



KfK 4937  
September 1991

**Das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$   
und der basische  
Fibroblasten-Wachstumsfaktor:  
Zwei neue Komponenten der  
UV-induzierten Signalkette  
in Säugerzellen**

M. Krämer  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik  
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4937

**Das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  und  
der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor:  
Zwei neue Komponenten  
der UV-induzierten Signalkette in Säugerzellen.**

Marcus Krämer

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

## Zusammenfassung

UV-Strahlung gehört zu den Umwelteinflüssen, die für die menschliche Population von größter Bedeutung sind. Die Häufigkeit einer Reihe von Krebserkrankungen der Haut korreliert mit der eingestrahlten UV-Dosis, deren wirksamste Komponente in diesem Zusammenhang die kurzwellige UV-Strahlung (UV-C) ist. In Säugerzellen kommt es nach UV-Bestrahlung zur transkriptionellen Aktivierung von Genen, zur Amplifikation von Genen, zur Erhöhung der Mutationsrate und zur Erhöhung der Zahl von chromosomalen Aberrationen. UV-Bestrahlung aktiviert beispielsweise die Transkription der Protooncogene c-jun und c-fos, des Metallothionein II A-Gens, derjenigen Gene, die für die extrazellulären Proteasen Kollagenase und Plasminogenaktivator kodieren und des HIV-1 Provirus. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß UV-bestrahlte Zellen den Faktor EPIF (=extrazellulärer Proteinsynthese induzierender Faktor) sezernieren, der ein ähnliches genetisches Programm induziert wie UV-Bestrahlung selbst. Dieser Faktor erhöht die Mutationsfrequenz, aktiviert die HIV-1 Transkription und führt zu einer verstärkten Synthese des Kollagenase Proteins in unbestrahlten Zellen.

In der hier vorliegenden Arbeit war es möglich, drei Kollagenase induzierende Aktivitäten des UV-induzierten Faktors EPIF mittels Säulenchromatographie an Heparin-Sepharose voneinander zu trennen. Zwei dieser Aktivitäten konnten als das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und eine als der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor oder immunologisch verwandte Proteine identifiziert werden. UV-Bestrahlung führt a.) zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$  mRNA, die nach etwa 8 Stunden ein Maximum erreicht, b.) zu einer verstärkten Synthese des 31kD IL-1 $\alpha$  Proteins im Cytoplasma, c.) zu einer verstärkten Sekretion des neu-synthetisierten 17kD IL-1 $\alpha$  Proteins und d.) zu einer erhöhten membran-gebundenen IL-1 $\alpha$  Aktivität. Die bFGF mRNA akkumuliert unmittelbar nach der UV-Bestrahlung und erreicht eine Stunde nach der Bestrahlung ihr Maximum. Die erhöhte Menge an bFGF mRNA führt zu einer verstärkten Synthese des bFGF Proteins. Ferner konnte in der Arbeit gezeigt werden, daß mit IL-1 $\alpha$  auch die EPIF-Komponente identifiziert worden war, die für die Aktivierung der HIV-1 Transkription durch EPIF verantwortlich ist.

In der hier vorliegenden Arbeit sind mit dem Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  und dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor zwei weitere Bestandteile der UV-induzierten Signalkette identifiziert worden, die bei der zellulären Antwort auf UV-induzierten DNA-Schaden (z.B. bei der Ausbreitung des Signals auf Zellen, die nicht direkt von UV erreicht werden) von großer Bedeutung sein könnten.

## Abstract

### **The Cytokine Interleukin-1 $\alpha$ and the Basic Fibroblast Growth Factor: Two New Components of the UV-induced Signal Transduction Chain in Mammalian Cells**

Exposure to ultraviolet-irradiation (UV) is a major environmental factor for the human population. Skin cancer frequency correlates directly with exposure to ultraviolet-irradiation, especially in the short wave range (UV-C). Mammalian cells react to UV by the activation of specific genes, the amplification of genes as well as the appearance of mutations and chromosomal aberrations. The UV-induced genes include the protooncogenes c-jun and c-fos, the metallothionein II A gene, the genes coding for the extracellular proteases collagenase and plasminogen activator and the proviral HIV-1 gene. We have shown previously that UV-irradiation of cells induces the release of the factor EPIF (=extracellular protein synthesis inducing factor) into the culture medium, which induces a similar genetic response as UV itself. The UV-induced factor causes mutations, activates HIV-1 transcription and induces the synthesis of collagenase in nonirradiated cells.

Column chromatography on heparin-sepharose of the UV-induced factor resolved three collagenase inducing activities. Two of these activities were identified as the cytokine interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and one as the basic fibroblast growth factor (bFGF) or immunologically related proteins. UV-irradiation induces a.) the accumulation of IL-1 $\alpha$  mRNA, which is maximal at 8 hours after irradiation, b.) the enhanced synthesis of the 31kD IL-1 $\alpha$  protein in the cytoplasm, c.) the enhanced secretion of the newly synthesized 17kD IL-1 $\alpha$  protein and d.) the membrane-bound IL-1 $\alpha$  activity. The accumulation of bFGF mRNA starts immediately after UV and is maximal at around 1 hour after UV. It could also be demonstrated that IL-1 $\alpha$  is the component of EPIF, which is responsible for the activation of HIV-1 transcription.

In the present work two additional components of the UV-induced signal transduction chain, namely the cytokine interleukin-1 $\alpha$  and the basic fibroblast growth factor, have been identified. These two factors could play an important role in the cellular response to UV-induced DNA-damage.

## Abkürzungen:

|                  |  |
|------------------|--|
| Abb.             | Abbildung  |
| An               | Anisomycin   |
| AP-1             | Aktivator-Protein-1                                  |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat                               |
| aFGF             | acidic fibroblast growth factor                      |
| bFGF             | basic fibroblast growth factor                       |
| bp               | Basenpaare   |
| Bq               | Becquerel  |
| BSA              | Rinderserumalbumin                                   |
| CAT              | Chloramphenicolacetyltransferase                     |
| c-fos            | zelluläres Fos-Gen                                   |
| Ci               | Curie  |
| c-jun            | zelluläres Jun-Gen                                   |
| cpm              | counts per minute                                    |
| DC               | Dünnschichtchromatographie                           |
| dCTP             | Desoxycytidin-5'-triphosphat                         |
| DEAE-            | Diethylaminoethyl-                                   |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle Medium                     |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                     |
| ddNTPs           | Didesoxynukleotidtriphosphate                        |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                               |
| DTE              | Dithioerythriol                                      |
| DTT              | Dithiothreitol                                       |
| E <sub>260</sub> | Extinktion bei 260nm                                 |
| EDTA             | Ethyldiamintetraessigsäure                           |
| EPIF             | Extrazellulärer Proteinsynthese induzierender Faktor |
| EtOH             | Ethanol  |
| FCS              | Fötales Kälberserum                                  |
| FPLC             | Fast Protein Liquid Chromatography                   |
| g                | Erdbeschleunigung (9.81m/s <sup>2</sup> )            |
| G418             | Geneticin-Sulfat                                     |
| HEPES            | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure      |
| HPLC             | High Performance Liquid Chromatography               |
| IL-1 $\alpha$    | Interleukin-1 $\alpha$                               |
| IL-1 $\beta$     | Interleukin-1 $\beta$                                |
| IL-6             | Interleukin-6  |
| kb               | 1000 Basenpaare                                      |
| kD               | 1000 Dalton  |
| Ko-Med           | Kontroll-Medium                                      |
| LTR              | long terminal repeat                                 |
| M                | Molar  |
| Ma               | Molekulargewichtsmarker                              |

|          |  |
|----------|--|
| MES      | 2-Morpholinoethansulfonsäure                 |
| min      | Minute                                       |
| NaAcetat | Natriumacetat                                |
| NF-kB    | Nuklearer Faktor Kappa B                     |
| NFB      | Normalfibroblasten                           |
| NP-40    | Nonidet P-40                                 |
| NRS      | normales Kaninchenserum                      |
| PAGE     | Polyacrylamid-Gelelektrophorese              |
| PDGF     | platelet derived growth factor               |
| PMSF     | Phenylmethylsulfonylfluorid                  |
| PPO      | Diphenyloxazol                               |
| PS       | Petrischale                                  |
| PVP      | Polyvinylpyrrolidon                          |
| RNA      | Ribonukleinsäure                             |
| rRNA     | ribosomale RNA                               |
| RT       | Raumtemperatur                               |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat                         |
| sec      | Sekunde                                      |
| SV 40    | Simian Virus 40                              |
| TCA      | Trichloressigsäure                           |
| TCSF     | tumour cell collagenase stimulatory factor   |
| TEMED    | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin           |
| tk       | Thymidinkinase                               |
| TNF      | tumour necrosis factor                       |
| TPA      | 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat          |
| TRE      | TPA-Induktion vermittelndes DNA-Element      |
| Tris     | Tris-hydroxymethyl-aminomethan               |
| tRNA     | transfer RNA                                 |
| U/min    | Umdrehungen pro Minute                       |
| U/ml     | Enzymeinheiten pro ml                        |
| URE      | UV-Induktion vermittelndes DNA-Element       |
| UV       | ultraviolette Strahlung                      |
| UV-Med   | UV-Medium                                    |
| V        | Volt   |
| XPA      | Xeroderma Pigmentosum, Komplementationsgr. A |



