß die Verdrängung von

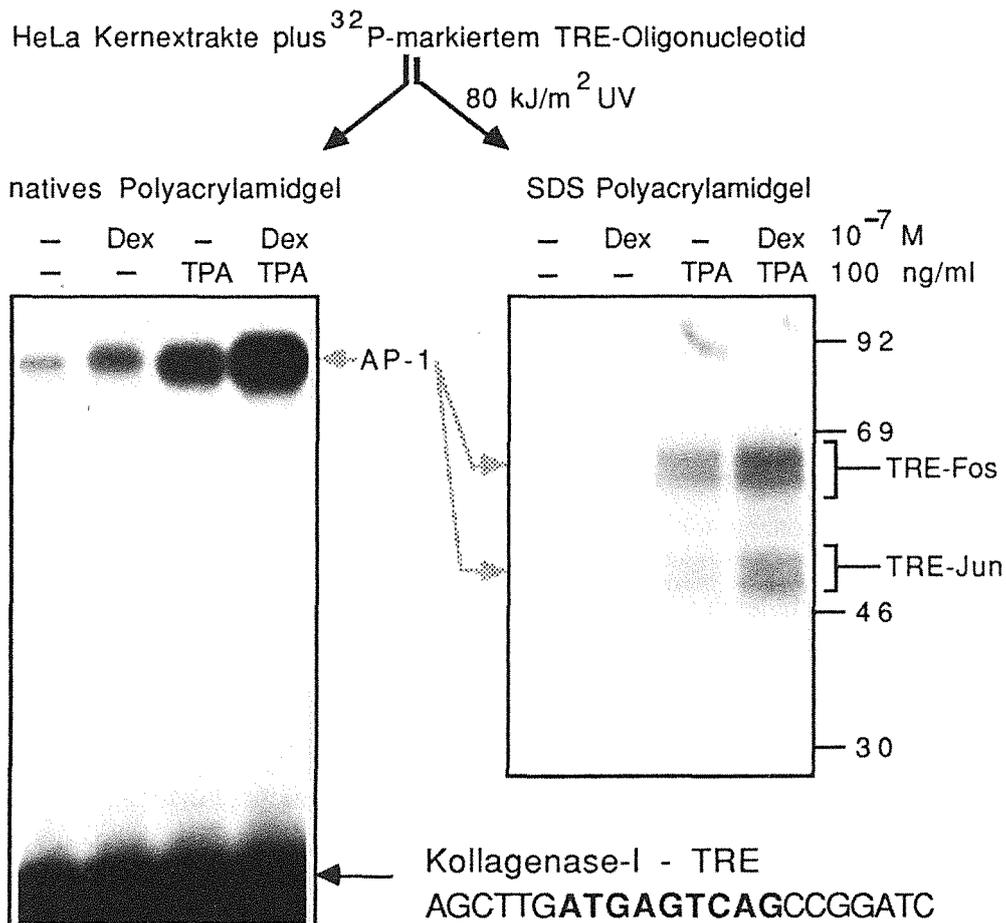


Abbildung 18: Dexamethason hat keinen Einfluß auf die Zusammensetzung von AP-1.

Je 300 µg Kernextrakt aus Dexamethason- (Dex) bzw. TPA-behandelten HeLa-*tk*-Zellen (2-stündige Behandlungsdauer) wurden mit 250 fMol radioaktiv endmarkiertem Oligonucleotid der TRE-Sequenz inkubiert. Eine Hälfte des Ansatzes wurde direkt im Band-Shift-Gel elektrophoretisiert, um die Bindung von AP-1 an das Oligonucleotid zu überprüfen. Bei der anderen Hälfte wurden auf Eis durch UV-Strahlung Protein und DNA vernetzt. Die vernetzten Ansätze wurden mit anti-Fos-Antikörpern immunpräzipitiert und das Präzipitat anschließend unter denaturierenden Bedingungen im 10%igen Acrylamidgel aufgetrennt. Die Autoradiographie zeigt die kovalent mit der DNA verknüpften Proteine (TRE-Fos und TRE-Jun).

AP-1 nach Dexamethason-Behandlung durch einen anderen TRE-bindenden Faktor, z.B. durch den aktivierten Hormonrezeptor, wahrscheinlich nicht stattfindet.

Die Möglichkeit, daß die Sequenz des TRE allein nicht ausreicht, den aktivierten Glucocorticoidrezeptor *in vitro* zu binden, konnte aufgrund von Bindungsexperimenten mit längeren Fragmenten des Kollagenase-I Promoters ausgeschlossen werden: in *in vitro* "Footprint"-Experimenten wurde keine Bindung des affinitätschromatographisch gereinigten Glucocorticoidrezeptors an das Kollagenase-I TRE gefunden, im selben Experiment wurde aber das GRE des Tryptophan-Oxygenase Promoters vor dem Verdau durch DNaseI geschützt (B.Gloss, pers. Mitteilung). Eine mögliche Bindung des aktivierten Hormonrezeptors *in vivo* an das Kollagenase-I TRE unter Einbeziehung TRE-benachbarter Sequenzen wird durch weitere Argumente unwahrscheinlich:

- Die nicht DNA-bindenden Deletionsmutanten des Glucocorticoidrezeptors vermitteln die Repression (Abschnitt VII; Tabelle 3).
- Keines der reprimierten Promoter-CAT Konstrukte enthält eine GRE-ähnliche Sequenz (Abbildung 12). Auch ein "negatives GRE" (Sakai et al., 1988) ist in den in Abbildung 12 angegebenen, reprimierten Promotoren nicht enthalten.
- Die Blockierung der TRE-Funktion erfolgt auch in unterschiedlichem Sequenz-Kontext (Abbildung 12).
- Der durch das Anti-Glucocorticoid RU 486 "aktivierte" Hormonrezeptor kann an DNA binden (vergleiche Abschnitt IX). Wenn die Verdrängung von AP-1 vom TRE die Ursache für die Dexamethason-bedingte Repression des Kollagenase-I Promoters wäre, müßte auch der Rezeptor mit dem RU 486-Liganden zu einer Verminderung der TRE-Promoteraktivität führen. Die Behandlung von Zellen mit dem Glucocorticoid-Antagonisten blockiert aber sowohl die positive als auch die negative Wirkung des Hormonrezeptors auf die Gen-Expression.

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen und ihrer Interpretation ergibt sich, daß die Blockierung der trans-aktivierenden Funktion des TRE- gebundenen Transkriptionsfaktors AP-1 die Ursache für die Repression der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide sein muß. Diese Blockierung kann durch eine post-translatorische Modifizierung der trans-aktivierenden Domäne(n) oder die Bindung eines reprimierenden Faktors an AP-1 bedingt sein. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt werden, daß

tatsächlich eine Wechselwirkung zwischen dem aktivierten Hormonrezeptor und AP-1 möglich ist.

XII) Der aktivierte Glucocorticoidrezeptor kann an den Transkriptionsfaktor AP-1 binden.

Versuche, eine Hormon-bedingte Modifizierung der Proteine Jun oder Fos nachzuweisen, sind bisher erfolglos verlaufen. Die Änderung der Modifikation der Proteine, z.B. ein Wechsel im Phosphorylierungs-, Glykosylierungs- oder Alkylierungszustand, sollte sich aufgrund der Änderung von Struktur und Polarität durch ein geändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese äußern.

Beide Proteine, Jun und Fos, liegen in der Zelle von vornherein in verschiedenen Formen vor. Einige Moleküle können z.B. an das TRE binden, andere werden erst durch Phorbolster-Einwirkung in die DNA-bindende Form überführt (Angel et al., 1987b). Das in zweidimensionaler Gelelektrophorese detektierbare Muster unterschiedlich modifizierter, direkt aus Zellextrakten immunpräzipitierter Jun- und Fos-Proteine unterscheidet sich zwischen Extrakten aus unbehandelten und Dexamethason-behandelten Zellen jedoch nicht (M.Timmers, pers. Mitteilung). Die Subpopulation der Fos- und Jun-Proteine, die als AP-1 Komplex an das Kollagenase-I TRE binden, wurde nach kovalenter Bindung an radioaktiv markierte DNA durch UV-Bestrahlung in eindimensionaler, denaturierender SDS-Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 18, rechter Teil; siehe auch Abschnitt XI). Die Autoradiographie des Gels läßt aufgrund der Unschärfe der Signale vermuten, daß auch im TRE-bindenden AP-1 die Proteine Fos und Jun in unterschiedlich modifizierter Form vorliegen. Auch hier ist aber kein Dexamethason-spezifischer Einfluß auf die Wanderung der TRE/Jun- bzw. TRE/Fos-Komplexe im Gel erkennbar (Abbildung 18).

Obwohl eine geringfügige Veränderung der AP-1-Komponenten möglicherweise durch die durchgeführten Experimente nicht erfaßt wurde, scheint eine Glucocorticoid-spezifische Modifizierung der Jun- bzw. Fos-Proteine nicht die Ursache für die Hormon-Repression der Kollagenase-I Transkription zu sein. Es wurde daher untersucht, ob der aktivierte Hormonrezeptor und der AP-1 Komplex in eine direkte Wechselwirkung treten. In den bisher durchgeführten Bindungsexperimenten zellulärer Proteinextrakte an DNA war zwar keine Vergrößerung des TRE-bindenden Proteinkomplexes durch Bindung eines zusätzlichen Faktors beobachtet worden (vergleiche Abbildungen 8, 16 und 18),

möglicherweise ist aber eine Interaktion zwischen AP-1 und dem Glucocorticoidrezeptor zu instabil für die angewendete Methodik. Um den vermuteten Komplex zu erhalten, wurden daher die Proteinextrakte aus ganzen Zellen oder Zellkernen unter möglichst schonenden Bedingungen, d.h. bei niedrigen Salzkonzentrationen, gewonnen und auf den Gehalt an Rezeptor/AP-1 Komplex durch Immun-Präzipitation bzw. Affinitätschromatographie untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 A-C und 20 wiedergegeben.

Im ersten Experiment wurden die Extrakte wie bei den "Band-Shift"-Untersuchungen mit radioaktiv endmarkiertem Oligonukleotid der TRE-Sequenz inkubiert. Die TRE-bindenden Proteine wurden dann durch UV-Bestrahlung kovalent an die DNA gebunden. Zusätzlich zu dem in Abbildung 18 dargestellten Experiment wurde nun mit einem "chemischen Crosslinker" inkubiert, der aneinander haftende Proteine kovalent vernetzt (DTBP, Ditmethyl-3,3'-dithiobis-Propionimidat; Gillespie und Eisenman, 1989). Eine Hälfte jedes Ansatzes wurde mit polyklonalem Antikörper gegen Fos, die andere Hälfte mit polyklonalen Antikörpern gegen den Rezeptor versetzt. Das Immun-reaktive Material wurde nach Adsorption an Protein-A Sepharose präzipitiert und unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Abtrennung der Komplexe von Protein-A Sepharose und die Aufhebung der Proteinvernetzung durch DTBP erfolgte während der Probenaufbereitung für die Gelelektrophorese. Die Reaktion mit anti-Fos-Antikörpern ergab, schwach erkennbar, ein Muster an AP-1/TRE-Signalen, wie es auch schon im "UV-Crosslink"-Experiment ohne Vernetzung der Proteine erhalten wurde (Abbildung 19 A, links; vergleiche Abbildung 18, rechter Teil). Die gleichen Protein/DNA-Komplexe konnten auch mit dem Antikörper gegen das Rezeptorprotein immunpräzipitiert werden, allerdings nur aus dem Extrakt der Zellen, die mit Phorbol ester und Dexamethason gleichzeitig behandelt waren (Abbildung 19 A, rechts). Wenngleich die in der Autoradiographie des Gels sichtbaren Signale sehr schwach und unscharf sind, läßt schon allein das spezifische Auftreten der radioaktiv-Markierung in Spur 8 annehmen, daß der Rezeptor durch Protein-Protein-Bindung über AP-1 mit dem TRE verbunden ist; in Extrakten aus Zellen, die nur mit TPA behandelt waren, konnte im Immun-Präzipitat mit dem anti-Rezeptor-Antikörper überhaupt keine Radioaktivität nachgewiesen werden, ebenso in Extrakten aus nur Dexamethason-behandelten Zellen. Im letzteren Fall war vermutlich die Menge der gebildeten AP-1/TRE-Komplexe zu gering (vergleiche Abbildung 18). Ein spezifisches Rezeptor-Signal, das bei einem Molekulargewicht von etwa 92 kD zu erwarten wäre (Hoeck et al., 1989), ist trotz der

kovalenten Bindung TRE-assoziiierter Proteine an die DNA nicht erkennbar. Dadurch wird erneut bestätigt, daß der Rezeptor nicht direkt an die markierte DNA bindet. Der Ursprung des in der Autoradiographie sichtbaren (unspezifischen) Signals, oberhalb des TRE/Fos-Komplexes bei etwa 75-80 kD, wurde nicht untersucht.