# Inhaltsverzeichnis

**Zusammenfassung**

**Abstract**

**Abkürzungen**

**Inhaltsverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| <b>Einleitung</b>   | 1  |
| <b>Material und Methoden</b>                              | 7  |
| <b>Material</b>   | 7  |
| Bezugsquellen   | 7  |
| Bakterien und Zellen                                      | 9  |
| Kulturmedien  | 9  |
| Antikörper  | 10 |
| Wachstumsfaktoren   | 12 |
| cDNA-Proben   | 12 |
| Bestrahlungsquelle  | 12 |
| <b>Methoden</b>   | 13 |
| 1. Behandlung von Nukleinsäuren                           | 13 |
| Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäuren        | 13 |
| Phenol/Chloroform-Extraktion                              | 13 |
| Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen<br>Lösungen | 13 |
| 2. Transformation von Bakterien                           | 14 |
| Herstellung kompetenter Bakterien                         | 14 |
| Transformation von kompetenten Bakterien                  | 14 |
| Herstellung von Selektiv-Agarplatten                      | 15 |
| 3. DNA-Präparation  | 15 |
| Bakterien-Wachstum  | 15 |
| Plasmid-DNA-Präparation                                   | 15 |
| Mini-Plasmid-DNA-Präparation                              | 16 |
| 4. Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen              | 17 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.  | Markierung von DNA mit Radionukleotiden   | 17 |
|     | Gelfiltration über Sephadex G-50  | 17 |
| 6.  | Agarose-Gelelektrophorese von DNA   | 18 |
| 7.  | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen  | 18 |
| 8.  | PolyA <sup>+</sup> -RNA-Präparation   | 19 |
| 9.  | Agarose-Gelelektrophorese von RNA   | 20 |
| 10. | Northern-Blot und Hybridisierung  | 20 |
| 11. | Transiente Transfektion   | 22 |
| 12. | CAT-Assay und Proteinbestimmung nach Lowry  | 22 |
| 13. | Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen  | 24 |
| 14. | Herstellen von Ko-Medium und UV-Medium  | 24 |
| 15. | Behandlung von Zellen mit Induktoren  | 25 |
| 16. | Präparation von Cytoplasmaextrakt   | 25 |
| 17. | Membranpräparation und Behandlung der Membranen<br>mit Trypsin und Antikörpern              | 26 |
| 18. | Konzentration von Proteinlösungen   | 27 |
|     | TCA-Fällung   | 27 |
|     | Ammoniumsulfat-Fällung  | 27 |
| 19. | Proteingele   | 27 |
|     | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen   | 27 |
|     | Silber-Färbung von Proteingelen   | 28 |
| 20. | <sup>35</sup> S-Markierung von Proteinen und Test auf Kollagenase<br>induzierende Aktivität | 29 |
| 21. | Immunpräzipitation  | 30 |
| 22. | Western-Analyse   | 31 |
| 23. | Renaturierung   | 32 |

|   |    |
|---|----|
| 24. Proteinreinigung  | 33 |
| Q-Sepharose Säule   | 33 |
| Heparin-Sepharose Säule   | 34 |
| 25. Inkubation der Säulenfraktionen mit Antikörpern   | 34 |
| <b>Ergebnisse</b>   | 36 |
| 1. UV-Bestrahlung führt zur Sekretion des extrazellulären Proteinsynthese induzierenden Faktors "EPIF"            | 36 |
| 1.1. EPIF-Aktivität läßt sich auch im Medium UV-bestrahlter menschlicher Zellen epithelialen Ursprungs nachweisen | 36 |
| 1.2. Nachweis der Existenz EPIF's mit Hilfe von Kokultivierungsexperimenten                                       | 38 |
| 2. Suramin beeinflusst die durch UV-Bestrahlung induzierte Signalkette  | 40 |
| 2.1. Suramin hemmt die EPIF-Induktion der Kollagenase   | 40 |
| 2.2. Suramin hemmt die UV-Antwort der bestrahlten Zelle   | 42 |
| 3. Vorversuche zur EPIF-Reinigung   | 44 |
| 3.1. Herstellung von EPIF-enthaltendem Kulturmedium   | 45 |
| 3.2. Nachweis der Kollagenase induzierenden Aktivität von EPIF  | 45 |
| 4. Reinigung der Kollagenase induzierenden Aktivität des extrazellulären Proteinsynthese induzierenden Faktors    | 47 |
| 4.1. Eine Kollagenase induzierende Aktivität bindet an einen Anionenaustauscher                                   | 47 |
| 4.2. Mit einer Heparin-Sepharose-Säule lassen sich drei Kollagenase induzierende Aktivitäten voneinander trennen  | 49 |
| 5. Antikörper gegen Interleukin-1 $\alpha$ hemmen zwei der Kollagenase induzierenden Aktivitäten                  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| 6. Charakterisierung der Kollagenase induzierenden Hochsalzfraktion   | 54 |
| 6.1. Antikörper gegen verschiedene Kollagenase induzierende Proteine hemmen die Kollagenase induzierende Aktivität nicht          | 54 |
| 6.2. Suramin hemmt die Kollagenase induzierende Aktivität   | 56 |
| 6.3. Die Kollagenase induzierende Aktivität hat ein Molekulargewicht, das unter 31kD liegt  | 57 |
| 7. Antikörper gegen den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor hemmen die Kollagenase induzierende Aktivität der Hochsalzfraktion | 59 |
| 8. UV-Induktion der Interleukin-1 $\alpha$ Synthese   | 61 |
| 8.1. UV-Bestrahlung führt zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$ mRNA  | 62 |
| 8.2. UV-Bestrahlung führt zur vermehrten Neusynthese des IL-1 $\alpha$ Proteins   | 63 |
| 8.3. IL-1 $\alpha$ ist nach UV-Bestrahlung vermehrt im Kulturmedium nachweisbar   | 65 |
| 8.3.1. Die Menge an neusynthetisiertem IL-1 $\alpha$ im Kulturmedium nimmt nach UV-Bestrahlung zu                                 | 65 |
| 8.3.2. Die Gesamtmenge an IL-1 $\alpha$ im Kulturmedium nimmt nach UV-Bestrahlung zu  | 66 |
| 8.4. Nach UV-Bestrahlung ist die Kollagenase induzierende Aktivität von membrangebundenem IL-1 $\alpha$ verstärkt nachweisbar     | 68 |
| 9. UV-Induktion des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors   | 71 |
| 9.1. UV-Bestrahlung führt zur Akkumulation der bFGF mRNA  | 72 |

|  |    |
|--|----|
| 9.2. UV-Bestrahlung führt zur vermehrten Neusynthese des bFGF Proteins   | 73 |
| 10. IL-1 $\alpha$ ist möglicherweise für die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität eines HIV-1 Promoter Konstruktes durch EPIF-Medium verantwortlich | 75 |
| <b>Diskussion</b>  | 79 |
| EPIF-Reinigung   | 79 |
| UV-Induktion des Cytokins Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )  | 81 |
| UV-Induktion des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF)  | 86 |
| Sind IL-1 $\alpha$ und bFGF an der UV-induzierten Aktivierung des c-fos-Gens und des Kollagenase-Gens in der bestrahlten Zelle beteiligt?                | 90 |
| Ausblick   | 96 |
| <b>Literaturverzeichnis</b>  | 98 |

# Einleitung

Ultraviolette Strahlung (UV) ist eines der mutagenen Agenzien denen der Mensch ständig ausgesetzt ist. Eine Zunahme des UV-Anteils im Sonnenlicht infolge einer Vergrößerung des Ozonlochs und einer Abnahme der Ozonschicht könnte ein Problem für das Leben auf der Erde werden. UV-Bestrahlung führt erwiesenermaßen zu einer Erhöhung der Zahl von Hautkrebserkrankungen beim Menschen (Scott und Straf, 1977). Dies gilt sowohl für das maligne Melanom, als auch, und zwar verstärkt für die sogenannten "nicht melanomen" Hautkrebsarten, wie das Basalzellkarzinom und das Stachelzellkarzinom (Ruddon, 1987). Die "nicht melanomen" Hautkrebsarten sind einerseits die am häufigsten beim Menschen auftretende Krebserkrankung und andererseits die mit der größten Chance auf Heilung. Es wird oft übersehen, daß Hautkrebs eine der wenigen Krebserkrankungen ist, bei denen ein ätiologisches Agenz, in diesem Fall die UV-Strahlung, eindeutig identifiziert werden konnte. Am deutlichsten zeigt sich der Zusammenhang zwischen UV-Bestrahlung und Hautkrebs bei Patienten mit der autosomal rezessiven Erbkrankheit Xeroderma Pigmentosum (XP). Zellen von Patienten mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementationsgruppe A unterscheiden sich von gesunden Zellen lediglich darin, daß sie UV-induzierte DNA-Schäden nicht reparieren können (Cleaver, 1968, 1969). Neben anderen klinischen Symptomen kommt es bei diesen Patienten zu einer drastisch erhöhten Zahl von Hautkrebserkrankungen in den Bereichen der Haut, die der Sonne ausgesetzt sind (Robbins et al., 1974). Die meisten Patienten entwickeln eine Vielzahl von Hauttumoren, wobei die ersten schon im Kindesalter auftreten. Mehr als die Hälfte der XP-Patienten erkrankt zudem am malignen Melanom, im Vergleich zu nur wenigen Fällen pro 100000 Menschen in der Normalpopulation. Am Beispiel der durch UV-Bestrahlung ausgelösten Hautkrebserkrankungen wird deutlich wie wichtig es ist, zu untersuchen, wie eine Säugerzelle auf UV-Bestrahlung reagiert.

Als Folge der UV-Bestrahlung kommt es in Säugerzellen zu einer ganzen Reihe von genetischen Veränderungen, die unter dem

Begriff der "UV-Antwort" zusammengefaßt werden (Kaina et al., 1989, Herrlich et al., 1986, Mai et al., 1989, Schorpp et al., 1984). Auch in Prokaryonten existiert eine sogenannte "SOS-Antwort" (Little und Mount, 1982), die durch Strahlung und andere DNA-schädigende Agenzien ausgelöst wird. Über den Ablauf der Signalkette bei dieser prokaryontischen SOS-Antwort ist Folgendes bekannt: Durch Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien kommt es in *E. coli* zur Aktivierung des *recA*-Proteins (Little und Mount, 1982, Witkin, 1976, Witkin und Kogama, 1984, Walker, 1985). Dieses Protein spaltet im aktivierten Zustand den *lexA*-Repressor, ein Protein, das die Transkription einiger Gene verhindert; dadurch kommt es zur Transkription der durch *lexA* kontrollierten Gene. Deren Genprodukte sind u.a. Reparaturenzyme, Proteine, die eine Rolle bei der Rekombination spielen und Proteine, die zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenz führen (Yeung et al., 1983, Kato und Shinoura, 1977, Steinborn, 1978, Elledge und Walker, 1983).

Im Rahmen der UV-Antwort von Säugerzellen kommt es zu durchaus vergleichbaren Reaktionen. So kommt es beispielsweise zur Erhöhung der Mutationsrate (Protic-Sablic et al., 1986), zur Erhöhung der Zahl von chromosomalen Aberrationen, zur Vermehrung von Genen (Amplifikation) (Lücke-Huhle und Herrlich, 1986, Lücke-Huhle et al., 1989, Schimke, 1984, Lavi, 1981) und zur Aktivierung von Genen (Büscher et al., 1988, Fornace et al., 1988, Kartasova und van der Putte, 1988, Maltzman und Czyzyk, 1984, Rotem et al., 1987, Miskin und Ben-Ishai, 1981, Stein et al., 1989a, 1989b, 1988, Valerie et al., 1988, Schorpp et al., 1984, Krämer et al., 1990)

Der Teil der UV-Antwort, der zur Aktivierung von Genen führt, ist bisher wohl am eingehendsten untersucht worden. UV-Bestrahlung aktiviert beispielsweise die Protooncogene *c-jun* und *c-fos* (Kaina et al., 1989, Stein et al., 1989b, Büscher et al., 1988), die Gene, die für die extrazellulären Proteasen Kollagenase (Stein et al., 1989b) und Plasminogenaktivator (Miskin und Ben-Ishai, 1981, Rotem et al., 1987) kodieren und das Metallothionein II A-Gen (Angel et al., 1986, Stein et al., 1989b, Fornace et al., 1988). Außerdem führt UV-Bestrahlung zur Aktivierung des HIV-1 Provirus (Valerie et al., 1988, Stein et al., 1989b, 1989a). Das primäre Ereignis für die

Auslösung der Genaktivierung ist die Schädigung der DNA durch UV. Dies konnte in verschiedenen Versuchsansätzen gezeigt werden: a.) Das Aktionsspektrum der UV-Induktion unterschiedlicher Gene zeigt ein Optimum bei 265 - 275nm und fällt zu längeren Wellenlängen steil ab. Dies ist genau der Wellenlängenbereich in dem Säugerzellen am effizientesten durch UV abgetötet werden (Zölzer und Kiefer, 1984) und in dem nukleinsäurehaltige Moleküle, wie DNA und RNA am stärksten UV-Energie absorbieren; typische Membranbestandteile, wie Proteine und Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen dagegen nicht (Rao, 1961).

b.) In Xeroderma Pigmentosum Zellen der Komplementationsgruppe A (das sind Zellen die sich, wie oben bereits erwähnt, von normalen menschlichen Fibroblasten nur dadurch unterscheiden, daß sie UV-induzierte DNA-Schäden nicht reparieren können) werden viel geringere UV-Dosen zur maximalen Aktivierung von Genen gebraucht, als in Wildtypzellen (Stein et al., 1989b). Dies spricht dafür, daß es der nicht reparierte UV-induzierte DNA-Schaden ist, der die Signalkette in Gang setzt.

c.) Die direkte UV-Bestrahlung kann durch das Einbringen UV-bestrahlter DNA-Sequenzen unterschiedlicher Herkunft ersetzt werden (Mai et al., 1989, Krämer et al., 1990); auch dies führt zur Aktivierung der UV-induzierbaren Gene. Dieser Versuch zeigt auch, daß der Ort des DNA-Schadens und der Ort der Genaktivierung unterschiedlich sein können.

Der durch UV-Bestrahlung induzierte DNA-Schaden führt am Ende zu einer erhöhten Transkription der oben genannten Gene. Die Transkription von Genen wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die an cis-wirkende DNA-Elemente binden und damit in bisher unbekannter Weise, die transkriptionelle Aktivität der RNA Polymerase II kontrollieren (Herrlich et al., 1989, Dynan und Tjian, 1985, Ptashne, 1988, McKnight und Tjian, 1986, Serfling et al., 1985). Diese Elemente liegen normalerweise im 5' flankierenden Bereich der Gene. Die DNA-Elemente, die die UV-Induktion vermitteln, konnten für einige Gene identifiziert werden: So z.B. das URE (auf UV reagierende Element) im Kollagenase-Gen (Position: -72/-66) (Stein et al., 1989b), 2 URE's im c-jun Gen (Position: -71/-64 und -190/-183) (Stein et al., submitted, Krämer et al., 1990), die sogenannten "enhancer repeats" im LTR (long terminal repeat)



des HIV-1 (Position: -105/-79) (Stein et al., 1989a, 1989b) und das " dyad symmetry element " (DSE) im c-fos Gen (Position: -320/-299) (Büscher et al., 1988). An das Kollagenase-URE bindet der Transkriptionsfaktor AP-1 (Angel et al., 1987b, Lee et al., 1987, Gebel et al., 1989), ein Heterodimer aus den Genprodukten des c-jun- und c-fos-Gens, an die c-jun URE's binden Proteine aus der AP-1 Familie (Stein et al., 1989c), an die enhancer repeats des HIV-LTR bindet der nukleare Faktor kappa B (NFkB) (Baeuerle und Baltimore, 1989, 1988a, Nabel und Baltimore, 1987, Wu et al., 1988) und an das DSE des c-fos Gens bindet ein Proteinkomplex, der u.a. den sogenannten SRF (serum response factor) (Schröter et al., 1990, Herrera et al., 1987) enthält. In den meisten Fällen (eine Ausnahme bildet das DSE) wird die Bindungsaktivität dieser Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden DNA-Sequenzen durch UV-Be-strahlung erhöht.

Man geht heute davon aus, daß der Grund für die erhöhte Bindeaktivität eine UV-induzierte posttranslationale Modifikation (Müller et al., 1987, Yamamoto et al., 1988) dieser Transkriptionsfaktoren ist, und man nimmt an, daß die erhöhte Bindung letztlich zu einer Aktivierung der entsprechenden Gene führt.

Was liegt zwischen dem Anfang der Signalkette, dem DNA-Schaden, und ihrem Ende, der posttranslationalen Modifikation von Transkriptionsfaktoren? Es gibt einige Untersuchungen, die Rückschlüsse auf die gesuchte(n) Komponente(n) der Signalkette zulassen:

a.) UV-Be-strahlung führt zu einer transienten Akkumulation von c-fos mRNA, d.h. kurze Zeit nach der UV-Be-strahlung steigt die Menge an c-fos mRNA an und fällt danach sehr schnell wieder ab. Eine zweite UV-Be-strahlung, kurze Zeit nach der ersten, führt dann nicht mehr zur Induktion der c-fos Transkription (Büscher et al., 1988). Dies deutet darauf hin, daß eine bestimmte Komponente, die zur Induktion nötig ist, offenbar nicht mehr zur Verfügung steht. Demnach sollte eine erschöpfbare Komponente Teil der UV-induzierten Signalkette sein.

b.) Die UV-Induktion der c-fos Transkription wird durch Protein-kinase-Hemmer inhibiert und zwar durch ein ähnliches Spektrum von Hemmern, das auch die Phorbol-ester-induzierte Genaktivierung hemmt (Büscher et al., 1988, Krämer et al., 1990). Demzufolge

sollten Proteinkinasen bei der UV-Induktion von c-fos eine Rolle spielen.

c.) UV-Bestrahlung führt im Falle des nuklearen Faktor kappa B (NFkB) dazu, daß der im Cytoplasma lokalisierte Faktor von einem Inhibitor (Baeuerle und Baltimore, 1988a, 1988b) losgelöst wird und dann vermehrt in den Kern gelangt. Dies zeigt, daß ein Teil der UV-induzierten Signalkette auch im Cytoplasma der Zelle ablaufen kann.

d.) Auch eine Aktivität, die extrazellulär auftritt, spielt bei der UV-Induktion von verschiedenen Genen eine Rolle (Schorpp et al., 1984, Rotem et al., 1987). Man findet diese Aktivität, den sogenannten "extrazellulären Proteinsynthese induzierenden Faktor" (EPIF) im Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen (Schorpp et al., 1984). Er induziert in unbestrahlten Zellen ein ähnliches genetisches Programm wie UV-Bestrahlung selbst. Dieser Faktor wird nach UV-Bestrahlung von normalen menschlichen Fibroblasten von diesen ins Kulturmedium abgegeben und führt in unbestrahlten Zellen u.a. zur Erhöhung der Mutationsrate (Maher et al., 1988) und zur Aktivierung derjenigen Gene, die auch durch UV aktiviert werden, z.B. zur Transkription von HIV-1 (Stein et al., 1989a).

Am Beispiel der Aktivierung der HIV-1 Transkription wird am besten deutlich, welche eine wichtige Rolle solch ein Faktor im menschlichen Organismus spielen könnte. Die Aktivierung von latentem HIV-1 Provirus ist der entscheidende Schritt bei der Entstehung des "acquired immunodeficiency syndrome" (AIDS). Latentes Virus wird hauptsächlich in Zellen gefunden, die den CD4-Oberflächenmarker besitzen (Tschachler et al., 1987, Dalglish et al., 1984, McClure und Weiss, 1987); diese Zellen sind normalerweise nicht direkter Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Die Möglichkeit, daß latentes HIV-1 in unbestrahlten Zellen im Körperinneren indirekt durch EPIF, der von UV-bestrahlten Zellen der Haut abgegeben wird, aktiviert wird, könnte für den natürlichen Verlauf von AIDS bedeutsam sein.