Im zweiten Experiment wurde die Spezifität des anti-Rezeptor-Antikörpers für den Glucocorticoidrezeptor bestätigt. Es wurde eine direkte Immun-Präzipitation aus Proteinextrakten von Dexamethason- bzw. TPA-behandelten HeLa-tk⁻-Zellen mit dem anti-Rezeptor-Antikörper mit nachfolgender denaturierender SDS-Gelelektrophorese des gefällten Materials und anschließendem "Western-Blotting" der aufgetrennten Proteine durchgeführt. Die Hybridisierung der geblotteten Proteine mit anti-Rezeptor-Antikörper und anschließender Detektierung der gebundenen Antikörper mit radioaktiv markiertem Protein-A (Immun-Färbung) ergab dann nur jeweils ein Signal in der Autoradiographie (Abbildung 19 B). Die Stärke des Signals, das den etwa 92 kD großen Glucocorticoidrezeptor anzeigt, war in allen vier getesteten Extrakten annähernd gleich. Das Experiment zeigt also nicht nur, daß der Antikörper spezifisch mit dem Hormonrezeptor interagiert, sondern auch, daß die Konzentration des Rezeptors in den Zellen durch (2-stündige) Behandlung mit Dexamethason bzw. TPA nicht wesentlich verändert wird (vergleiche Abschnitt VII). In einem Parallelansatz wurden die geblotteten Proteine gleichzeitig mit anti-Rezeptor- und anti-Jun-Antikörpern hybridisiert. Hier zeigte sich, daß neben dem wieder in allen vier Extrakten gleichmäßig vorhandenen Glucocorticoidrezeptor auch die AP-1 Komponente Jun aus Extrakten Hormon-behandelter Zellen mit dem anti-Rezeptor-Antikörper ausgefällt worden war (Abbildung 19 C). Daß das Jun-Protein nur aus Extrakten, die den Hormon-aktivierten Rezeptor enthielten, immun-präzipitiert wurde zeigt, daß es eine spezifische Komplex-Bildung des Rezeptors mit wenigstens einer der AP-1 Komponenten geben muß; die Hybridisierung der geblotteten Proteine mit anti-Fos-Antikörpern wurde bis jetzt nicht durchgeführt. Darüber hinaus wird deutlich, daß auch freies, nicht TRE-bindendes AP-1, zumindest seine Komponente Jun, mit dem aktivierten Glucocorticoidrezeptor einen Komplex bilden kann. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Abschnitt weiter eingegangen.

Der bisher deutlichste Hinweis auf eine spezifische Assoziation zwischen AP-1 und dem aktivierten Glucocorticoidrezeptor wurde durch Affinitätschromatographie der Proteinextrakte mit Sepharose-immobilisiertem TRE-Oligonukleotid erhalten. AP-1 wird

spezifisch an TRE-Sepharose-Säulen gebunden und kann bei hohen Salzkonzentrationen (>300 mM) eluiert werden (Kadonaga und Tjian, 1986). Für das in Abbildung 20 dargestellte Experiment wurden Proteine aus TPA-behandelten HeLa-tk⁻-Zellen, die zusätzlich entweder nicht, mit Dexamethason oder dem Anti-Glucocorticoid RU 486 behandelt waren, im Batch-Verfahren mit Sepharose-immobilisiertem TRE inkubiert. Nach Abtrennung des löslichen Überstandes wurden die gebundenen Proteine aus dem Sediment mit 0.4 molarer Natriumchlorid-Lösung eluiert, nach Konzentrierung durch Acetonfällung im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und im "Western-Blot"-Verfahren auf eine Filtermembran übertragen. Die Filtermembran wurde dann wie im vorigen Experiment mit Antikörpern gegen den Glucocorticoidrezeptor und Jun inkubiert und die gebundenen Antikörper mit radioaktiv markiertem Protein-A nachgewiesen. Die Autoradiographie zeigt, daß aus allen Extrakten AP-1 - oder zumindest die AP-1 Komponente Jun - an das immobilisierte TRE gebunden wurde (Abbildung 20, Spuren 1-3). Aus Proteinextrakten von Zellen, die außer mit TPA auch mit Dexamethason behandelt waren, wurde zusätzlich das Rezeptorprotein an das immobilisierte TRE gebunden (Abbildung 20, Spur 2). Da eine direkte Bindung des aktivierten Rezeptors an die DNA aufgrund der vorhergehenden Experimente ausgeschlossen erscheint, darf die Bindung des Rezeptors an AP-1 als Ursache für die gemeinsame Bindung beider Faktoren an das TRE angenommen werden. Die Spezifität dieser Bindung für den Hormon-aktivierten Rezeptor ist durch den Mangel der Bindung des RU 486/Rezeptor-Komplexes gezeigt. (In RU 486-behandelten Zellen wird, wie in Kontrollzellen, die Expression der Kollagenase-I nicht vermindert; vergleiche Abschnitt IX.) In Proteinextrakten aus Zellen, die mit dem Anti-Glucocorticoid und TPA behandelt waren, konnte nur eine sehr geringe Menge an scheinbar AP-1 bindendem Rezeptor nachgewiesen werden, die die in den Kontrollextrakten (nur TPA-Behandlung der Zellen) nicht überstieg (Abbildung 20, Spur 3). Das Auftreten dieser Signale in der Autoradiographie ist vermutlich auf die unzureichende Abtrennung des Überstandes vom Sediment nach der Inkubation der Extrakte mit dem immobilisierten TRE zurückzuführen; sie repräsentieren aber deutlich geringere Mengen an Rezeptorprotein als das durch den aktivierten Rezeptor verursachte, wesentlich stärkere Signal. Die Ursache der starken Immun-Färbung bei einer Molekülgröße von ca. 65 kD ist wahrscheinlich eine unspezifische Hybridisierung eines der beiden zur Immun-Färbung verwendeten Antikörper, da sie auch in Spur 4 der Autoradiographie auftritt (Abbildung 20). In dieser Spur wurde bei der Gelelektrophorese

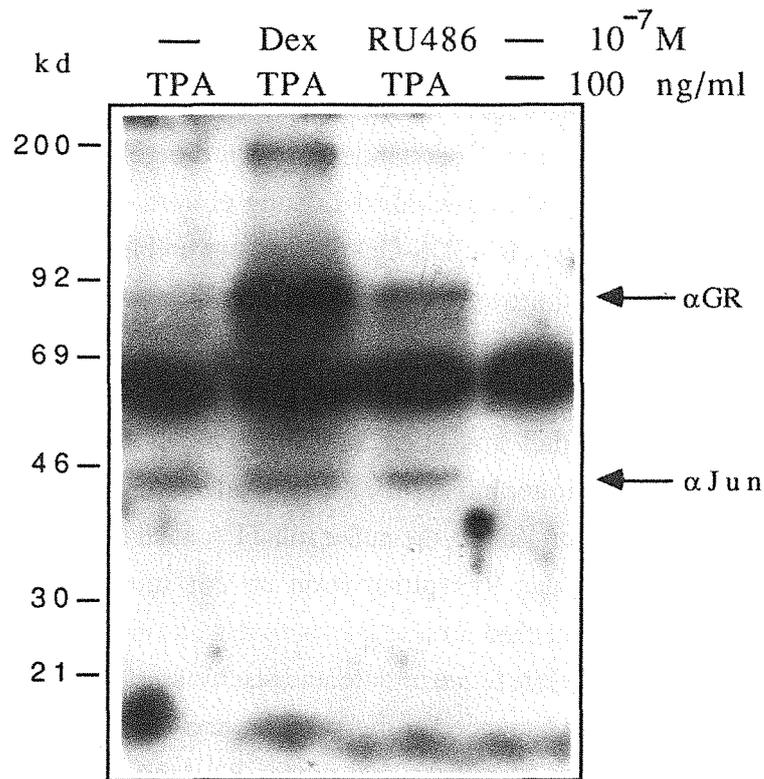


Abbildung 20: Spezifische Ko-Präzipitation von AP-1 und Glucocorticoidrezeptor.

Kernextrakte aus Dexamethason (Dex) und TPA, RU 486 und TPA bzw. TPA allein behandelten HeLa- tk^- -Zellen (2-stündige Behandlung) wurden mit Sepharose-immobilisiertem TRE-Oligonukleotid inkubiert und die gebundenen Proteine anschließend nach Waschen des Sediments in 0.4 M NaCl eluiert, aufgetrennt im Laemmli-Gel, mittels Western-Blot auf PVDF-Membran immobilisiert und mit anti-Rezeptor-Antikörpern (α GR) und anti-Jun-Antikörpern (α Jun) gemeinsam hybridisiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit radioaktivem Protein-A nachgewiesen.

nur Probenpuffer, der die im gesamten Experiment eingesetzten Protease-Inhibitoren enthielt, aufgetragen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß unter *in vitro* Bedingungen eine Bindung des Hormon-aktivierten Glucocorticoidrezeptors an den Transkriptionsfaktor möglich ist. Ferner ist gezeigt, daß diese Interaktion auch dann stattfindet, wenn AP-1 nicht an DNA gebunden ist. Sofern die Repression der Kollagenase-I Expression durch Glucocorticoide tatsächlich auf einer stöchiometrischen Wechselwirkung zwischen aktiviertem Rezeptor und AP-1 beruht, sollte die Inhibition der Kollagenase-I Expression durch Überexpression von Fos bzw. Jun in der Hormon-behandelten Zelle beeinträchtigt werden. Darüber hinaus ist auch denkbar, daß durch die Überexpression von AP-1 Komponenten auch die positive Wirkung des Glucocorticoidrezeptors beeinflußt wird. Beide Möglichkeiten werden im folgenden Abschnitt untersucht.

XIII) Die Überexpression von Fos blockiert sowohl die positive als auch die negative Wirkung des aktivierten Glucocorticoidrezeptors auf die Genexpression.

Aufgrund der vorangegangenen Experimente kann angenommen werden, daß der Hormon-aktivierte Rezeptor einen Komplex mit AP-1 bilden kann und daß dadurch die trans-aktivierende Funktion von AP-1 blockiert wird. Es wurde nun geprüft, ob umgekehrt auch die Blockierung der trans-aktivierenden Eigenschaft des Rezeptors, durch die Hormon-induzierbare Gene aktiviert werden, durch Komplexierung des Rezeptors mit AP-1 (-Komponenten) erfolgen kann. Bei der Ko-Transfektion eines MMTV-Konstrukts mit Expressionsplasmiden, in denen die codierenden Bereiche des *c-fos*- bzw. *c-jun*-Gens und der Promoter des frühen t-Antigens von SV40 kombiniert waren (SV-Fos bzw. SV-Jun) zeigte sich in HeLa-tk⁻-Zellen kein Einfluß der Fos- bzw. Jun-Überexpression auf die Hormon-Induzierbarkeit des Reportergens. In Maus-Fibroblasten (NIH3T3) dagegen wurde sowohl die Hormon-Induktion des MMTV-Promoters als auch die Dexamethason-Aktivierung synthetischer Promotoren, in die GRE-Elemente inseriert waren (Strähle et al., 1987), durch die Expression des ko-transfizierten SV-Fos Konstrukts vermindert (Tabelle 4). Da keines der verwendeten GRE-Reporter-Konstrukte eine AP-1-Erkennungssequenz enthält kann angenommen werden, daß nicht die direkte Bindung von AP-1 an die DNA, sondern eine Interaktion zwischen Fos und dem Hormonrezeptor die Ursache für die Verminderung der Genaktivität war.

Enhancer-Konstrukte		kotransfiziertes Plasmid		pSV			pSVfos		
		-Dex	+Dex	Relative Aktivität	-Dex	+Dex	Relative Aktivität		
MMIV-LTR	-TPA	84	2136	25.43	66	474	7.18	NIH3T3	
MMIV-GRE	-TPA	72	474	6.58	54	78	1.44		
GRE 22	-TPA	1668	4752	2.85	72	102	1.42		
GREpal 1	-TPA	474	3090	6.52	72	90	1.25		
5xTRE	-TPA	967	406	0.42	84778	78831	0.93	HeLa-tk ⁻	
5xTRE	+TPA	63136	12778	0.20	90345	86744	0.96		
Enhancer-Konstrukte		-Dex	+Dex	Relative Aktivität	-Dex	+Dex	Relative Aktivität		
		RSV-Neo			RSV-Fos				

Tabelle 4: Die Überexpression von c-Fos blockiert die Wirkung von Dexamethason auf die Transkription Hormon-regulierter Gene.

In den oberen vier Zeilen ist die Wirkung der Überexpression von c-Fos auf die Dexamethason-Induktion Hormon-aktivierbarer Gen-Konstrukte in NIH3T3-Zellen dargestellt, die unteren zwei Zeilen zeigen den Einfluß der Fos Überexpression auf die Reprimierung des TPA-aktivierbaren Konstrukts 5xTRE-CAT durch Dexamethason in An- und Abwesenheit von TPA in HeLa-tk⁻-Zellen. Die Zellen wurden nach den im Methoden-Teil angegebenen Standard-Methoden mit je 2 µg Enhancer-Konstrukt und 8 µg des jeweiligen Fos-Plasmids bzw. des entsprechenden Vektors transfiziert. Die Inkubation mit Dexamethason (1×10^{-6} M) und TPA (100 ng/ml) wurde für 40 Stunden durchgeführt und anschließend die spezifische CAT-Aktivität im Zellextrakt gemessen. In der Tabelle sind keine Standard-Abweichungen angegeben, da die hier angegebenen Mittelwerte z.T. aus nur zwei unabhängigen Experimenten stammen. (Die Ko-Transfektionsexperimente in NIH3T3-Zellen, die in der Tabelle zusammengefaßt sind, wurden von Herrn Kun-Koo Park im Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe, durchgeführt).

Die Aktivität des 5xTRE-Promoters wird durch Fos-Überexpression gesteigert (Schönthal et al., 1988a). In HeLa-tk⁻-Zellen konnte bei Verwendung des SV-Fos Konstrukts für die Ko-Transfektion aber weder eine Verminderung der MMTV-Induktion durch Dexamethason, noch eine Verminderung der durch Fos-Überexpression erhöhten 5xTRE-Promoter-Aktivität durch das Hormon beobachtet werden. Die Fos-bedingte Verstärkung der CAT-Synthese blieb in diesem Experiment aber auch unter der durch TPA-Induktion erreichten Aktivität des Promoters. Die generelle Steigerung der TRE-Promoter-Aktivität bei der Erhöhung der zellulären Fos-Konzentration könnte darauf zurückzuführen sein, daß sich mehr AP-1-Komplex bilden kann (Chiu et al., 1988). Da in der Zelle die DNA-bindende und nicht DNA-bindende Modifikation von AP-1 vermutlich im Gleichgewicht stehen, bildet sich so bei einer erhöhten Fos-Konzentration auch eine größere Menge des TRE-bindenden, aktivierenden AP-1 Komplexes. Solange die TPA-Behandlung der Zellen trotz der Fos-Überexpression noch zu einer Steigerung der TRE-Promoteraktivität führt, ist demnach der DNA-bindende Anteil an AP-1 noch nicht groß genug um die Sättigung der TRE-Bindung und -Aktivierung zu erreichen. Das zusätzlich durch die TPA-Behandlung modifizierte, in die DNA-bindende Form überführte AP-1 bewirkt dann eine weitere Steigerung der Genexpression. Durch den Einsatz eines Fos-Expressionsplasmids, bei dem der codierende Bereich von *c-fos* mit dem RSV-Promoter kombiniert war, konnte im Ko-Transfektionsexperiment in HeLa-tk⁻-Zellen die Sättigung der 5xTRE-Promoter Aktivierung erreicht werden. Bereits die spontane Expression des Reportergens war bei ko-transfiziertem RSV-Fos höher als die TPA-induzierte Expression des Reportergens ohne ko-exprimiertes Fos und ließ sich durch TPA auch nicht weiter steigern (vergleiche RSV-Neo und RSV-Fos in Tabelle 4). Demnach scheint die durch RSV-Fos verursachte Fos-Konzentration wesentlich höher zu sein als der Fos-Spiegel, der durch die Expression des gleichen codierenden Bereichs durch den SV40-Promoter erreicht wird. Bei der Expression der entsprechenden CAT-Konstrukte war allerdings kein Unterschied in der Aktivität zwischen RSV- und SV40-Promoter beobachtet worden (Tabelle 1, Abschnitt III). Die durch RSV-Fos-Überexpression aktivierte Expression von 5xTRE-CAT wurde durch Dexamethason-Behandlung der Zellen nicht reprimiert (Tabelle 4). Die RSV-Fos-Expression könnte in HeLa-tk⁻-Zellen also die Bildung einer so großen Menge an AP-1 bewirkt haben, daß die Rezeptorproteine mit "überschüssigem" AP-1 interagieren konnten, ohne daß die Aktivierung des TRE-Promoters beeinträchtigt wurde. In NIH3T3-Zellen dagegen führte bereits die durch SV-Fos-Expression erreichte Fos-Konzentration zur Beeinträchtigung der induzierenden

Wirkung des Glucocorticoidrezeptors; möglicherweise enthalten die beiden Zelltypen unterschiedliche Rezeptormengen.

Beide Experimente deuten auf eine Wechselwirkung zwischen dem aktivierten Hormonrezeptor und wenigstens einer AP-1-Komponente in Hormon-behandelten Zellen hin. Sie bestätigen damit die Interpretation der *in vitro* Experimente des vorhergehenden Absatzes, nach der als Ursache für die Repression der Kollagenase-I Expression die Interaktion des aktivierten Glucocorticoidrezeptors mit AP-1 angenommen wird.

XIV) Gene, die durch Glucocorticoidhormon gleichzeitig aktiviert und reprimiert werden: Metallothionein-IIA und c-jun.

Wie bisher gezeigt wurde, zielt die negative Wirkung des aktivierten Hormonrezeptors auf die Blockierung der trans-aktivierenden Funktion des Transkriptionsfaktors AP-1, während die Funktion anderer Transkriptionsfaktoren nicht durch den Rezeptor beeinflusst wird. Dazu gehört z.B. der Faktor, der mit dem SRE des c-fos-Gens interagiert und die TPA-Induktion des Gens bewirkt (siehe Abschnitt V). Da festgestellt wurde, daß die Aktivität eines synthetischen TRE-Promoters auch dann durch Glucocorticoide reduziert wird, wenn die AP-1-Bindestelle in eine zur Kollagenase-I Sequenz unterschiedliche Umgebung integriert ist (vergleiche Abschnitt VI) lag nahe, auch andere durch AP-1 regulierte Gene auf ihr Verhalten gegenüber dem Steroidhormon zu untersuchen. Im Rahmen meiner Arbeit habe ich daher den Einfluß von Dexamethason auf die Expression der menschlichen Gene Metallothionein-IIA- und c-jun analysiert.

Es war bekannt, daß die Transkription des Metallothionein-IIA-Gens (hMT-IIA) durch Dexamethason aktiviert wird; es enthält, etwa 250 bp vom Transkriptionsstart entfernt, eine Bindestelle für den Glucocorticoidrezeptor (GRE; Karin et al., 1984). Bei der Analyse der c-jun mRNA-Konzentration in HeLa-tk⁻-Zellen stellte sich heraus, daß die Hormon-Behandlung der Zellen auch hier zu einer Erhöhung der Menge an spezifischem Transkript führte (siehe Abbildung 17, Abschnitt XI). Die festgestellte Erhöhung der c-jun mRNA-Konzentration führt vermutlich auch zu einer verstärkten Jun Proteinsynthese. Dementsprechend wurde *in vitro* eine Hormon-abhängige Zunahme der Bindung von AP-1 an das Kollagenase-I TRE gefunden, wie durch "Band-Shift"-Experimente gezeigt werden konnte (siehe z.B. Abbildung 16). Dieses Ergebnis ist besonders deshalb überraschend, weil Jun eine der Komponenten des durch den Glucocorticoidrezeptor inhibierten AP-1 ist (Angel et al., 1988a). Beide Gene, sowohl hMT-IIA als auch c-jun,

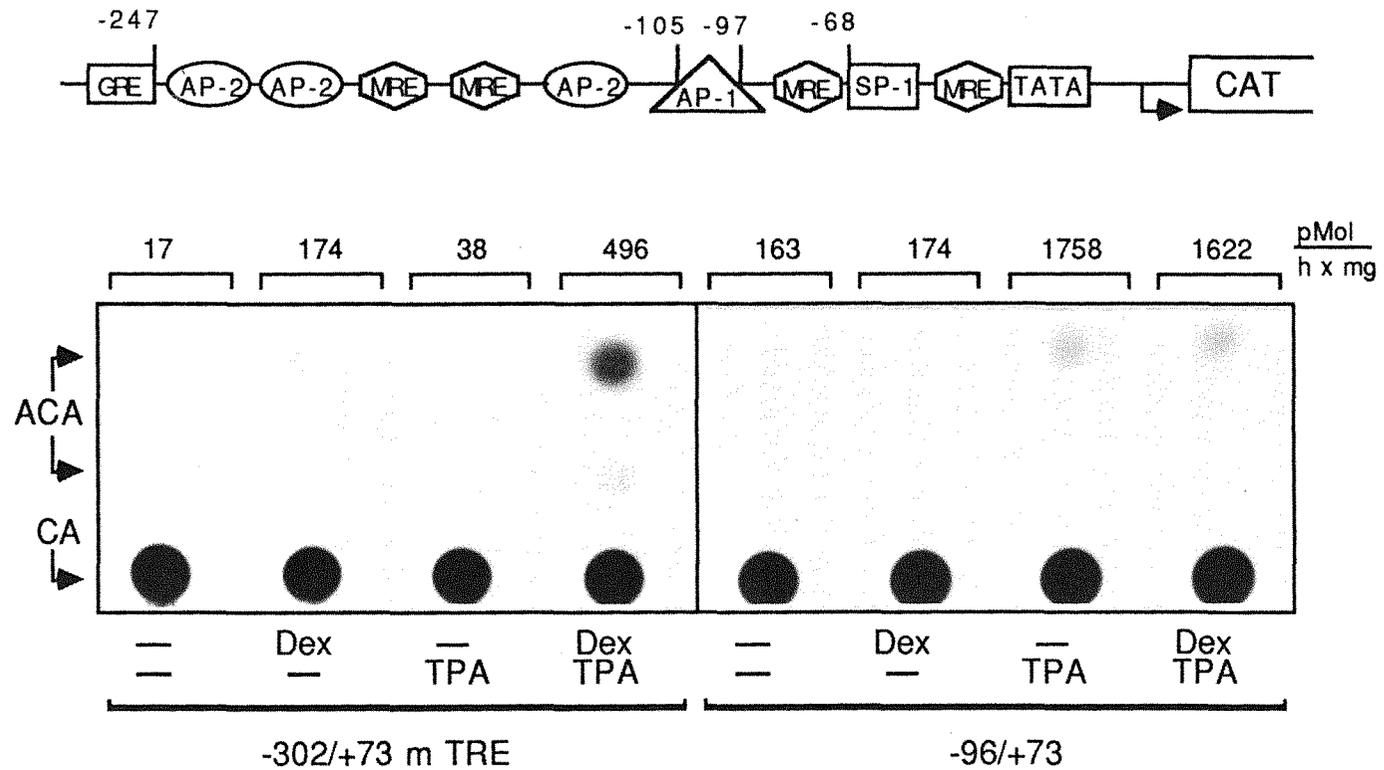


Abbildung 21: Der Metallothionein IIA-Promoter enthält ein TPA-induzierbares Element 3' von der AP-1 Bindestelle.

Die angegebenen Metallothionein-IIA Promoter-CAT Konstrukte wurden wie in Abbildung 5 beschrieben in HeLa-tk⁻-Zellen transfiziert. Die Bestimmung der CAT-Aktivität wurde für die mit -96/+73 transfizierten Zellen mit 100 µg, für die mit dem in der AP-1 Bindestelle mutierten -302/+73mTRE mit 600 µg Proteinextrakt durchgeführt.

werden bei Behandlung von Zellen mit Phorbolster induziert (Imbra und Karin, 1987; Angel et al., 1987a, 1988a; Schönthal et al., 1988a). Sie enthalten in ihren Promotoren zwar Sequenzelemente, die dem Kollagenase-I TRE sehr ähnlich sind und die *in vitro* auch mit AP-1 assoziiert sein können, ihre Aktivierung durch TPA scheint jedoch nicht bzw. nicht ausschließlich durch AP-1 vermittelt zu werden.