Die Existenz des extrazellulären Proteinsynthese induzierenden Faktors zeigt, daß die UV-induzierte Signalkette keineswegs nur im Zellkern oder im Cytoplasma abläuft, sondern daß zumindest ein Teil der Signalkette auch außerhalb der Zelle abläuft. Dieser Teil ist dafür verantwortlich, daß auch unbestrahlte Zellen in die UV-

Antwort miteinbezogen werden können. Es gibt Hinweise darauf, daß der extrazelluläre Faktor auch bei der UV-Antwort der bestrahlten Zelle beteiligt ist. In der Diskussion wird auf diese Frage noch näher eingegangen werden.

Ziel dieser Arbeit war die Reinigung, Identifizierung und Charakterisierung des Faktors oder der Faktoren die für die EPIF-Aktivität verantwortlich sind. Als Maß für die EPIF-Aktivität verwendete ich die Fähigkeit von EPIF, die Transkription des Kollagenase- und des HIV-1-Gens zu induzieren. Ich konnte zeigen, daß zwei Faktoren für diese Aktivitäten verantwortlich sind, nämlich das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor = bFGF). Nach UV-Bestrahlung von Zellen kommt es zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$ - und bFGF-mRNA und zu einer verstärkten Neusynthese des IL-1 $\alpha$ - und bFGF-Proteins. Damit ist es mir gelungen diesen wichtigen extrazellulären Zweig der UV-induzierten Signalkette aufzuklären.

# Material und Methoden

## Bezugsquellen:

|                           |                                   |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Acetyl-Coenzym A, Li-Salz | Pharmacia, Freiburg               |
| Acrylamid                 | Serva, Heidelberg                 |
| Agarose Typ II, Typ VII   | Sigma, München                    |
| Ammoniumperoxodisulfat    | Bio Rad, München                  |
| Ammoniumsulfat            | Merck, Darmstadt                  |
| Ampicillin                | Sigma, München                    |
| Anisomycin                | Sigma, München                    |
| Bacto-Agar                | Difco Laboratories, Detroit       |
| Bacto-Hefeextrakt         | Difco Laboratories, Detroit       |
| Bacto-Trypton             | Difco Laboratories, Detroit       |
| Bakterienschalen (9 cm)   | Greiner, Nürtingen                |
| Bromphenolblau            | Serva, Heidelberg                 |
| BSA                       | Serva, Heidelberg                 |
| Cäsiumchlorid             | Biomol, Ilvesheim                 |
| DEAE-Dextran              | Pharmacia, Freiburg               |
| Dialyseschläuche          | Bender & Hobein, Karlsruhe        |
| Dithiothreitol            | BRL Inc., Neu-Isenburg            |
| DMEM                      | Gibco, Karlsruhe                  |
| Emulsifier Safe           | Packard Instr. Comp.,<br>Illinois |
| Ethanol                   | Roth, Karlsruhe                   |
| Ethidiumbromid            | Sigma, München                    |
| Ethylacetat               | Merck, Darmstadt                  |
| Ficoll 400                | Serva, Heidelberg                 |
| Fötale Kälberserum        | Gibco, Karlsruhe                  |
| Folin-Reagenz             | Merck, Darmstadt                  |
| FPLC-System               | Pharmacia, Freiburg               |
| G418                      | Gibco, Karlsruhe                  |
| Glycerin                  | BRL Inc., Neu-Isenburg            |
| Glycin                    | Bio Rad, München                  |
| Glyoxal                   | Sigma, München                    |
| Harnstoff                 | Bio Rad, München                  |
| Heparin-Sepharose CL-6B   | Pharmacia, Freiburg               |
| HEPES                     | Sigma, München                    |
| HybondN <sup>+</sup>      | Amersham, Braunschweig            |
| Kieselgel-DC-Platten      | Macherey-Nagel, Düren             |
| Lysozym                   | Boehringer, Mannheim              |
| β-Mercaptoethanol         | Roth, Karlsruhe                   |
| Mitomycin C               | Sigma, München                    |

|                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| N,N'-Methylen-bisacrylamid        | Bio Rad, München            |
| Nick-Translations-Kit             | Amersham, Braunschweig      |
| Nonidet P-40                      | Bio Rad, München            |
| Oligo-dT-Cellulose Typ VII        | Collaborative Research Inc. |
| Penicillin/Streptomycin           | Gibco, Karlsruhe            |
| PMSF                              | Serva, Heidelberg           |
| Protein A-Sepharose               | Pharmacia, Freiburg         |
| Protein G-Sepharose               | Pharmacia, Freiburg         |
| Protein-Molekulargewichtsmarker   | Bio Rad, München            |
| Proteinase K (Lyophilisat)        | Merck, Darmstadt            |
| PVDF-Membran                      | Millipore, Eschborn         |
| Q-Sepharose FF                    | Pharmacia, Freiburg         |
| Restriktions-Endonukleasen        | Bio Labs, Schwalbach        |
|                                   | Boehringer, Mannheim        |
|                                   | BRL Inc., Neu-Isenburg      |
|                                   | Pharmacia, Freiburg         |
|                                   | Amersham, Braunschweig      |
| Röntgenfilme (HyperfilmMP)        | Gibco, Karlsruhe            |
| RPMI 1640                         | Sigma, München              |
| Salmon-Sperm-DNA Typ III, Na-Salz | Serva, Heidelberg           |
| SDS                               | Pharmacia, Freiburg         |
| Sephadex G-50                     | Bio Rad, München            |
| TEMED                             | Sigma, München              |
| TPA                               | Boehringer, Mannheim        |
| transfer-RNA (aus Kalbsleber)     | Fluka, Buchs Schweiz        |
| Transformations-Chemikalien       | Sigma, München              |
| Tris-HCl, Tris-Base               | Bio Rad, München            |
| TritonX-100                       | Gibco, Karlsruhe            |
| Trypsin                           | Serva, Heidelberg           |
| Tween                             | Vetter, Wiesloch            |
| UV-Lampe                          | Bender & Hobein, Karlsruhe  |
| Whatman DEAE-Papier               | Bender & Hobein, Karlsruhe  |
| Whatman 3MM-Papier                | Bender & Hobein, Karlsruhe  |
| Whatman GF/C-Filter               | Greiner, Nürtingen          |
| Zellkulturflaschen                | Greiner, Nürtingen          |
| Zellkulturschalen                 |                             |

## Radiochemikalien:

|  |                        |
|--|------------------------|
| $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (370MBq/ml)                                | Amersham, Braunschweig |
| L- <sup>35</sup> S-Methionin (370MBq/ml)                                   | Amersham, Braunschweig |
| <sup>14</sup> C-methylierte Proteine                                       | Amersham, Braunschweig |
| D-threo-(dichloracetyl-1- <sup>14</sup> C)-<br>Chloramphenicol (7.4MBq/ml) | Amersham, Braunschweig |

## Bakterien und Zellen:

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>E. coli DH5:</b>         | F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> ,<br><i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> |
| <b>Hela tk<sup>-</sup>:</b> | Menschliche Cervix-Karzinoma-Zelle. Erhalten von<br>Dr. Yung-Chi-Chung, Durham. (im nachfolgenden<br>nur noch mit HeLa bezeichnet)  |
| <b>NFB:</b>                 | Primäre menschliche Normalfibroblasten.<br>Erhalten von R. Eife, München.   |
| <b>XPA:</b>                 | Primäre menschliche Xeroderma pigmentosum<br>Fibroblasten der Komplementationsgruppe A.<br>Erhalten von J. Cleaver, San Francisco.  |

## Kulturmedien:

### L-Broth:

0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 1.0% NaCl, 1.0% Bacto-Trypton

### TB:

2.4% Bacto-Hefe-Extrakt, 1.2% Bacto-Trypton, 0.35% Glycerin, 72mM  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**SOB:**

0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>

**SOC:**

SOB mit 20mM Glucose

**Bakterien-Selektionsmedium:**

L-Broth oder TB mit 100µg/ml Ampicillin

**Einfrier-Medium (Bakterien):**

90% L-Broth, 10% DMSO

**Kulturmedium für HeLa, NFB, XPA:**

DMEM mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin

**Einfrier-Medium (Zellkultur):**

80% Medium, 10% FCS, 10% DMSO

**Antikörper:****Kontroll-Kaninchenserum:**

Kaninchenserum aus nicht-immunisierten Tieren.

**IL-1 $\alpha$  Antikörper:**

Kaninchenserum gegen rekombinantes, menschliches IL-1 $\alpha$  Protein (Wingfield et al., 1987). Zur Verfügung gestellt von der Fa. Glaxo I.M.B., Genf.

**bFGF Antikörper (MAK 8/16):**

Monoklonaler Mausantikörper (Ascites) gegen rekombinantes, menschliches bFGF Protein. Zur Verfügung gestellt von der Fa. Progen, Heidelberg.

**bFGF Antikörper (R2/119):**

Kaninchenserum gegen Peptid aus menschlichem bFGF Protein (Aminosäure 119 bis C-Terminus). Zur Verfügung gestellt von der Fa. Progen, Heidelberg.

**aFGF Antikörper:**

Kaninchenserum gegen das menschliche aFGF Protein. Zur Verfügung gestellt von W. Risau, München.

**IL-6 Antikörper:**

Kaninchenserum gegen rekombinantes menschliches IL-6 Protein. Zur Verfügung gestellt von P. Krammer, Heidelberg.

**IL-1 $\beta$  Antikörper:**

Kaninchenserum gegen rekombinantes, menschliches IL-1 $\beta$  Protein (Wingfield et al., 1986). Zur Verfügung gestellt von der Fa. Glaxo I.M.B., Genf

**TNF $\alpha$  Antikörper:**

Kaninchenserum gegen rekombinantes, menschliches TNF $\alpha$  Protein. Zur Verfügung gestellt von der Fa. Glaxo I.M.B., Genf.

**PDGF Antikörper:**

Kaninchenserum gegen gereinigtes PDGF Protein aus menschlichen Blutplättchen. Zur Verfügung gestellt von C.-H. Heldin, Uppsala.