Im Metallothionein-IIA Promoter wurden neben dem GRE und der Bindestelle für AP-1 noch weitere, zum Teil induzierbare Enhancerelemente ermittelt. Die schematische Darstellung des 5'-flankierenden Bereiches des Metallothionein-IIA Gens in Abbildung 21 gibt neben der Lage des GRE's (Karin et al., 1984) und der AP-1 Bindestelle (Lee et al., 1987a,b; Angel et al., 1987a,b) die Positionen der Metall-induzierbaren Enhancerelemente (MRE's; Karin et al., 1987), der TATA-Box und der SP-1 Bindestelle (Lee et al., 1987a) sowie der Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 (Imagawa et al., 1987) an. Die Deletion der meisten dieser Enhancerelemente, inklusive der AP-1 Bindestelle, führte jedoch nicht zu einem Verlust der Aktivierbarkeit des verbleibenden Promoters durch Phorbolster (Tabelle 5). Der Verlust der 5' von Position -96 gelegenen Sequenzen bewirkte sogar eine Steigerung der TPA-Induzierbarkeit der entsprechenden chimären Promoter-CAT Konstrukte (Tabelle 5, Zeilen 5 und 6). Erst die weitere Deletion bis zu Position -71 ergab einen Promoter, der bei TPA-Behandlung der Zellen nicht stärker als das entsprechende Kontrollgen, pBLCAT5, induziert war (Tabelle 5, Zeilen 7 und 10). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die TPA-Induktion des Metallothionein-IIA Gens nicht über das AP-1-bindende Enhancerelement, sondern über ein Sequenzelement vermittelt wird, das 3'-wärts von der TRE-ähnlichen Sequenz im Promoter lokalisiert ist. Dem steht jedoch entgegen, daß die Expression eines durch Oligonukleotid-gestützte Mutagenese in der AP-1 Bindestelle veränderten Promoter-CAT Konstrukts anscheinend nicht mehr durch Phorbolster induziert werden kann (Tabelle 5, Zeile 8; Abbildung 21, links). Die Aktivität dieses Promoters ist jedoch so gering, daß möglicherweise selbst die TPA-induzierte Expression des mutierten Konstrukts unterhalb der Nachweisgrenze des Experiments blieb. Auch die durch Cadmium-Ionen induzierte CAT-Synthese, die beim nicht mutierten Promoter etwa 20-fach höher als die TPA-induzierte CAT-Produktion ist (d.h. etwa 7000-fach höher als das Vektor-Niveau), war beim mutierten Promoter-Konstrukt auf etwa 15-faches Vektor-Niveau vermindert. Es ist bis jetzt nicht bekannt, warum die Aktivität des in der AP-1 Bindungsstelle mutierten

Metallothionein IIA und Kontrollkonstrukte	-TPA		Relative Aktivität	+TPA		Relative Aktivität
	-Dex	+Dex		-Dex	+Dex	
-620/+73	696 ±79	3142 ±422	4.51 ±0.05	3156 ±879	3558 ±291	1.13 ±0.02
-302/+73	269 ±85	2581 ±625	9.59 ±0.08	1379 ±668	9312 ±970	6.75 ±0.07
-212/+73	224 ±67	81 ±14	0.36 ±0.09	1022 ±184	341 ±92	0.33 ±0.05
-134/+73	190 ±61	91 ±17	0.48 ±0.09	1201 ±203	491 ±51	0.41 ±0.09
-96/+73	163 ±25	174 ±23	1.06 ±0.09	1758 ±452	1622 ±158	0.92 ±0.06
-71/+73	225 ±76	183 ±51	0.81 ±0.05	296 ±94	240 ±48	0.81 ±0.08
-302/+73 mTRE	14 ±3	153 ±21	9.26 ±1.11	30 ±8	610 ±113	20.43 ±1.86
pSV ₂ CAT	7999 ±117	7528 ±203	0.94 ±0.02	8176 ±570	8044 ±410	0.98 ±0.02
pBLCAT ₅	19 ±4	17 ±3	0.93 ±0.36	24 ±4	27 ±6	1.10 ±0.07

Tabelle 5: Regulation verschiedener Metallothionein-IIA-CAT Konstrukte durch TPA und Dexamethason.

Je 10 µg der angegebenen DNA-Konstrukte wurden in 1×10^6 HeLa-tk⁻-Zellen transfiziert und für 40 Stunden mit 100 ng/ml TPA bzw. 1×10^{-6} M Dexamethason (Dex) behandelt. Die Bestimmung der CAT-Aktivität erfolgte nach dem im Methoden-Teil angegebenen Protokoll.

Metallothionein-IIA-Promoters niedriger ist als die des extrem 5'-deletierten Konstrukts (Tabelle 5, Zeilen 7 und 8). Die im c-jun Promoter enthaltene, Kollagenase-I TRE ähnliche Sequenz ist für die Phorbolster-Induktion dieses Gens erforderlich (Angel et al., 1988b). Dennoch scheint an dieses cis-wirkende Element der c-jun-DNA nicht AP-1, sondern ein AP-1-ähnlicher Faktor zu binden (Stein et al., 1989b).

Die gleichzeitige Behandlung von Zellen mit Phorbolster und Glucocorticoidhormon führt zur Induktion beider Gene, Metallothionein-IIA und c-jun. Der Effekt der gleichzeitigen Behandlung führt für c-jun jedoch nicht zu einer gegenüber der alleinigen Inkubation der Zellen mit Dexamethason bzw. TPA gesteigerten Erhöhung der mRNA-Konzentration (Abbildung 17, Abschnitt XI). Dieser Befund könnte dadurch erklärt werden, daß die gemessene mRNA-Menge aus der Summe der Expressions-induzierenden und einer gleichzeitig Transkriptions-reprimierenden Wirkung des aktivierten Rezeptors resultiert. Die im folgenden beschriebenen Experimente zeigen, daß die Expression von c-jun und Metallothionein-IIA tatsächlich durch Glucocorticoidhormon in zweifacher Weise, d.h. gleichzeitig positiv und negativ, reguliert wird.

Die Messung der Dosis-Abhängigkeit der Hormon-Regulation der Phorbolster-induzierten Metallothionein-IIA-Expression ergab, daß der Promoter bei sehr niedrigen Dexamethason-Konzentrationen reprimiert wird, während bei hohem Hormon-Spiegel ein additiver Induktionseffekt mit Phorbolster auftritt (gezeigt anhand des Metallothionein-IIA Konstrukts -302/+73-CAT in Abbildung 22. Die Untersuchung der mRNA-Synthese des endogenen Gens ergab ein ähnliches Bild). Der reprimierende Effekt der Glucocorticoid-Behandlung wurde darüber hinaus anhand von chimären Metallothionein-IIA-CAT Konstrukten gezeigt, aus deren Promoter-Teil das Hormon-induzierbare GRE deletiert worden war (Abbildung 22, -134/+73-CAT). Gegenüber den "langen" Promoter-Konstrukten, die über das GRE verfügen und noch durch das Hormon induzierbar sind, wurden sowohl die basale als auch die Phorbolster-induzierte Aktivität der deletierten Promotoren (-212/+73; -134/+73) bei 10^{-6} M Dexamethason deutlich reprimiert (Tabelle 5, Zeilen 1-4). Keine Erklärung kann zur Zeit für zwei beobachtete Effekte gegeben werden: für die um den Faktor 10 gegenüber der in Abschnitt VIII für die Inhibition der Kollagenase-I Expression ermittelten, für die Repression der Metallothionein-IIA-Expression erforderlichen Hormon-Konzentration, und für den Unterschied in der

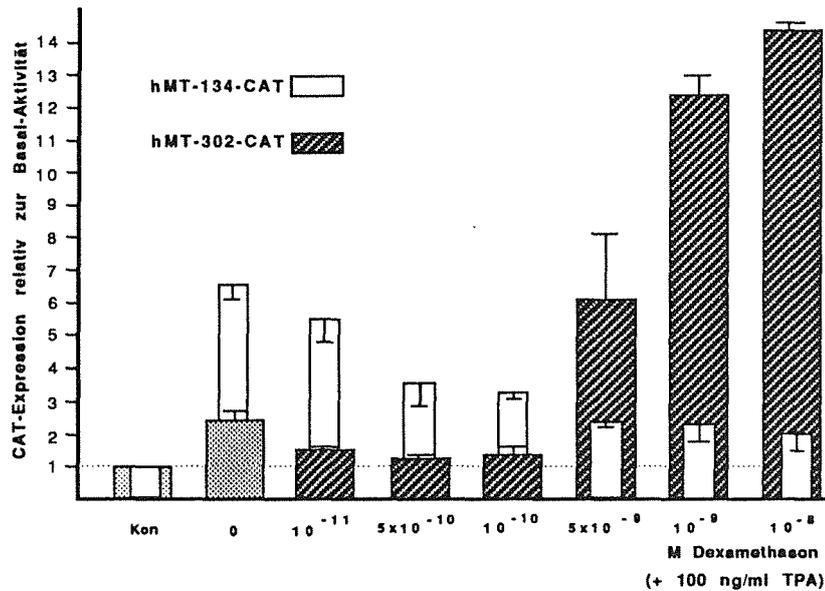


Abbildung 22: Dosisabhängigkeit der Repression des Metallothionein-IIA Promoters durch Dexamethason.

HeLa-tk⁻-Zellen wurden wie in Abbildung 5 beschrieben mit hMT -302/+73-CAT bzw. hMT -134/+73-CAT transfiziert. Die Zellen wurden für 40 Stunden wie angegeben mit TPA und Dexamethason behandelt. Die relative Expressionsaktivität wurde bezogen auf die Expressionsrate un behandelter Zellen als 1. Die Fehlergrenzen sind für -302/+73-CAT (schraffiert) nach oben, für -134/+73-CAT (weiß) nach unten angegeben. Das Konstrukt -134/+73-CAT enthält kein, das Konstrukt -302/+73-CAT enthält ein GRE. Beide Konstrukte enthalten eine AP-1 Bindestelle (Positionen -105 bis -97).

Aktivität der beiden "langen" Metallothionein-IIA-Promotoren (-620/+73 bzw. -302/+73) bei gleichzeitiger Einwirkung von TPA und Dexamethason. Die Gen-aktivierende Wirkung des Glucocorticoidrezeptors kann durch benachbarte Bindung nicht Hormon-reprimierter Transkriptionsfaktoren an den Promoter gesteigert werden, wie durch den Einsatz verschiedener, synthetischer Genkonstrukte gezeigt werden konnte (Schüle et al., 1988). Durch einen solchen Mechanismus könnte auch der additive Effekt der Induktion der Metallothionein-IIA Transkription für das endogene Gen und das chimäre CAT-Konstrukt -302/+73 bei gleichzeitiger TPA- und Dexamethason-Behandlung zustande kommen (Abbildung 22; Tabelle 5). Das 3' von Position -96 vermutete Phorbol-ester-abhängige cis-Element vermittelt eine Hormon-unabhängige TPA-Induktion im deletierten Promoter (Tabelle 5; Abbildung 21, rechter Teil). Im "langen" Promoterkonstrukt, in dem die AP-1-Bindestelle mutiert ist, ist es enthalten. Obwohl bei der transienten Expression dieses Konstrukts (-302/+73 m TRE) keine Induktion durch TPA alleine zu erkennen ist (siehe oben), wird die Dexamethason-Induktion durch gleichzeitige TPA-Behandlung deutlich gesteigert (Abbildung 21, linker Teil). Für Metallothionein-IIA ist ein additiv induzierender Effekt von Glucocorticoidhormon und Phorbol-ester also auch dann möglich, wenn die Aktivierung des Gens durch AP-1 vollständig blockiert wird bzw. die Bindung von AP-1 an den Promoter nicht erfolgt.

Die Transkription des kürzesten Metallothionein-IIA-CAT Konstrukts -71/+73 scheint durch das Hormon kaum noch beeinflusst zu sein (Tabelle 5, Zeile 7). Dieser Promoter enthält allerdings, außer einem allein nicht funktionellen Metall-induzierbaren Enhancer (Karin et al., 1987), keine induzierbaren Enhancerelemente mehr (siehe schematische Darstellung des Promoters in Abbildung 21). Die 5'-Grenze eines nicht durch Glucocorticoide reprimierten Metallothionein-IIA Promoterfragments wurde bisher nicht genau ermittelt; sie liegt aber zwischen Position -96 (Promoter ohne AP-1 Bindungsstelle, nicht reprimiert; Abbildung 21 rechts) und Position -134 (reprimierter Promoter mit AP-1-Bindungsstelle).

Experimente mit dem Transkriptions-blockierenden Agens Actinomycin-D erbrachten bisher keinen Hinweis darauf, daß die Erhöhung der Konzentration von *c-jun* mRNA in der Zelle nach Dexamethason-Behandlung auf eine Stabilisierung der mRNA zurückzuführen ist. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Erhöhung der *c-jun* mRNA-Menge nach Dexamethason-Behandlung auf eine erhöhte Transkription des Gens zurück-

c-jun Konstrukte	-TPA		Relative Aktivität	+TPA		Relative Aktivität
	-Dex	+Dex		-Dex	+Dex	
-1600/+740	832 ±175	520 ±134	0.62 ±0.03	1997 ±212	1051 ±120	0.52 ±0.02
-132/+740	447 ±73	259 ±60	0.58 ±0.06	943 ±199	499 ±57	0.54 ±0.05
-132/+170	192 ±48	107 ±20	0.57 ±0.05	401 ±91	205 ±34	0.50 ±0.03
-79/+170	108 ±19	37 ±2	0.35 ±0.06	695 ±156	232 ±48	0.34 ±0.02
-79/+170 mTRE	35 ±12	34 ±6	1.03 ±0.21	58 ±10	40 ±2	0.88 ±0.18
pBLCAT ₅	19 ±4	17 ±3	0.93 ±0.36	24 ±4	27 ±6	1.10 ±0.07

Tabelle 6: Die Mutation der AP-1 Bindungsstelle im deletierten c-jun Promoter zerstört die TPA-Induzierbarkeit und die Dexamethason-Repression des transfizierten Gens.