**TCSF Antikörper:**

Monoklonaler Mausantikörper (Hybridomüberstand) gegen das menschliche TCSF Protein (Ellis et al., 1989). Zur Verfügung gestellt von C. Biswas, Boston.

**Kollagenase Antikörper:**

Kaninchenserum gegen das menschliche Kollagenase Protein. Zur Verfügung gestellt von G. Murphy, Cambridge.



## **Wachstumsfaktoren:**

### **IL-1 $\alpha$ :**

Rekombinantes, menschliches IL-1 $\alpha$  Protein. Zur Verfügung gestellt von der Fa. Biogen, Genf.

### **bFGF:**

Rekombinantes, menschliches bFGF Protein. Gekauft bei der Fa. Progen, Heidelberg.

## **cDNA-Proben:**

### **IL-1 $\alpha$ :**

660bp HindIII/HincII-Fragment eines menschlichen IL-1 $\alpha$  cDNA-Klons (March et al., 1985) in SP65. Zur Verfügung gestellt von der Fa. Immunex, Seattle, Washington.

### **bFGF:**

1.4kb EcoRI-Subfragment (Nukleotid 1-1401) des  $\lambda$ bb2 Rinder-bFGF cDNA-Klons (Abraham et al., 1986) in pBluescript. Zur Verfügung gestellt von J.A. Abraham und J.C. Fiddes, Mountain View, Kalifornien.

### **Kollagenase:**

Menschliches Kollagenase-I cDNA-Plasmid pCllase-I (Angel et al., 1987a).

### **GAPDH:**

0.9kb PstI-Fragment aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985).

## **Bestrahlungsquelle:**

Es wurden 15W Hg-Lampen der Wellenlänge 254nm (halbmaximale Bandbreite 2.3nm) benutzt. Die Leistung der Lampen in 32cm Abstand beträgt 2.8W/m<sup>2</sup> (254nm).

# METHODEN

## 1. Behandlung von Nucleinsäuren

### Spektrophotometrische Bestimmung von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäure wurde in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260nm und 280nm bestimmt. Das Verhältnis  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  sollte etwa 1.8 : 1 bei DNA und 2 : 1 bei RNA sein.

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

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

### Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung der Nucleinsäure-Lösung von Proteinen wurde mit Wasser auf mindestens 100 $\mu$ l aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1x TNE gesättigt; 1x TNE: 100mM NaCl, 10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA pH8.0) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wieder gut geschüttelt. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren wieder getrennt. Die Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

### Konzentration von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die Nucleinsäure-Lösung wurde in einem geeigneten Volumen mit NaAcetat (pH4.8) bis zu einer Endkonzentration von 0.25 - 0.3M versetzt. Bei kleinen Fragmenten oder geringen Mengen sollte man noch etwa 1 bis 5 $\mu$ g tRNA als Fällungshilfe zufügen. Nach Zugabe des 2.5 fachen Volumen Ethanol wurde 30 min bei -80°C oder 2 Stunden bei -20°C gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei 13000xg zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde der Niederschlag nochmal mit 80% Ethanol gewaschen.

Das Volumen der Nucleinsäure-Lösung kann auch durch 2-Butanol eingeeengt werden. Dazu wurde das gleiche Volumen 2-Butanol

zugegeben und gut gemischt. Durch 10 sec Zentrifugieren wurden die Phasen wieder getrennt und die Oberphase verworfen. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt.

Bei der Fällung von Nukleinsäuren kann Ethanol auch durch Isopropanol ersetzt werden. Man gibt 1/2 Volumen Isopropanol zu der wässrigen Nukleinsäure-Lösung.

## **2. Transformation von Bakterien**

### **Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation (Hanahan, 1986)**

Eine Kolonie von *E. coli* DH5 wurde in 10ml SOC-Medium (0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 500ml SOC-Medium wurden mit 1ml der Übernachtskultur angeimpft und im 5l Kolben bei 37°C so lange geschüttelt, bis die E<sub>550</sub> ungefähr 0.4 beträgt (ungefähr 2 Stunden). Die Bakterienkultur wurde auf zwei 250ml Plastik-Zentrifugenbecher verteilt und 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien 15 min bei 1000xg (4°C) zentrifugiert und das Medium gut entfernt. Die beiden Niederschläge wurden in je 10ml TFB (100mM KCl, 45mM MnCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM HAcOCl<sub>3</sub>, 10mM K-MES pH6.3, 15% Glycerin) durch Schwenken resuspendiert und in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen (eisgekühlt) gegeben. Nach Auffüllen auf 50ml mit TFB und Mischen blieb die Bakterien-Lösung 15 min auf Eis stehen. Nach 15 min Zentrifugieren bei 1000xg (4°C) wurden die beiden Niederschläge in je 10ml TFB durch Schwenken resuspendiert und in einem 50ml Greiner-Röhrchen (eisgekühlt) vereinigt. Die nun kompetenten Bakterien wurden bei 0°C schnellstmöglichst in 200µl Portionen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Die Transformationseffizienz liegt bei etwa 1-5x10<sup>6</sup> Kolonien pro µg "supercoiled" pBR322.

### **Transformation von kompetenten Bakterien**

Ein Röhrchen mit kompetenten Bakterien wurde aus dem flüssigen Stickstoff geholt und auf Eis gestellt. Sobald die Bakterien aufgetaut

waren, wurden 10-100ng Plasmid-DNA zugemischt und 1 Stunde auf Eis gestellt. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis wurde 3ml SOC-Medium (0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose) zugegeben und 90 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 5 min bei 1000xg zentrifugiert (RT) und der Niederschlag in 200µl SOC-Medium gelöst. Die gesamte Menge wurde auf einer Selektiv-Agarplatte ausgestrichen.

### **Herstellung von Selektiv-Agarplatten**

In einem 2 Liter Kolben wurden 5g Hefe-Extrakt, 10g Bacto-Trypton, 10g NaCl und 15g Difco-Agar auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50µg/ml zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agar-Platten (9cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme zum Platzen gebracht. Nach Erstarren des Agars wurde das Kondenswasser aus dem Deckel ausgeschüttelt und die Platten bei 4°C gelagert.

## **3. DNA-Präparation**

### **Bakterien-Wachstum**

Die Bakterien wurden in 2ml Nährmedium (L-Broth) mit dem Antibiotikum Ampicillin (100µg/ml) etwa 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. 150µl von dieser Vorkultur dienten zum Animpfen von 200ml Selektionsmedium. Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 37°C im Erlenmeyer-Kolben geschüttelt.

### **Plasmid-DNA-Präparation (Birnboim und Doly, 1979)**

200ml einer über Nacht inkubierten Bakterien-Suspension wurden 10 min bei 4000xg zentrifugiert. Der Bakterien-Niederschlag wurde in 10 ml Lysozym-Lösung (50mM Glucose, 10mM EDTA pH7.8, 25mM Tris pH8.0, 2mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden unter Schütteln 20ml alkalische

SDS-Lösung (0.2M NaOH, 1% SDS) zugegeben und die Suspension 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 15ml 3M NaAcetat wurde die Mischung 60 min auf Eis gestellt. Ausgefallenes Protein und genomische DNA wurden durch 20 min Zentrifugieren bei 16800xg (4°C) abgetrennt. Zum Überstand wurde das 2.5 fache Volumen Ethanol (-20°C) gegeben und die Plasmid-DNA mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde 10 min bei 16800xg (4°C) zentrifugiert, getrocknet und in 10ml 0.1M NaAcetat, 50mM Tris pH8.0 gelöst. Nach anschließender zweiter Ethanolfällung bei -80°C für mindestens 30 min wurde der Niederschlag getrocknet und in 4.2ml 1mM EDTA, 50mM Tris pH8.0 gelöst. Nach Zugabe von 4.5g CsCl und 40µl Ethidiumbromid (10mg/ml) wurde die Lösung auf zwei 5ml VTi65-Zentrifugenröhrchen verteilt, mit einer CsCl-Lösung der gleichen obigen Konzentration aufgefüllt und zugeschweißt. Nach 16 Stunden Ultrazentrifugation im Beckman VTi65-Vertikalrotor bei 55000 U/min (20°C) wurde die "supercoiled" Plasmid-Bande abgesaugt und nach Vereinigung der beiden Ansätze für weitere 6 Stunden ultrazentrifugiert. Die "supercoiled" Plasmid-Bande wurde wieder abgesaugt, das Ethidiumbromid mit wasser-gesättigtem 1-Butanol extrahiert und die DNA mit Wasser auf 4ml aufgefüllt. Nach Zugabe von NaAcetat bis zu einer Endkonzentration von 0.2M wurde die DNA mit Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die DNA wurde nach 30 min Zentrifugieren bei 16800xg (4°C) mit 10ml 80% Ethanol gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde nach dem Trocknen in Wasser gelöst.

### **Mini-Plasmid-DNA-Präparation**

Die Bakterien wurden in 3ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1.5ml der Bakterien-Kultur wurden 5 min bei 4000xg zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100µl Lysozym-Lösung (50mM Glucose, 10 mM EDTA pH7.8, 25mM Tris pH8.0, 2mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200µl alkalischer SDS-Lösung (0.2M NaOH, 1% SDS) und Mischen wurde 150µl 3M NaAcetat zugefügt und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1ml Ethanol versetzt und 10 min auf Eis gestellt. Die

ausgefallene Plasmid-DNA wurde durch 10 min Zentrifugieren bei 13000xg abgetrennt, mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40µl Wasser gelöst.

#### **4. Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen**

Wenn nicht anders angegeben, wurde die DNA in 1x Universal-Verdaupuffer (10mM Tris pH7.5, 50mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.1mg/ml BSA) mit dem entsprechenden Restriktionsenzym 2-3 Stunden bei 37°C verdaut. 1 Enzym-Einheit verdaut in einer Stunde 1µg Lambda-DNA. Es wurden meist 2-3 Enzym-Einheiten pro µg DNA eingesetzt. Beim Verdau von Mini-Plasmid-Präparations-DNA wurden 5µl DNA-Lösung mit 10 Enzym-Einheiten Restriktionsenzym und 0.5µl RNaseA (5mg/ml) verdaut. Die Verdau-Reaktion wurde mit 5µl 5x Glycerin-Probenpuffer (1x:10mM EDTA pH8.0, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) abgestoppt.