Verschiedene Deletionsmutanten des c-jun Promoters wurden als CAT-Konstrukte transient in HeLa-tk⁻-Zellen transfiziert und auf ihre Reprimierbarkeit durch 10⁻⁶ M Dexamethason in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml TPA untersucht. In -79/+170 mTRE war die AP-1 Erkennungssequenz durch gezielte Mutagenese zerstört; -1600/+740 entspricht dem publizierten Konstrukt -1100/+740-CAT (Angel et al., 1988b). Für Methoden siehe Tabelle 1.

zuföhren ist. Allerdings war auch der längste bisher untersuchte c-jun Promoter von Position -1600 bis +740, kloniert in den promoterlosen Vektor pBLCAT5, im transienten Expressions-Experiment nicht durch Dexamethason induzierbar (Tabelle 6, Zeile 1). Das vermutete GRE ist demnach wahrscheinlich mehr als 1600 bp in 5'-Richtung vom Transkriptionsstart entfernt. Alle getesteten CAT-Konstrukte, die c-jun-Promoterbereiche mit der TRE-ähnlichen Sequenz (zwischen den Positionen -79 und -70 im c-jun Promoter) enthielten, waren durch Phorbol ester induziert (Tabelle 6; vergleiche Angel et al., 1988b). Die Promotoren dieser Konstrukte wurden auch alle durch Dexamethason reprimiert (Tabelle 6). Die Aktivität eines c-jun Promoter-Konstrukts, bei dem die TRE-ähnliche Sequenz durch gezielte Mutagenese geändert worden war (Angel et al., 1988b), konnte weder durch TPA gesteigert noch durch Dexamethason vermindert werden (Tabelle 6, Zeile 5).

Zusammengefaßt belegen die Experimente, daß Gene, die sowohl über ein Glucocorticoidrezeptor-spezifisches cis-Element (GRE) verfügen als auch durch AP-1 Bindung aktiviert werden, unter doppelter Kontrolle durch Glucocorticoide stehen können. Bei niedriger Hormon-Konzentration wird die Expression unterdrückt. Mit steigender Menge an Glucocorticoid überwiegt dann die induzierende Wirkung des aktivierten Rezeptors, so daß bei hoher Steroid-Konzentration wieder die induzierte Aktivität des Promoters erreicht wird.

Diskussion

Das geregelte Zellwachstum ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Funktion des Organismus und wird deshalb durch komplexe Regulationsmechanismen auf mehreren Ebenen kontrolliert. Die Regulation der Proliferation wird innerhalb der einzelnen Zelle durch ein Netzwerk ineinander verzahnter Regelkreise der differentiellen Genexpression erreicht (Schlessinger et al., 1978; Rodriguez-Pena und Rozengurt, 1984; Greenberg und Ziff, 1984; Kruijer et al., 1984). Dabei erfolgt die Beeinflussung der Wachstumskontrolle von außerhalb der Zelle durch eine Vielzahl Proliferations-fördernder Ereignisse und eine ebenso große Anzahl Wachstums-hemmender Einflüsse. Die proliferativen Reaktionen auf Zell- und Gewebeniveau, die z.B. bei Immunreaktionen des Körpers, bei Entzündungsprozessen, natürlichen neoplastischen Vorgängen wie Wundheilung und auch anomalen Veränderungen des Gewebes während der Tumorpromotion erfolgen, unterliegen demnach einem komplexen Zusammenspiel stimulierender und inhibitorischer Regulation. In meiner Arbeit habe ich den molekularen Mechanismus eines bestimmten inhibitorischen Vorgangs untersucht, des reprimierenden Einflusses von Glucocorticoidhormon auf die Gen-Expression. Ich konnte zeigen, daß durch Glucocorticoid-Behandlung der Zellen die Gen-aktivierende Funktion des Transkriptionsfaktors AP-1 blockiert wird. AP-1 scheint eine zentrale Position bei der Wachstumskontrolle der Zellen einzunehmen (Übersichten in Herrlich und Ponta, 1989; Vogt und Bos, 1989). Die Tatsache, daß AP-1 durch Tumor-promovierende Phorbolster aktiviert und durch den klassischen anti-Tumorpromoter Dexamethason inaktiviert wird, scheint die zentrale Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Tumorpromotion zu bestätigen.

Dexamethason reprimiert die Expression vieler, aber nicht aller Phorbolster-induzierter Gene. Zum Beispiel werden weder der vollständige Promoter des *c-fos*-Gens, noch ein synthetisches Promoterkonstrukt mit dem Phorbolster-induzierbaren *c-fos*-Enhancerelement SRE durch das Hormon inhibiert. Auch ein mutierter Promoter des Metallothionein-IIA Gens, aus dem Hormonrezeptor- und AP-1-Bindestelle deletiert waren und der dennoch Phorbolster-induzierbar war, wurde durch das Steroidhormon nicht inaktiviert. Die inhibitorische Wirkung des Glucocorticoidhormons kann demnach nicht am Beginn der durch Phorbolster in der Zelle induzierten Signalketten stehen. Vielmehr greift die hormonelle Repression erst kurz vor der Übertragung des

Phorbolster-Signals auf die inhibierten Gene spezifisch durch Wechselwirkung mit bestimmten Transkriptionsfaktoren ein. Einer der betroffenen Transkriptionsfaktoren ist AP-1, der die Phorbolster-Induktion einer Reihe von Genen vermittelt. AP-1 bindet spezifisch an einige der Phorbolster-induzierbaren Enhancerelemente (TRE's). Die regulatorische Funktion von AP-1 wird auf post-translatorischer Ebene durch Dexamethason beeinflusst, wobei dieser Einfluß durch den Hormon-aktivierten Glucocorticoidrezeptor erfolgt. Der aktivierte Hormonrezeptor ist selbst ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression ebenfalls durch Bindung an spezifische Enhancerelemente (GRE's) reguliert. Die Sequenzmotive von TRE und GRE unterscheiden sich vollkommen, wodurch die Möglichkeit eines Verdrängungsmechanismus, wie er für die Interferenz zweier Transkriptionsfaktoren vorgeschlagen wurde (Barberis et al., 1987), unwahrscheinlich erscheint. Für die Verdrängung von AP-1 von "seiner" Bindungsstelle durch Bindung des Hormonrezeptors an das TRE ergaben sich auch unter Einbeziehung der TRE-flankierenden Sequenzen im Rahmen meiner Untersuchungen keine Hinweise. Eine weitere Hypothese zur wechselseitigen Beeinflussung zweier unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren berücksichtigt die Möglichkeit, daß sie um einen gemeinsamen, für ihre regulatorische Funktion notwendigen, Ko-Faktor kompetitieren (Ptashne, 1988; Meyer et al., 1989). Eine Konkurrenz auf Promoter-Ebene, bei der ein Faktor vom reprimierten Promoter abgezogen würde um an ein DNA-Element eines anderen Hormon-regulierten Gens zu binden, scheint aber nicht die Ursache für die Repression AP-1-aktivierter Gene zu sein: unterschiedliche, zum Teil synthetische Promotoren mit der AP-1-Bindestelle wurden in gleicher Weise durch die Dexamethason-Behandlung inhibiert. Darüber hinaus fand die Repression der TRE-Promotoren bei einer Hormon-Konzentration statt, bei der die Bindung des Rezeptors an GRE's möglicherweise kompetitiver Promotoren noch nicht zu erfolgen scheint. Die Bindung eines gemeinsamen, limitierenden Faktors an einen nicht reprimierten Promoter müßte demnach auch Hormon-unabhängig, d.h. konstitutiv erfolgen können. Die Inhibition von AP-1 aufgrund einer Konkurrenz um einen gemeinsamen Ko-Faktor auf Protein-Ebene scheint ebenfalls wegen der niedrigen, zur Repression erforderlichen Hormonkonzentration unwahrscheinlich: wenn der Rezeptor neben dem Hormon einen weiteren Faktor, der auch AP-1 aktiviert, binden würde, müßte die Aktivierung Hormon-induzierter Gene bereits bei der niedrigen Dexamethason-Dosis erfolgen. Da die Induktion aber erst bei höherer Rezeptor-Konzentration auftritt, kann ein

möglicherweise für AP-1 und Rezeptor gemeinsam wichtiger Ko-Faktor nicht limitierend sein.

Die Erfordernis des Hormons für die Repression läßt vermuten, daß der Rezeptor in den Zellkern verlagert wird und dort in das selbe Kompartiment gerät, in dem sich auch AP-1 befindet. Die zur Repression der Kollagenase-I Expression erforderliche Dexamethason-Konzentration liegt nur geringfügig oberhalb der Dissoziationskonstanten des Hormon-Rezeptor-Komplexes. Besonders deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß bereits geringe Mengen des aktivierten Rezeptors im Zytoplasma eine intrazelluläre Signalkette auslösen, die im Zellkern am Transkriptionsfaktor AP-1 mündet. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten Immun-Ko-Präzipitationsexperimente weisen jedoch eher auf eine direkte Interaktion zwischen aktiviertem Rezeptor und AP-1 hin. In letzter Zeit nehmen die Hinweise darauf, daß die Regulation der Transkription auf molekularer Ebene neben der Bindung von Transkriptionsfaktoren an cis-wirkende Enhancerelemente der DNA auch Protein/Protein-Wechselwirkung erfordert, zu. Nach heute gültigen Vorstellungen treten die DNA-gebundenen Enhancerfaktoren zur trans-Aktivierung (oder -Reprimierung) des Promoters in Kontakt mit den Komponenten des Transkriptions-Initiationskomplexes (Übersichten in Ptashne, 1988; Guarente, 1988; Mitchell und Tjian, 1989). In den Enhancer-bindenden Transkriptionsfaktoren sind die DNA-Bindungs- und trans-Aktivierungsfunktionen gleichermaßen enthalten (Übersichten für AP-1 in Curran und Franza, 1988; Gebel et al., 1989; und für Hormonrezeptoren in Evans, 1988; Beato, 1989). Die trans-Aktivierung kann allerdings auch über ein zusätzliches Protein erfolgen, das selbst nicht an die DNA bindet und als "Brücke" zwischen Enhancerfaktor und Transkriptions-Initiationskomplex dient (McKnight et al., 1987; Lillie und Green, 1989; Forsburg und Guarente, 1989). Die in dieser Arbeit beschriebene Protein/Protein-Wechselwirkung stellt in sofern einen neuen Typ von Protein-Interaktion zur Transkriptionsregulation dar, in dem die beteiligten Proteine neben ihrer trans-reprimierenden, Protein-bindenden Eigenschaft auch eine DNA-bindende, trans-aktivierende Funktion haben; AP-1 und der aktivierte Glucocorticoidrezeptor können gegenseitig ihre, nach DNA-Bindung, trans-aktivierende Funktion blockieren, ohne daß der jeweils reprimierende Faktor an DNA binden muß. AP-1 ist darüber hinaus vermutlich über seine Protein-bindende Eigenschaft an einem weiteren Transkriptions-reprimierenden Vorgang beteiligt: der Autoregulation des *c-fos*-Gens. AP-1 scheint direkt die trans-aktivierende Funktion des SRE-bindenden, Serum-abhängigen Faktors zu blockieren (Schönthal et al., 1988b, 1989; König et al., 1989).