#### **5. Markierung von DNA mit Radionukleotiden**

##### **Nick-Translation (Rigby et al., 1977)**

Es wurde der "Nick-Translations-Kit" der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, benutzt. In einem Endvolumen von 50µl wurden 10µl Nick-Translations-Kit I (Puffer und dNTPs), 100 - 500ng DNA, 5µl Nick-Translations-Kit II (DNaseI und DNA-PolymeraseI) und 5µl α-<sup>32</sup>P-dCTP auf Eis gemischt. Nach 2 bis 3 Stunden Reaktion bei 15°C wurde die Probe auf Eis gestellt oder durch Zugabe von 5µl 0.5M EDTA gestoppt und unmittelbar danach die nicht eingebauten Nukleotide durch Gelfiltration abgetrennt.

##### **Gelfiltration über Sephadex G-50**

Das Säulenmaterial Sephadex G-50 trennt Moleküle von 1500 bis 30000 Dalton auf. Es dient hier zur Abtrennung freier Nukleotide von einem radioaktiven DNA-Fragment. Sephadex G-50 wurde in 1x TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) einige Stunden quellen gelassen. Eine kurze Pasteurpipette wurde mit Glaswolle abge-

dichtet und eine Schlauchklemme angebracht. Die Pipette wurde bis zur oberen Einengung luftblasenfrei mit dem Säulenmaterial gefüllt, das daraufhin mehrmals mit 1x TE gewaschen wurde. Nach dem vollständigen Einsinken des Puffers in das Säulenmaterial wurde die radioaktive Probe aufgetragen. Anschließend wurde mit 400µl Puffer nachgespült und diese Menge in der ersten Fraktion gesammelt. Dann wurde weiterer Puffer aufgetragen und je 3 Tropfen (etwa 100µl) gesammelt. Nach 12 Fraktionen wurde die Gelfiltration beendet. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde nach der Cerenkow-Methode gemessen und die 3 bis 4 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt.

## **6. Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0.8% bis 1.5% Agarose-Gele benutzt. Es handelt sich hierbei um Mini-Gele: Gelvolumen 50ml, Puffervolumen 100ml, Taschenvolumen 25µl. Das Gel ist völlig von Puffer bedeckt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50ml 1x TBE (90mM Tris pH8.3, 90mM krist. Borsäure, 2.5mM EDTA pH8.0) gegeben und 5 min im Mikrowellenherd aufgekocht. Nach Zugabe von 1.5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) wurde das Gel gegossen und ca. 30 min abkühlen gelassen. Nach Entfernen des Kamms und Eingießen des Laufpuffers (1x TBE) wurden die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10mM EDTA pH8.0, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 100mA. Die DNA-Banden werden unter UV sichtbar.

## **7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNA wurde auf einem Agarosegel Typ II aufgetrennt. Das zu isolierende Fragment wurde im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell 2-3mm unterhalb des Fragmentes ein Spalt in die Agarose geschnitten. In diesen Spalt wurde ein Stückchen DEAE-Papier gesteckt und anschließend die Gelelektrophorese fortgesetzt, bis das DNA-Fragment an das DEAE-Papier gebunden war. Dann wurde das DEAE-Papier aus dem Gel genommen, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend für 30 min in 400µl

1.5M NaCl bei 60-65°C inkubiert. Ein Eppendorf Röhrchen wurde mit einem kleinen Loch versehen, mit Glaswolle gestopft und in ein zweites Eppendorf Röhrchen gesteckt. Das DEAE-Papier sowie die Flüssigkeit wurden über die Glaswolle geschichtet und Papier und Flüssigkeit durch kurze Zentrifugation getrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Ethanol präzipitiert.

#### **8. PolyA<sup>+</sup>-RNA-Präparation (Aviv und Leder, 1972)**

Für jeden Probenpunkt wurde eine (bei UV-Bestrahlung auch zwei bis drei) subkonfluente 14cm Petrischale(n) verwendet. Jede Petrischale wurde zweimal mit 10ml eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3) gewaschen. Die Zellen eines Probenpunktes wurden in insgesamt 10ml kaltem STE (100mM NaCl, 20mM Tris pH7.4, 10mM EDTA pH7.8) mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 50ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 300µg/ml Proteinase K und 0.5% SDS wurde die Mischung 30 sec mit einem Ultraturrax-Messerhomogenisator homogenisiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 45 - 60 min bei 37°C. Der Lösung wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.5M zugesetzt und etwa 50mg in HSB (0.3M NaCl, 10mM Tris pH7.5, 5mM EDTA pH7.8, 0.1% SDS) resuspendierter Oligo-dT-VII-Cellulose zugegeben. Durch Mischen über Nacht (mindestens 2 Stunden) auf einer Rotationsapparatur wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA an die Oligo-dT-VII-Cellulose adsorbiert. Die Oligo-dT-VII-Cellulose wurde 2 min bei 350xg zentrifugiert und dreimal mit 10ml HSB gewaschen. Die E<sub>260</sub> des HSB nach dem 3. Waschgang sollte < 0.05 sein, wenn die rRNA zum größten Teil abgetrennt wurde. Die RNA wurde mit sterilem Wasser von der Oligo-dT-VII-Cellulose eluiert. Dazu wurde die Oligo-dT-VII-Cellulose dreimal mit je 1ml Wasser und einmal mit 1.5ml Wasser gewaschen. Der erste ml wurde verworfen und die restlichen 3.5ml RNA-Lösung vereinigt und anschließend nochmals zentrifugiert, um die Oligo-dT-VII-Cellulose vollständig abzutrennen. 300µl davon wurden zur Konzentrations-Bestimmung abgenommen. Zu den restlichen 2.7ml wurden in einem 15ml Greiner-Röhrchen 10µg tRNA gegeben ( wenn die gemessene RNA-Menge über 10µg/2.7ml lag, wurde keine tRNA zugesetzt) und die RNA mit Ethanol



ausgefällt. Die Oligo-dT-VII-Cellulose wurde durch zweimal Waschen mit 10ml 0.1M NaOH, 5mM EDTA pH7.8, fünfmal Waschen mit Wasser und zweimal Waschen mit HSB regeneriert.

## 9. Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung von RNA wurde ein 1.4%iges Agarose-Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen. Hierzu wurden 1.4g Agarose TypII in 100ml 1x RNA-Laufpuffer (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; aus einer 500mM Stammlösung, die mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH6.9 eingestellt worden war) im Mikrowellenherd für 10 min aufgeschmolzen oder autoklaviert. Die auf 70-80°C abgekühlte Agarose wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Erkalten der Agarose wurden etwa 900ml RNA-Laufpuffer (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in die Gelkammer gegeben (so daß das Gel gerade mit Laufpuffer bedeckt war) und es wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Die Elektrophorese erfolgte 2-3 Stunden bei 75V und Raumtemperatur. Während der Elektrophorese mußte eine peristaltische Pumpe den Laufpuffer rezirkulieren (vom + zum - Pol). 4µl polyA<sup>+</sup>-RNA (1µg/µl; RNA sollte in Wasser gelöst sein) wurden zu 7.2µl RNA-Mix (30µl deionisiertes, steriles Glyoxal + 105µl steriles DMSO + 4.2µl 500mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH6.9; vor Gebrauch frisch ansetzen) gegeben. Die Proben wurden mindestens 5 min bei 50°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1µl RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4% Bromphenolblau) und 1µl Ethidiumbromid (1mg/ml) wurden die Proben auf dem Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Ende des Laufs wurde das Gel unter UV fotografiert.

## 10. Northern-Blot und Hybridisierung

(Alwine et al., 1977, Denhardt, 1966)

In eine Plastikwanne wurde 20x SSC (3M NaCl, 0.3M NaCitrat pH6.5) gefüllt. Auf einen Plastikständer in dieser Wanne wurde eine Glasplatte von der Größe des RNA-Gels gelegt und darüber drei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier, das mit 20xSSC angefeuchtet wurde und nun links und rechts der Glasplatte in die SSC-Lösung

eingetaucht war. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Danach wurde das Gel an allen Seiten mit Parafilm-Streifen umrandet, so daß das SSC nur durch das Gel gesaugt werden konnte. Auf das Gel wurde ein HybondN<sup>+</sup>-Filter in Gelgröße luftblasenfrei aufgelegt. Darüber kam nochmals ein 3MM-Filterpapier und dann ein Stapel Kleenex-Tücher, die mit einer Glasplatte beschwert wurden. Der Transfer erfolgte über Nacht (beschwert man das Ganze mit größeren Gewichten, reichen auch einige Stunden "blotten" aus). Der Filter wurde 3 min mit 50mM NaOH fixiert, zweimal mit 2x SSC neutralisiert, feucht in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt oder nach der Neutralisierung direkt in die Vorhybridisierungslösung gegeben.

**Vorhybridisierung:** Die Vorhybridisierung erfolgte in 200ml Vorhybridisierungs-Lösung. Diese besteht aus 4x SSC, 1x Denhardt's (0.02% BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% PVP), 3.3% PiPPi (0.2M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 0.1% SDS, 40µg/ml denaturierte Salmon Sperm DNA. Die Vorhybridisierung erfolgte 2 - 4 Stunden bei 65°C unter leichtem Schütteln.

**Hybridisierung:** Die Hybridisierung wurde in einem Plastikbeutel durchgeführt. Pro Standardfilter (10 x 10cm) wurden 5ml Vorhybridisierungslösung in den Plastikbeutel gegeben und 100 - 500ng radioaktiv markierte DNA (spez. Akt. 0.5 - 4.0 x 10<sup>8</sup> cpm/µg) zugesetzt. Die radioaktive Probe wurde vorher durch 5 min Kochen bei 100°C denaturiert, dann sofort auf Eis gestellt. Nach Entfernen der Luftblasen wurde der Plastikbeutel zugeschweißt und bei 65°C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde der Filter aus dem Plastikbeutel genommen und für je 30 min in 200ml folgender Lösungen bei 65°C gewaschen: einmal mit 2x SSC, 0.1% SDS; zweimal mit 1x SSC, 0.1% SDS; einmal mit 0.5x SSC, 0.1% SDS. Der noch feuchte Filter wurde wieder in einen Plastikbeutel eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert. Wenn der Filter mit einer anderen Probe nachhybridisiert werden sollte, wurde er zweimal mit je 200ml kochendem H<sub>2</sub>O bidest. übergossen, das man mit dem Filter jeweils wieder auf RT abkühlen ließ.

## 11. Transiente Transfektion

### DEAE-Dextran-Methode (Kawai und Nishizawa, 1984)

$1.5 \times 10^6$  HeLa-Zellen pro 9cm Petrischale wurden 24 Stunden vor der Transfektion angesetzt. Für die Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10ml warmem 1x TBS (137mM NaCl, 25mM Tris pH7.4, 5mM KCl, 0.7mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen. Nach Absaugen des TBS wurde 1ml DNA-DEAE-Dextran-Mischung (10µg DNA, 500µg/ml DEAE-Dextran in 1x TBS) auf die Zellen gegeben, die dann 30 min bei RT stehenblieben. Alle 5 min wurden die Petrischalen geschwenkt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 10ml 1x TBS gewaschen und 10ml frisches Medium zugegeben. Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit PBS (123mM NaCl, 17mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3) gewaschen und dann 7ml Medium mit den entsprechenden Induktoren zugegeben.

## 12. CAT-Assay und Proteinbestimmung nach Lowry

(Gorman et al., 1982, Lowry et al., 1951)

42 Stunden nach Behandlung mit Induktoren wurden die Zellen einer Petrischale für den CAT-Assay geerntet. Dazu wurden sie zweimal mit 10ml 1x TBS (137mM NaCl, 25mM Tris pH7.4, 5mM KCl, 0.7mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen und in 1ml 1x TBS mit einem Gummischaber abgeschabt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 3000xg wurde das Zellpellet in 100µl 0.25M Tris pH7.8 resuspendiert und die Zellen durch dreimaligen Gefrierschock aufgebrochen. Dazu wurden sie jeweils für 5 min in ein Trockeneis/Ethanol-Bad gestellt, dann für 5 min in ein 37°C Wasserbad und danach kräftig geschüttelt. Die aufgebrochenen Zellen wurden 10 min bei 13000xg abzentrifugiert und die 100µl Proteinextrakt abgenommen.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode bei 735nm. Für die Erstellung einer Eichkurve wurden 5 bis 80µl einer BSA-Stammlösung (1mg/ml in Lowry-Reagenz I) und 10µl 0.25M Tris, pH7.8 mit Lowry-Reagenz I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1M NaOH) auf 500µl

aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden jeweils 10 $\mu$ l in 490 $\mu$ l Lowry-Reagenz I gegeben. Zu diesen 500 $\mu$ l wurde 1ml frisch hergestellte Lowry-Reagenz IV (1ml Lowry-Reagenz I mit 100ml 2% NaK-Tartrat und 1ml 1% CuSO<sub>4</sub>) gemischt und 15 min stehen gelassen. Danach wurden unter sofortigen Mischen 100 $\mu$ l 50% Folin-Lösung zugegeben. Nach 90 min bei RT im Dunkeln wurden die Proben nochmal gemischt und dann die Extinktion bei 735nm gemessen. Anhand der Eichkurve kann man dann die Proteinkonzentration in den Proben bestimmen.

Für den CAT-Assay wurde von den Transfektionsansätzen jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt, die mit 0.25M Tris pH7.8 auf 80 $\mu$ l aufgefüllt wurde. Nach Zugabe von 2 $\mu$ l <sup>14</sup>C-Chloramphenicol wurde die Reaktion mit 20 $\mu$ l 4mM Acetyl-Coenzym A (in 0.25M Tris pH7.8) gestartet. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1ml Ethylacetat abgestoppt. Durch kurzes Mischen für 10 sec wurde das Chloramphenicol aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren wieder getrennt und die Ethylacetat-Oberphase abgenommen. Das Ethylacetat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Chloramphenicol wurde in 15 $\mu$ l Ethylacetat wieder gelöst und punktweise auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Als Laufmittel dienten 150ml Chloroform:Methanol (9:1) in einer Glas-Chromatographie-Kammer. Nach 50 min wurde die Chromatographie abgebrochen. Nach Lufttrocknung der DC-Platte wurde diese auf einem Röntgenfilm bei -80°C mit Verstärkerfolie über Nacht exponiert.

Nach Entwicklung des Filmes konnte man die Lage der radioaktiven Flecken auf der DC-Platte markieren. Das unacetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am wenigsten. Die 1'-acetylierte, die 3'-acetylierte und die 1',3'-diacetylierten Formen wandern in der angegebenen Reihenfolge immer weiter. Zur Auswertung wurden die unacetylierte Form und die acetylierten Formen ausgeschnitten und mit 5ml Emulsifier Safe in einem Szintillationszähler 2 min gemessen. Nach Abzug des cpm-Hintergrunds und der schon im Chloramphenicol enthaltenen acetylierten Formen kann berechnet werden, wieviel Prozent des Chloramphenicols acetyliert wurden. Weiterhin kann man die spezifische Enzymaktivität in pmol x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> berechnen, da

bekannt ist, wieviel pmol  $^{14}\text{C}$ -Chloramphenicol eingesetzt wurde (7000pmol), wieviel Substrat in 120 min acetyliert wurde und welche Proteinmenge eingesetzt wurde.

### **13. Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen**

Alle Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  und 95% relativer Feuchte inkubiert. Eine subkonfluente Kulturflasche (250ml) wurde nach Abziehen des Mediums einmal mit 3ml 0.05% Trypsin gewaschen und nach Zugabe von 3ml 0.25% Trypsin einige Minuten (die genaue Zeit hängt von den jeweiligen Zellen ab) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das Trypsin war vorher auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt worden. Wenn die Zellen nicht eingefroren werden sollten, wurden sie in 10ml vorgewärmtem Medium resuspendiert 3 min bei 300xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen erneut in frischem Medium resuspendiert, gezählt und auf neue Flaschen oder Petrischalen verteilt. Sollten die Zellen eingefroren werden, so wurden sie in 10ml kaltem Medium resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Zellzahl wurde bestimmt, die Zellen dann 3 min bei 300xg zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Je 1ml wurde in Einfrierröhrchen abgefüllt und 30 min auf Eis gestellt. Nach 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und einem Tag bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) überführt. Zum Auftauen wurde das Einfrierröhrchen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden 10ml warmes Medium zugegeben und die Zellen 3 min bei 300xg abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 10ml Medium resuspendiert und in eine  $80\text{cm}^2$  Kulturflasche mit 15ml Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

### **14. Herstellen von Ko-Medium und UV-Medium**

$2.0 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurden pro  $14\text{cm}$  PS angesetzt und zwei Tage mit DMEM und 10% fötalem Kälberserum kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen, die PS einmal mit 20ml PBS gewaschen und unmittelbar nach dem Waschen mit  $30\text{J}/\text{m}^2$  UV-bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Danach wurden die Zellen in Medium, das kein FCS,

sondern 0.05mg/ml Rinderserumalbumin enthielt für 40-48h weiterkultiviert. Das Medium wurde abgenommen und 5 min bei 4000xg und 4°C abzentrifugiert um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde nochmals 20 min bei 16800xg und 4°C abzentrifugiert. Um diesen Überstand handelt es sich, wenn in der vorliegenden Arbeit von Ko-Medium oder UV-Medium die Rede ist. Wenn es nicht sofort gebraucht wurde, wurde es in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## **15. Behandlung von Zellen mit Induktoren**

Zur UV-Bestrahlung wurde das Medium abgezogen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen (9cm PS mit 10ml) und dann "trocken" bestrahlt. HeLa-Zellen und NFB wurden mit 30J/m<sup>2</sup>, XP-Zellen mit 2J/m<sup>2</sup> bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde frisches Medium auf die PS gegeben. Bei allen anderen Induktoren wurde das Medium abgezogen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und frisches Medium, das die entsprechenden Induktoren enthielt oder konditioniertes Ko-Medium bzw. UV-Medium auf die Zellen gegeben. TPA (in DMSO) wurde in einer Endkonzentration von 60ng/ml, IL-1 $\alpha$  (in PBS) in einer Endkonzentration von 30ng/ml und bFGF (in PBS) in einer Endkonzentration von 10ng/ml eingesetzt. Zur Blockierung der Proteinsynthese wurde Anisomycin (in Ethanol) in einer Endkonzentration von 100 $\mu$ M eingesetzt.

## **16. Präparation von Cytoplasmaextrakt**

Extrakte wurden aus einer subkonfluenten 9cm Petrischale präpariert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3) gewaschen, in 1ml eiskaltem PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und 5 min bei 1200xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 $\mu$ l eiskaltem Zell-Lysispuffer (10mM HEPES-KOH pH7.9, 60mM KCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF) aufgenommen. Nach exakt 3 min auf Eis wurden die intakten Kerne der aufgebrochenen Zellen durch 5 min Zentrifugieren bei 1000xg vom Cytoplasmaextrakt abgetrennt. Der Cytoplasma-Extrakt wurde mit 1/2 Volumen Kern-Puffer (250 mM Tris pH7.5, 60mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF)

verdünnt und nochmals 30 min bei 100000xg zentrifugiert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. DTT und PMSF wurde den Puffern frisch zugesetzt. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach der Lowry-Methode (siehe unter CAT-Assay) bestimmt.