Es wurde bereits für eine Reihe von Genen beschrieben, daß ihre Expression durch Glucocorticoide negativ reguliert wird. Nur bei wenigen dieser Beispiele war jedoch ein Rückschluß auf den jeweiligen molekularen Mechanismus, der zur Inhibition der Expression führte, möglich. Die Blockierung der Induktion des Gens für die Untereinheit des menschlichen Glycoproteins- α durch cyclisches AMP erfolgt durch die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an ein GRE, dessen Sequenz mit der Bindestelle für den durch cyclisches AMP induzierten Faktor überlappt (CRE; Akerblom et al., 1988; Oro et al., 1988). Das α -Fötoprotein-Gen enthält ebenfalls ein mit einem anderen Enhancerelement überlappendes GRE (Guertin et al., 1988). Die Transkription des Rinder-Prolaktin-Gens wird durch die Bindung des Rezeptors an ein "negatives GRE" verhindert (Sakai et al., 1988); die Ursache der unterschiedlichen Funktion "negativer" und "positiver" GRE's ist nicht bekannt, an beide scheint der Rezeptor in gleicher Weise zu binden. Protein/Protein-Wechselwirkung zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und anderen, nicht definierten Transkriptionsfaktoren wurde als Mechanismus der gewebespezifischen Repression des Ratten-Prolaktin-Gens ermittelt (Adler et al., 1988); der Unterschied der Ergebnisse für zwei Prolaktin-Gene ist bis jetzt nicht verstanden. Das im Rahmen meiner Arbeit interessanteste Beispiel negativer Hormonregulation war die Repression des Phorbolster-induzierten Proliferin-Gens, das eine Kollagenase-I-TRE ähnliche AP-1 Bindestelle enthält (Mordacq und Linzer, 1989). Die Bindung des Hormonrezeptors an ein 31 bp langes Promoter-Fragment, das die AP-1 Bindestelle enthielt, wurde *in vitro* gezeigt. *In vivo* jedoch war auch ein deletierter Proliferin-Promoter, der nur noch das TRE, nicht aber die *in vitro* ermittelte Rezeptor-Bindestelle vollständig enthielt, durch Dexamethason reprimiert. Der vorgeschlagene Mechanismus der Verdrängung von AP-1 durch den Rezeptor scheint deshalb nicht überzeugend; der entscheidende Schritt der Proliferin-Repression durch Glucocorticoidhormone könnte, wie bei der Kollagenase-I, auch die Blockierung der trans-aktivierenden Eigenschaft von AP-1 durch Protein/Protein-Wechselwirkung sein.

Es ist bis heute weder bekannt, wie DNA-gebundene Enhancerfaktoren den Transkriptions-Initiationskomplex aktivieren, noch ist sicher, ob die trans-Aktivierung auch mit unterschiedlichen Transkriptions-Initiationskomplexen erfolgt. Für die Expression eines Herpes-Simplex-Virus Typ-1 Gens ist jedoch ein spezifisches TATA-Box Sequenz-Motiv erforderlich (Homa et al., 1988), und die Inhibition der trans-Aktivierung des HSP 70 Promoters durch das Adenovirus-E1A Protein erfolgt nur mit

einem bestimmten Transkriptions-Initiationskomplex, ebenfalls durch die preferentielle Repression des Promoters mit einer bestimmten TATA-Sequenz gezeigt (Simon et al., 1988). Der Glucocorticoidrezeptor dagegen unterscheidet bei seiner Transkriptions-reprimierenden Wirkung nicht zwischen möglicherweise unterschiedlichen Transkriptions-Initiationskomplexen; die Repression der TRE-CAT Konstrukte durch Dexamethason erfolgte auch bei unterschiedlichen TATA-Box Motiven der Promotoren in gleicher Stärke. Trotz des Unterschiedes in der Spezifität der reprimierenden Wirkung besitzen E1A und der Glucocorticoidrezeptor gemeinsame Eigenschaften in der Repression: E1A blockiert ebenfalls die aktivierende Funktion von AP-1 (Offringa et al., 1989), bindet aber nicht an DNA (Ferguson et al., 1985; Lillie und Green, 1989). Dementsprechend scheint die reprimierende Domäne von E1A ihre Wirkung wie der Glucocorticoidrezeptor über Protein/Protein-Wechselwirkung auf AP-1 auszuüben.

Der AP-1-spezifische, negative Effekt von Dexamethason erfolgte bei etwa 10-fach niedrigerer Konzentration als alle bisher bekannten positiven Wirkungen von Glucocorticoidhormonen. Dadurch wird eine weitere Facette der Hormon-Physiologie, die Fein-Regulation der Hormonwirkung über die gesamte Breite physiologischer Hormon-Konzentrationen, offenbar. Dexamethason reprimiert die AP-1-abhängige Gen-Expression bei sehr niedriger Konzentration. Die halb-maximale Inhibition erfolgt bei etwa 1.5×10^{-9} M (1.5 nM) Dexamethason, während für die halb-maximale Aktivierung des Hormon-induzierten MMTV-Promoters etwa 2×10^{-8} M (20 nM) Hormon benötigt werden. Die gleiche Differenz trifft auch für das physiologische Glucocorticoidhormon Cortisol zu, wengleich auf etwa 10-fach höherem Konzentrationsniveau (halb-maximale Repression bei 1.5×10^{-8} M, halb-maximale Induktion bei 2×10^{-7} M). Die Bedingungen der Zellkultur lassen sich gut auf die Situation im Organismus übertragen. Im Organismus unterliegt die Cortisol-Konzentration im Blut großen Schwankungen: niedrigste Werte werden am Abend mit 33 bis 250 nM erreicht. Am Morgen liegt das Konzentrationsniveau bei 400 bis 800 nM, und in Streß-Situationen werden Spitzenwerte von 800 bis 1500 nM erreicht. Da das synthetische Glucocorticoid Dexamethason etwa 30-fach effizienter als das natürliche Hormon Cortisol ist (Williams, 1981), läßt sich die Bandbreite der physiologischen Cortisol-Konzentrationswerte auf einen Dexamethason-Konzentrationsbereich von etwa 1 bis 50 nM in der Zellkultur umrechnen. Dabei ist nicht berücksichtigt, daß die durch Serum-Faktoren gebundene (nicht frei verfügbare) Fraktion an Hormon in Zellkultur und Organismus unterschiedlich groß ist. Das abendliche "Tief" des Hormon-Spiegels wäre demnach in einem Grenzbereich, in dem AP-1 gerade noch

oder bereits nicht mehr mit dem Rezeptor interagieren kann, während die Morgen-Werte klar zu einer Inaktivierung von AP-1 führen können. Die Aktivierung Glucocorticoid-induzierbarer Gene kann dagegen erst beim "Streß-Level" erfolgen. Diese Situation ist z.B. bei Patienten mit "Cushing-Syndrom" gegeben. Ihr ständig im Streß-Bereich liegender Glucocorticoid-Spiegel von 500 bis 1500 nM Cortisol im Blut (das entspricht also etwa 17 bis 40 nM Dexamethason in der Zellkultur) verursacht Symptome, die das gesamte Spektrum der anti-proliferativen und gluconeogenetischen Wirkungen des Hormons zeigen: Cushing-Patienten leiden z.B. an verlangsamtem Zellwachstum, Osteoporose und Wundheilungsproblemen, haben niedrige Lymphozyten-Titer und sind daher anfällig gegenüber Infektionen, die die häufigste Todesursache bei dieser Krankheit darstellen. Aufgrund der ständig gesteigerten Gluconeogenese ist auch ihre Glucose-Toleranz vermindert, d.h. sie sind häufig Zuckerkrank.

Nach einer populären Theorie zur Entzündungs-hemmenden Wirkung von Glucocorticoiden wird durch die Hormonbehandlung die Synthese eines Inhibitors der Phospholipase- A2 Aktivität (Lipocortin) induziert, wodurch die Synthese Entzündungsfördernder Faktoren wie z.B. Prostaglandinen verhindert wird (Flower und Blackwell, 1979). Aufgrund des Unterschieds der für die negative bzw. positive Wirkung des Hormons notwendigen Konzentration muß davon ausgegangen werden, daß die Lipocortin-Induktion und dadurch die Entzündungs-Hemmung nur bei hoher Glucocorticoid-Dosis erfolgt. Die Gültigkeit der Lipocortin-Theorie für die Entzündungs-Hemmung ist allerdings nicht erwiesen (Übersicht in Crompton et al., 1988). Ein weiterer, hohe Glucocorticoid-Konzentration erfordernder, Entzündungs-hemmender Vorgang ist die Hormon-induzierte Verminderung des Lymphozyten-Titers (Sibley und Tomkins, 1974). Hier wird die Entzündung auf einer Ebene gehemmt, der die hoch dosierende Hormontherapie für akute, nicht aber chronische Entzündungen geeignet erscheinen läßt; die permanente Verminderung des Lymphozyten-Titers bedeutet ein erhöhtes Infektionsrisiko des Patienten (siehe oben). Die Ergebnisse, daß die Repression der Kollagenase-I Expression durch Blockierung der trans-aktivierenden Funktion von AP-1 bei sehr niedriger Glucocorticoid-Konzentration und unabhängig von der Neusynthese von Protein erfolgt, deuten neue Möglichkeiten zur differenzierteren Glucocorticoid-Therapie an: bei chronischen Entzündungen, rheumatischer Arthritis und anderen Krankheiten, die von einer verstärkten Aktivität Gewebe-verändernder Faktoren begleitet oder verursacht sind, könnte die Aktivität dieser Faktoren schon durch niedrigere Dosierung des Hormons vermindert werden. Die unerwünschten Nebeneffekte der

Gluconeogenese und die Abtötung von Lymphozyten würden dann nicht auftreten können. Die Dexamethason-Behandlung bewirkt nicht nur die verminderte Produktion Matrix-abbauender Enzyme wie z.B. Kollagenase-I, auch die bei Entzündungsprozessen induzierte Synthese der Wachstumsfaktoren Interleukin 1- β (IL-1) und Tumor-Necrosis-Faktor- α (TNF- α), die beide ihrerseits die Kollagenase-I Expression induzieren, wird durch das Glucocorticoidhormon verhindert (Beutler et al., 1986; Lee et al., 1988). Die Repression ihrer Expression erfolgt sowohl auf Transkriptionsebene als auch durch Verminderung der mRNA-Stabilität. Aufgrund der für die Repression der Kollagenase-I Expression erhaltenen Ergebnisse scheint es möglich, daß auch die die Expression von IL-1 und TNF- α aktivierenden Transkriptionsfaktoren schon bei niedriger Hormon-Konzentration blockiert werden können.

Die Tatsache, daß einige durch AP-1 aktivierte Gene aufgrund einer in ihrem Promoter vorhandenen Glucocorticoidrezeptor-Bindestelle (GRE) durch das Hormon in zweifacher, d.h. negativer und positiver Weise reguliert werden, erscheint vernünftig. Im Unterschied zur Kollagenase werden diese Proteine offensichtlich auch bei hohen Glucocorticoid-Konzentrationen gebraucht. Als Komponente eines Transkriptionsfaktors könnte Jun auch bei hoher Hormon-Konzentration für die Gen-Expression erforderlich sein. Metallothionein-IIA reguliert vermutlich nicht nur den Schwermetall-Haushalt der Zelle (Karin, 1985), sondern scheint auch für die Differenzierung und für die Reaktion auf Schwermetall-Vergiftungen wichtig zu sein. Es scheint sinnvoll zu sein, daß dieses Protein unter derartigen, mit hohem Hormonspiegel einhergehenden Streß-Bedingungen vermehrt synthetisiert wird.

Die vorgestellten Ergebnisse bestätigen die eingangs erwähnte Feststellung, daß die Regulation der Proliferation ein so wichtiger Vorgang für den Organismus ist, daß sie auf mehreren Ebenen erfolgt. Die Blockierung der trans-aktivierenden Funktion des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Glucocorticoide, gezeigt am Beispiel der Repression des für die Proliferation wichtigen Kollagenase-I Gens, ist eine dieser Ebenen. Sie scheint aufgrund der Wirkung bei besonders niedrigen Cortisol-Konzentrationen und aufgrund der pleiotropen Rolle von AP-1 von besonderer Bedeutung zu sein.

Literatur:

- Adler, S., Waterman, M. L., He, X., and Rosenfeld, M. G. (1988). Steroid receptor-mediated inhibition of rat prolactin gene expression does not require the receptor DNA-binding domain. *Cell* 52, 685-695.
- Agarwal, M. K., Hainque, B., Moustaid, N., and Lazer, G. (1987). Glucocorticoid antagonists. *FEBS Letters* 217, 221-226.
- Akerblom, I. E., Slater, E. P., Beato, M., Baxter, J. D., and Mellon, P. L. (1988). Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science* 241, 350-353.
- Allison, A. C. (1988). Immunopathogenic Mechanisms of Arthritis. Goodacre, J. & Diek, W.C. (Eds.), (MTP, Boston), 211-245.
- Angel, P., Pötting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Schorpp, M., and Herrlich, P. (1986). Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1760-1766.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., and 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. J., Jonat, C., Herrlich, P., and 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., and Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332, 166-171.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., and Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875-885.
- Arad, G., and Kulka, R. G. (1978). Effects of glutamine, methionine sulfone and dexamethasone on rates of synthesis of glutamine synthetase in cultured hepatoma cells. *BBA* 544, 153-162.
- Bailly, A., LePage, C., Rauch, M., and Milgrom, E. (1986). Sequence-specific DNA binding of the progesterone receptor to the uteroglobin gene: Effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation. *EMBO J.* 5, 3235-3241.

- Barberis, A., Superti-Furga, G., and Busslinger, M. (1987). Mutually exclusive interactions of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter. *Cell* 50, 347-359.
- Bauer, E. A., Kronberger, A., Valle, K.-J., Jeffrey, J. J., and Eisen, A. Z. (1985). Glucocorticoid modulation of collagenase expression in human skin fibroblast cultures. Evidence for pre-translational inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 825, 227-235.
- Baxter, J. D., and Forsham, P. H. (1972). Tissue effects of glucocorticoids. *The American Journal of Medicine* 53, 573-589.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.
- Belman, S., and Troll, W. (1972). The inhibition of croton oil-promoted mouse skin tumorigenesis by steroid hormones. *Cancer Res.* 32, 450.
- Benoist, C., and Chambon, P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* 290, 304-310.
- Berk, A. J., and Sharp, P. A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNA's by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 12, 721-732.
- Beutler, B., Krochin, N., Milsark, I. W., Luedke, C., and Cerami, A. (1986). Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232, 977-980.
- Blau, H. M., Chiu, C.-P., and Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32, 1171-1180.
- Boulet, A. M., Erwin, C. R., and Rutter, W. J. (1986). Cell-specific enhancers in the rat exocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3599-3603.
- Boutwell, R. K. (1964). Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 4, 207-250.
- Brandon, D. D., Markwick, A. J., Chrousos, G. P., and Loriaux, D. L. (1989). Glucocorticoid resistance in humans and nonhuman primates. *Cancer Res.* 49, 2202-2213.
- Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., and Karin, M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature* 337, 661-663.
- Brinckerhoff, C. E., Plucinska, I. M., Sheldon, L. A., and O'Connor, G. T. (1986). Half-life of synovial cell collagenase mRNA is modulated by phorbol myristate

- acetate but not by all-trans-retinoic acid or dexamethasone. *Biochemistry* 25, 6378-6384.
- Buchman, A. R., Burnett, L., and Berg, P. (1980). The SV40 nucleotide sequence. In: "DNA tumor viruses". Tooze, J. (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory 799-829.
- Bunning, R. A. D., Murphy, G., Kumar, S., Phillips, P., and Reynolds, J. J. (1984). Metalloproteinase inhibitors from bovine cartilage and body fluids. *Eur. J. Biochem.* 139, 75-80.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M., and Herrlich, P. (1988). Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* 3, 301-311.
- Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P.-E., Wrangé, Ö., Bergman, T., Gustafsson, J.-A., and Jörnwall, H. (1987). Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 4437-4440.
- Cato, A. C. B., Miksicek, R., Schütz, G., Arnemann, J., and Beato, M. (1986). The hormone regulatory element of mouse mammary tumour virus mediates progesterone induction. *EMBO J.* 5, 2237-2240.
- Cato, A. C. B., Skroch, P., Weinmann, J., Butkeraitis, P., and Ponta, H. (1988). DNA sequences outside the receptor-binding sites differentially modulate the responsiveness of the mouse mammary tumour virus promoter to various steroid hormones. *EMBO J.* 7, 1403-1410.
- Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.
- Chalepakis, G., Arnemann, J., Slater, E., Brüller, H.-J., Gross, B., and Beato, M. (1988). Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Cell* 53, 371-382.
- Chandler, V. L., Maler, B. A., and Yamamoto, K. R. (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell* 33, 489-499.
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., and Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541-552.
- Coffino, P. (1981). Hormonal regulation of cloned genes. *Nature* 292, 492-493.

- Cohen, R. B., Sheffery, M., and Kim, C. G. (1986). Partial purification of a nuclear protein that binds to the CCAAT box of the mouse α 1-globin gene. *Mol. Cell Biol.* 6, 821-832.
- Crompton, M. R., Moss, S. E., and Crumpton, M. J. (1988). Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* 55, 1-3.
- Crook, R. B., Louie, M., Deuel, T. F., and Tomkins, G. M. (1978). Regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in hepatoma tissue culture cells. *J. Biol. Chem.* 253, 6125-6131.
- Curran, T., and Franza Jr., B. R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- Darnell, J. E. J. (1982). Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. *Nature* 297, 365-371.
- Davison, B. L., Egly, J.-M., Mulvihill, E. R., and Chambon, P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eucaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* 301, 680-686.
- Denhardt, D. T., Craig, A. M., and Smith, J. H. (1989). Regulation of gene expression by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. In: "Genes and signal transduction in multistage carcinogenesis". Nancy H. Colburn (Ed.), Marcel Decker Inc., New York-Basel 167-189.
- Doppler, W., Groner, B., and Ball, R. K. (1989). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat β -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 104-108.
- Dynan, W. S., and Tjian, R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316, 774-778.
- Dzarlieva, R., and Fusenig, N. (1982). Tumor promoter 12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate enhances sister chromatid exchanges and numerical and structural chromosome aberrations in primary mouse epidermal cultures. *Cancer Lett.* 16, 7.
- Edlund, T., Walker, M. D., Barr, P. J., and Rutter, W. J. (1985). Cell-specific expression of the rat insulin gene: Evidence for the role of two distinct 5' flanking elements. *Science* 230, 912-916.
- Efstratiadis, A., Posakony, J. W., Maniatis, T., Lawn, R. M., O'Connell, C., Spritz, R. A., DeRiel, J. K., Forget, B. G., Weissman, S. M., Slightom, J. L., Blechl, A.

- E., Smithies, O., Baralle, F. E., Shoulders, C. C., and Proudfoot, N. J. (1980). The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* 21, 653-668.
- Emerit, I., Levy, A., and Cerutti, P. (1983). Suppression of tumor promoter phorbolmyristate acetate-induced chromosome breakage by antioxidants and inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Mut. Res.* 110, 327-335.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Everett, R. D., Baty, D., and Chambon, P. (1983). The repeated GC-rich motifs upstream from the TATA box are important elements of the SV40 early promoter. *Nucl. Acids Res.* 11, 2447-2464.
- Ferguson, B., Krippel, B., Andrisani, O., Jones, N., Westphal, H., and Rosenberg, M. (1985). E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2653-2661.
- Flower, R. J., and Blackwell, G. J. (1979). Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278, 456-459.
- Forsburg, S. L., and Guarente, L. (1989). Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* 3, 1166-1178.
- Frisch, S. M., and Ruley, H. E. (1987). Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 262, 16300-16304.
- Gebel, S., Stein, B., König, H., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Risse, G., Neuberg, M., Müller, R., and Herrlich, P. (1989). Two nuclear oncogene products cooperate in the formation of the transcription factor AP-1. In: "Vectors as Tools for the Study of Normal and Abnormal Growth and Differentiation", H. Lother, (Ed.), Springer, Berlin in press.
- Geisse, S., Scheidreit, C., Westphal, H. M., Hynes, N. E., Groner, B., and Beato, M. (1982). Glucocorticoid receptors recognize DNA sequences in and around murine mammary tumor virus DNA. *EMBO J.* 1, 1613-1619.
- Gillespie, D. A. F., and Eisenman, R. N. (1989). Detection of a Myc-associated protein by chemical cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 9, 865-868.

- Godbout, R., Ingram, R., and Tilghman, S. M. (1986). Multiple regulatory elements in the intergenic region between the α -fetoprotein and albumin genes. *Mol. Cell Biol.* 6, 477-487.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982a). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 2, 1044-1051.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I., and Howard, B. H. (1982b). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6777-6781.
- Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986). Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47, 767-776.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Greenberg, M. E., and Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 433-438.
- Griguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Guarente, L. (1988). UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* 52, 303-305.
- Guertin, M., LaRue, H., Bernier, D., Wrangé, Ö., Chevrette, M., Gingras, M.-C., and Bélanger, L. (1988). Enhancer and promoter elements directing activation and glucocorticoid repression of the α 1-fetoprotein gene in hepatocytes. *Mol. Cell Biol.* 8, 1398-1407.
- Gustafsson, J.-A., Carlstedt-Duke, J., Poellinger, L., Okret, S., Wikström, A.-C., Brönnegård, M., Gillner, M., Dong, Y., Fuxe, K., Cintra, A., Härfstrand, A., and Agnati, L. (1987). Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrine Rev.* 8, 185-234.
- Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E., and Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924.
- Harris Jr., E. D., Welgus, H. G., and Krane, S. M. (1984). Regulation of the mammalian collagenases. *Coll. Rel. Res.* 4, 493-512.

- Hashiba, H., Hosoi, J., Karasawa, M., Yamada, S., Nose, K., and Kuroki, T. (1989). Induction of metallothionein mRNA by tumor promoters in mouse skin and its constitutive expression in papillomas. *Molecular carcinogenesis in press*.
- Hecker, E. (1968). Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and other euphorbiaceae. *Cancer Res.* 28, 2338.
- Hecker, E. (1987). Tumour promoters of the irritant diterpene ester type as risk factors of cancer in man. *Botan. J. Linn. Soc.* 94, 197-219.
- Henderson, D. (1986). Antiprogesterone and antiglucocorticoid activities of some novel 11 β -aryl substituted steroids. In: "Pharmacology and Clinical Uses of Inhibitors of Hormone Secretion and Action". Tindall, B. (Ed.), F&W Paper 10 184-211.
- Herrlich, P., and Ponta, H. (1989). "Nuclear" oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *TIG* 5, 112-116.
- Hoeck, W., Rusconi, S., and Groner, B. (1989). Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 264, 14396-14402.
- Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.
- Hollenberg, S. M., Griguere, V., Segui, P., and Evans, R. M. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* 49, 39-46.
- Hollenberg, S. M., and Evans, R. M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899-906.
- Homa, F. L., Glorioso, J. C., and Levine, M. (1988). A specific 15-bp TATA box promoter element is required for expression of a herpes simplex virus type 1 late gene. *Genes Dev.* 2, 40-53.
- Hynes, N., van Ooyen, A. J. J., Kennedy, N., Herrlich, P., Ponta, H., and Groner, B. (1983). Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid-responsive expression of mouse mammary tumor virus and of an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3637-3641.
- Imagawa, M., Chiu, R., and Karin, M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51, 251-260.

- Imbra, J. R., and Karin, M. (1987). Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1358-1363.
- Jonat, C., Stein, B., Ponta, H., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. (1989). Positive and negative regulation of collagenase gene expression. In: "Proceedings of the Matrix Metalloproteinase Conference". Destin, Florida in press
- Jones, K. A., Yammamoto, K. R., and Tjian, R. (1985). Two distinct transcription factors bind to the HSV Thymidine Kinase promoter in vitro. *Cell* 42, 559-572.
- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J., and Tjian, R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eucaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 48, 79-89.
- Kadonaga, J. T., and Tjian, R. (1986). Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5889-5893.
- Kahn, R. C., Bertolotti, R., Ninio, M., and Weiss, M. C. (1981). Short-lived cytoplasmic regulators of gene expression in cell cybrids. *Nature* 290, 717-720.
- Kaina, B., Stein, B., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., and Herrlich, P. (1989). An update of the mammalian UV response: gene regulation and induction of a protective function. In: "DNA Repair Mechanism and their Biological Implications in Mammalian Cells", M. W. Lambert et.al., (Eds.), Plenum Publ. Corp. New York in press.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R. I., Krauter, P., Westphal, H. M., and Beato, M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308, 513-519.
- Karin, M. (1985). Metallothioneins : Proteins in search of function. *Cell* 41, 9-10.
- Karin, M., Haslinger, A., Heguy, A., Dietlin, T., and Cooke, T. (1987). Metal responsive elements act as positive modulators of human metallothionein-IIA enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* 7, 606- 613.
- Karin, M., and Herrlich, P. (1989). Cis- and trans-acting genetic elements responsible for induction of specific genes by tumor promoters, serum factors, and stresses. In: "Genes and signal transduction in multistage carcinogenesis", Nancy H. Colburn (Ed.), Marcel Decker Inc., New York-Basel 415-440.
- Kawai, S., and Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1172-1174.

- Killary, A. M., und Fournier, R. E. K. (1984). A genetic analysis of extinction: Trans-dominant loci regulate expression of liver-specific traits in hepatoma hybrid cells. *Cell* 38, 523-534.
- Kinsella, A. R., und Radman, M. (1978). Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: Relevance to mechanisms of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 6149-6153.
- Kouzarides, T., und Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336, 646-651.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J., und Herrlich, P. (1989). Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* 8, 2559-2566.
- Kruijer, W., Cooper, J. A., Hunter, T., und Verma, I. M. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* 312, 711-716.
- Kumar, V., und Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55, 145-156.
- Kyhse-Andersen, H. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lazar, G., und Agarwal, M. K. (1986). Physiological action and receptor binding of a newly synthesized and novel antigluocorticoid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 134, 44-50.
- Lee, S. W., Tsou, A.-P., Chan, H., Thomas, J., Petrie, K., Eugui, E. M., und Allison, A. C. (1988). Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1b gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1204-1208.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., und Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325, 368-372.
- Lee, W., Mitchell, P., und Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49, 741-752.

- Lillie, J. W., and Green, M. R. (1989). Transcription activation by the adenovirus E1A protein. *Nature* 338, 39-44.
- Liotta, L. A. (1986). Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 46, 1-7.
- Litwack, G. (1988). The glucocorticoid receptor at the protein level. *Cancer Res.* 48, 2636-2640.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luckow, B., and Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* 15, 5490.
- Mai, S., Stein, B., van den Berg, S., Kaina, B., Lücke-Huhle, C., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Krämer, M., Gebel, S., und Herrlich, P. (1989). Mechanisms of the UV response in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* in press
- Majors, J., and Varmus, H. E. (1983). A small region of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat confers glucocorticoid hormone regulation on a linked heterologous gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5866-5870.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory
- McKnight, S. L., Kingsbury, R. C., Spence, A., and Smith, M. (1984). The distal transcription signals of the herpesvirus tk gene share a common hexanucleotide control sequence. *Cell* 37, 253-262.
- McKnight, S., and Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46, 795-805.
- McKnight, J. L. C., Kristie, T. M., and Roizman, B. (1987). Binding of the virion protein mediating a gene induction in herpes simplex virus 1-infected cells to its cis site requires cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7061-7065.
- Medcalf, R. L., Richards, R. I., Crawford, R. J., and Hamilton, J. A. (1986). Suppression of urokinase-type plasminogen activator mRNA levels in human fibrosarcoma cells and synovial fibroblasts by anti-inflammatory glucocorticoids. *EMBO J.* 5, 2217-2222.
- Mevel-Ninio, M., and Weiss, M. C. (1981). Immunofluorescence analysis of the time course of extinction, reexpression, and activation of albumin production in rat

- hepatoma-mouse fibroblast heterokaryons and hybrids. *J. Cell Biol.* 90, 339-350.
- Meyer, M.-E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.-T., Tasset, D., and Chambon, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57, 433-442.
- Mitchell, P. J., and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Mondal, S., Brankow, D. W., and Heidelberger, C. (1976). Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.* 36, 2254-2260.
- Mordacq, J. C., and Linzer, D. I. H. (1989). Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes Dev.* 3, 760-769.
- Murphy, G., and Reynolds, J. J. (1985). Progress towards understanding the resorption of connective tissues. *BioEssays* 2, 55-60.
- Murphy, G., Crockett, M. I., Stephens, P. E., Smith, B. J., and Docherty, A. J. P. (1987). Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 248, 265-268.
- Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312, 716-720.
- Müller, M. M., Gerster, T., and Schaffner, W. (1988). Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur. J. Biochem.* 176, 485-495.
- Myers, R. M., Rio, D. C., Robbins, A. K., and Tjian, R. (1981). SV40 gene expression is modulated by the cooperative binding of T-antigen to DNA. *Cell* 25, 373-384.
- Nomiyama, H., Fromental, C., Xiao, J. H., and Chambon, P. (1987). Cell-specific activity of the constituent elements of the simian virus 40 enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7881-7885.
- Offringa, R., Smits, A. M. M., Houweling, A., Bos, J. L., and van der Eb, A. J. (1988). Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucl. Acids Res.* 16, 10973-10984.

- Offringa, R., Gebel, S., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A., und Herrlich, P. (1989). A novel function of the transforming domain of E1A : repression of AP-1 activity. *Cell*, in press
- Oro, A. E., Hollenberg, S. M., und Evans, R. M. (1988). Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor- β -galactosidase fusion protein. *Cell* 55, 1109-1114.
- Ott, M.-O., Sperling, L., Herbomel, P., Yaniv, M., und Weiss, M. C. (1984). Tissue-specific expression is conferred by a sequence from the 5' end of the rat albumin gene. *EMBO J.* 3, 2505-2510.
- Pabo, C. O., und Sauer, R. T. (1984). Protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 293-321.
- Parker, C. S., und Topol, J. (1984). A drosophila RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell* 36, 357-369.
- Pfahl, M. (1982). Specific binding of the glucocorticoid-receptor complex to the mouse mammary tumor proviral promoter region. *Cell* 31, 475-482.
- Piette, J., Kryszke, M.-H., und Yaniv, M. (1985). Specific interaction of cellular factors with the B enhancer of polyoma virus. *EMBO J.* 4, 2675-2685.
- 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. U.S.A.* 82, 1020-1024.
- Preston, C. M., Frame, M. C., und Campbell, M. E. M. (1988). A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory DNA sequence. *Cell* 52, 425-434.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-689.
- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U., und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucl. Acids Res.* 15, 1643-1659.
- Ringold, G. M., Yamamoto, K. R., Tomkins, G. M., Bishop, J. M., und Varmus, H. E. (1975). Dexamethasone-mediated induction of mouse mammary tumor virus RNA: a system for studying glucocorticoid action. *Cell* 6, 299-305.

- Rio, D., Robbins, A., Myers, R., and Tjian, R. (1980). Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5706-5710.
- Rodriguez-Pena, A., and Rozengurt, E. (1984). Disappearance of Ca²⁺-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells. *BBRC* 120, 1053-1059.
- Rosen, F., Harding, H. R., Milholland, R. J., and Nichol, C. A. (1963). Glucocorticoids and transaminase activity. *J. Biol. Chem.* 238, 3725-3729.
- Rusconi, S., and Yamamoto, K. R. (1987). Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 1309-1315.
- Ryffel, G. U., Kugler, W., Wagner, U., and Kaling, M. (1989). Liver cell specific gene transcription in vitro: the promoter elements HP1 and TATA box are necessary and sufficient to generate a liver-specific promoter. *Nucl. Acids Res.* 17, 939-953.
- Sakai, D. D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-A., Rottman, F. M., and Yamamoto, K. R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.* 2, 1144-1154.
- Sassone-Corsi, P., Wildeman, A., and Chambon, P. (1985). A trans-acting factor is responsible for the simian virus 40 enhancer activity in vitro. *Nature* 313, 458-463.
- Sassone-Corsi, P., and Borelli, E. (1986). Transcriptional regulation by trans-acting factors. *Trends Genet.* 2, 215-219.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W. W., Kamps, M., and Verma, I. M. (1988). Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* 54, 553-560.
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H. M., and Beato, M. (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature* 30, 749-752.
- Schlessinger, J., Shechter, Y., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1978). Direct visualization of binding, aggregation, and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2659-2663.

- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J., und Ponta, H. (1988a). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54, 325-334.
- Schönthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., und Herrlich, P. (1988b). Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 53, 779-787.
- Schönthal, A., Büscher, M., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M., und Herrlich, P. (1989). The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* 4, 629-636.
- Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., und Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242, 1418-1420.
- Schürmann, M., Neuberg, M., Hunter, J. B., Jenuwein, T., Ryseck, R.-P., Bravo, R., und Müller, R. (1989). The leucine repeat motif in fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell* 56, 507-516.
- Scribner, J. D., und Slaga, T. J. (1973). Multiple effects of dexamethasone on protein synthesis and hyperplasia caused by a tumor promoter. *Cancer Res.* 33, 542.
- Serfling, E., Jasin, M., und Schaffner, W. (1985). Enhancers and eucaryotic gene transcription. *Trends Genet.* 1, 224-230.
- Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W., und Rusconi, S. (1988). Metal binding "finger" structures in the glucocorticoid receptor defined by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* 7, 2503-2508.
- Sibley, C. H., und Tomkins, G. M. (1974). Isolation of lymphoma cell variants resistant to killing by glucocorticoids. *Cell* 2, 213-220.
- Simon, M. C., Fisch, T. M., Benecke, B. J., Nevins, J. R., und Heintz, N. (1988). Definition of multiple, functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation. *Cell* 52, 723-729.
- Simons Jr., S. S., Mercier, L., Miller, N. R., Miller, P. A., Oshima, H., Sistare, F. D., Thompson, E. B., Wasner, G., und Yen, P. M. (1989). Differential modulation of gene induction by glucocorticoids and antiglucocorticoids in rat hepatoma tissue culture cells. *Cancer Res.* 49, 2244-2252.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., und Sharp, P. A. (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319, 154-156.

- Skroch, P. (1987). Promotionsarbeit . Universität Karlsruhe, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
- Soffer, L. J., Dorfman, R. I., und Gabilove, J. L. (1961). In: "The Human Adrenal Gland". Lea & Febiger, Philadelphia.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Büscher, M., Ponta, H., und Herrlich, P. (1988). The UV induced signal transduction pathway to specific genes. In: "Mechanisms and Consequences of DNA Damage Processing", E. Friedberg und P. Hanawalt (Eds.), Alan R. Liss Inc. New York 557-570.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M., und Herrlich, P. (1989a). UV induced DNA damage is an intermediate in the UV induced expression of HIV-1, collagenase, c-fos and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5169-5181.
- Stein, B., Gebel, S., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P., und Ponta, H. (1989b). The phorbol ester responsive sequences in the collagenase and the c-jun promoter bind different members of the transcription factor family AP-1. In: "Advances in Applied Biotechnology Series `Gene Regulation, Oncogenesis, and AIDS`". Portfolio Publ. Company, The Woodlands, Texas in press,
- Steinberg, R. A., Levinson, B. B., und Tomkins, G. M. (1975). Kinetics of steroid induction and deinduction of tyrosine aminotransferase synthesis in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2007-2011.
- Strähle, U., Klock, G., und Schütz, G. (1987). A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7871-7875.
- Stricklin, G. P., und Welgus, H. G. (1983). Human skin fibroblasts collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 12252-12258.
- Takeda, Y., Ohlendorf, D. H., Anderson, W. F., und Matthews, B. W. (1983). DNA-binding proteins. *Science* 221, 1020-1026.
- Topper, Y. J., und Freeman, C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the development biology of the mammary gland. *Physiol Rev.* 60, 1049-1106.
- Tsai, S. Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N. L., Dahlman, K., Gustafsson, J.-A., Tsai, M.-J., und O'Malley, B. W. (1988). Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 55, 361-369.

- Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B. W. (1989). Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 57, 443-448.
- Vassalli, J. D., Hamilton, J., and Reich, E. (1976). Macrophage plasminogen activator: modulation of enzyme production by anti-inflammatory steroids, mitotic inhibitors, and cyclic nucleotides. *Cell* 8, 271-281.
- Vater, C. A., Nagase, H., and Harris Jr., E. D. (1983). Purification of an endogenous activator of procollagenase from rabbit synovial fibroblast culture medium. *J. Biol. Chem.* 258, 9374-9382.
- Viaje, A., Slaga, T. J., Wigler, M., and Weinstein, I. B. (1977). Effects of antiinflammatory agents on mouse skin tumor promotion, epidermal DNA synthesis, phorbol ester-induced cellular proliferation, and production of plasminogen activator. *Cancer Res.* 37, 1530-1536.
- Vogt, P. K., and Bos, T. J. (1989). Jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* in press,
- Walker, M. D., Edlund, T., Boulet, A. M., and Rutter, W. J. (1983). Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes. *Nature* 306, 557-561.
- Weinstein, I. B., Wigler, M., and Pietropaolo, C. (1977). The action of tumor-promoting agents in cell culture. In: "Origins of human cancer, Book B Mechanisms of carcinogenesis", H. H. Hiatt, J. D. Watson, J. A. Winsten (Eds.), Cold Spring Harbor Conferences On Cell Proliferation 4, 751-772.
- Werb, Z., Foley, R., and Munck, A. (1978). Glucocorticoid receptors and glucocorticoid-sensitive secretion of neutral proteinases in a macrophage line. *J. Immunol.* 121, 115-121.
- Whitham, S. E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Smith, B. J., Lyons, A., Harris, T. J. R., Reynolds, J. J., Herrlich, P., and Docherty, A. J. P. (1986). Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem J.* 240, 913-916.
- Wigler, M., Ford, J. P., and Weinstein, I. B. (1975). Glucocorticoid inhibition of the fibrinolytic activity of tumor cells. In: "Proteases and biological control", E. Reich et al. (Eds.), Cold Spring Harbor, 849.
- Willmann, T., and Beato, M. (1986). Steroid-free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumour virus DNA. *Nature* 324, 688-691.

- Wrangé, Ö., Eriksson, P., and Perlmann, T. (1989). The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J. Biol. Chem.* 264, 5253-5259.
- Wu, K. C., and Pfahl, M. (1988). Variable responsiveness of hormone-inducible hybrid genes in different cell lines. *Mol. Endocrinol.* 1294-1301.
- Young, H. A., Scolnick, E. M., and Parks, W. P. (1975). Glucocorticoid-receptor interaction and induction of murine mammary tumor virus. *J. Biol. Chem.* 250, 3337-3343.
- Zoller, M., and Smith, M. (1983). Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods in Enzymology* 100, 468-500.