## **17. Membranpräparation und Behandlung der Membranen mit Trypsin oder Antikörpern**

2.0 x 10<sup>6</sup> HeLa-Zellen wurden pro 14cm PS angesetzt (10% FCS). Nach zwei Tagen wurden die Zellen nicht bestrahlt oder UV-bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann in PBS abgeschabt. Nach dem Zählen der Zellen wurden sie 3 min bei 300xg abzentrifugiert und das Zellsediment in 50mM Mannitol, 5mM HEPES (pH7.4) resuspendiert (1.5 x 10<sup>7</sup> Zellen in etwa einem ml). Hierzu wurde das Zellsediment fünfmal durch eine Kanüle (0.6mm Durchmesser), fünfmal durch eine Kanüle (0.4mm Durchmesser) und nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> bis zu einer Endkonzentration von 10mM erneut fünfmal durch eine Kanüle (0.4mm Durchmesser) gesaugt. Dann wurde für 1 min bei 13000xg abzentrifugiert. Dabei sollten noch intakte Zellen, Kerne, Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen und Membranen des Golgi-Komplexes sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und 20 min bei 100000xg abzentrifugiert. Das Sediment sollte nun grob angereicherte Membranfraktionen enthalten. Das Sediment wurde nun in PBS aufgenommen, 10 min auf einem Schüttler inkubiert und die Membranen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Membranen aus der gleichen Anzahl von Zellen wurden in die Tests auf Kollagenase induzierende Aktivität eingesetzt. Dazu wurden die Membranen einfach dem Kulturmedium zugesetzt. Bei der Behandlung mit Antikörpern wurden die Membranen vorher für 4 Stunden mit den entsprechenden Antikörpern bei 4°C und unter Rotieren inkubiert. Zur Trypsinbehandlung wurden die Membranen in Trypsinlösung (20µg/ml) für 10 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Sojabohnen Trypsin Inhibitor (200µg/ml) abgestoppt. Die Membranen wurden 20 min bei 100000xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in PBS aufgenommen und dem Kulturmedium zugesetzt. Der Test

auf Kollagenase induzierende Aktivität wurde, wie in Abschnitt 20 beschrieben, durchgeführt.

## **18. Konzentration von Proteinlösungen**

### **TCA-Fällung**

Zu den Proben wurde 50%ige TCA bis zu einer Endkonzentration von 12.5% gegeben und die Proben 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde für 15 min bei 13000xg abzentrifugiert, das Sediment mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet.

### **Ammoniumsulfat-Fällung**

Zu der Probe wurde unter ständigem Rühren sehr fein pulverisiertes Ammoniumsulfat langsam zugegeben. Nach Auflösen des gesamten Ammoniumsulfats wurde für 30 min langsam weitergerührt und dann mindestens 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde 15 - 30 min bei 16800xg abzentrifugiert und das Sediment in dem entsprechenden Puffer aufgenommen. Da das Sediment relativ große Mengen an Ammoniumsulfat enthielt, mußte die Probe in der Regel dialysiert werden.

Im Gegensatz zur TCA-Fällung muß bei der Ammoniumsulfatfällung eine Mindestmenge an Protein in der zu fällenden Probe sein. Wird diese Menge unterschritten so kann es passieren, daß das gesuchte Protein überhaupt nicht ausfällt. Die Mindestmenge hängt von der Löslichkeit des jeweiligen Proteins ab.

## **19. Proteingele**

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

(Laemmli, 1970)

Es wurden zwei unterschiedliche Gelgrößen verwendet: 8x6cm (Mighty Small Minigele; Hoefer, San Francisco) für Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10% und 12x15cm für Gradientengele mit einer Acrylamidkonzentration von 7.5-20%. Die Gradientengele wurden für eine bessere Auftrennung im niedermolekularen Bereich (<30kD) benutzt. In beiden Fällen hatte das Sammelgel eine Acrylamidkonzentration von 5%. Bei den 10%igen Acrylamidgelen



aus einer Stammlösung mit 30 Gew.% Acrylamid und 0.8 Gew.% N,N'-Methylenbisacrylamid war die Endkonzentration im Trenngel 375mM Tris-Base pH8.8, 0.1% SDS, 0.025% TEMED und 0.02% Ammoniumperoxodisulfat. Das Sammelgel enthielt 5% Acrylamid (Stammlösung wie bei Trenngel), 125mM Tris-HCl pH6.8, 0.1% SDS, 0.1% TEMED und 0.05% Ammoniumperoxodisulfat. Die Gradientengele wurden aus zwei Lösungen mit Polyacrylamidkonzentrationen von 20% und 7.5% unter Zuhilfenahme eines Gradientenmischers gegossen. Zur Stabilisierung des Gradienten wurden der 20%igen Acrylamidlösung 15 Gew.% Sucrose zugesetzt. Die Endkonzentration der anderen Bestandteile war die gleiche wie bei den 10%igen Gelen. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Puffer (192mM Glycin, 25mM Tris-Base pH8.3, 0.1% SDS, pH8.3) bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 25mA. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hatte. Je nach Versuchsablauf wurden die aufgetrennten Proteine mit Silber oder Coomassie Brilliant Blue gefärbt oder zur anschließenden Western-Analyse auf eine Membran übertragen. Bei Proteingelen mit <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proben wurden die Gele durch PPO-Einlagerung aktiviert, auf Whatman 3MM-Papier getrocknet und auf einen Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

### **Silber-Färbung von Proteingelen (Wray et al., 1981)**

Das Proteingel (Mighty Small Minigel) wurde für 15 Minuten in 50% Methanol fixiert. In der Zwischenzeit wurde Lösung A (0.8g AgNO<sub>3</sub> in 4ml H<sub>2</sub>O lösen) und Lösung B (7.6ml 1% NaOH mit 13.5ml H<sub>2</sub>O versetzen und 1.4ml konzentrierten Ammoniak zugeben) vorbereitet. Lösung C wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt: Lösung A tropfenweise und unter ständigem Rühren in Lösung B geben (wenn ein brauner Niederschlag auftritt, ist dieser mit konzentriertem Ammoniak wieder aufzulösen). Dann mit H<sub>2</sub>O auf 100ml auffüllen und das Gel in dieser Lösung 10 min färben. Danach wurde das Gel dreimal für je 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und in Lösung D (1.25ml 1% Zitronensäure und 125µl 38% Formaldehyd mischen und mit H<sub>2</sub>O auf 250ml auffüllen) entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Das Gel wurde dann sofort herausgenommen, in H<sub>2</sub>O gut gewaschen und in 50% Methanol aufbewahrt.

Bei dieser Färbemethode mußte mit sehr sauberen Gefäßen gearbeitet werden!

## **20. $^{35}\text{S}$ -Markierung von Proteinen und Test auf Kollagenase induzierende Aktivität**

Zur  $^{35}\text{S}$ -Markierung von Proteinen wurden in der Regel  $1.0 \times 10^5$  NFB oder XP-Zellen in Mikrotiterplatten (3cm Durchmesser) angesetzt (10% FCS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 1% FCS kultiviert und dann induziert. 40 Stunden nach der UV-Bestrahlung, bzw. 8 - 12 Stunden nach Induktion mit allen anderen Induktoren bzw. Säulenfraktionen wurde das Medium abgenommen, zweimal mit RPMI-Medium (ohne Methionin) gewaschen und dann 850 $\mu\text{l}$  RPMI-Medium (ohne Methionin) und 65 $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin auf jede Mikrotiterplatte gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde in eine Box gestellt, die eine PS mit Aktivkohle enthielt, und im Brutschrank für zwei Stunden inkubiert. (Die Aktivkohle bindet flüchtige  $^{35}\text{S}$ -markierte Zersetzungsprodukte, wahrscheinlich  $\text{CH}_3\text{SH}$ , das durch radiochemische Zersetzung der markierten Aminosäure entsteht.) Nach zwei-stündiger Inkubation wurde das Medium, das nun  $^{35}\text{S}$ -markierte sezernierte Proteine enthielt abgenommen, 5 min bei 13000xg abzentrifugiert und der Überstand mit TCA gefällt. Die gefällten Proteine wurden in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, 3 min gekocht, danach sofort auf Eis gestellt und auf SDS-Gelen aufgetrennt.

Zur  $^{35}\text{S}$ -Markierung von Proteinen, die immunpräzipitiert werden sollten, wurden  $2.0 \times 10^6$  HeLa-Zellen pro 9cm PS angesetzt (10% FCS). Nach 48 Stunden wurden die Zellen nicht bestrahlt oder UV-bestrahlt. Zu verschiedenen Zeiten nach der UV-Bestrahlung wurden die Zellen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Hierzu wurden die PS zweimal mit RPMI-Medium (ohne Methionin) gewaschen und dann mit 3.6ml RPMI-Medium (ohne Methionin) und 300 $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin für einige Stunden inkubiert. Die Cytoplasmaextrakte wurden, wie im Abschnitt 16 beschrieben, hergestellt, das Medium wurde 5 min bei 16800xg abzentrifugiert und der Überstand bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren oder direkt zur Immunpräzipitation eingesetzt.

## 21. Immunpräzipitation

Erster Schritt der Immunpräzipitation war das Koppeln (sog. "precoating") von 5µl Ko-Kaninchenserum (aus nicht immunisierten Tieren) oder von 5µl Kaninchen-Antiserum gegen IL-1α bzw. bFGF an 50µl ProteinA-Sepharose [1:1 mit TSA(10mM Tris pH8.0, 140mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>) äquilibriert]. Die monoklonalen Mausantikörper (2µl) gegen bFGF wurden an 50µl ProteinG-Sepharose (1:1 mit TSA äquilibriert) gekoppelt. Die Antikörper und die ProteinA/G-Sepharose wurden für zwei Stunden unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose (an die jetzt die Antikörper gekoppelt waren) mit folgenden Puffern gewaschen: a) wenn die anschließende Immunpräzipitation aus Zellüberstand erfolgte, je einmal mit 1.) Verdünnungspuffer (10mM Tris pH8.0, 140mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.025% NaN<sub>3</sub>, 2.) TSA (10mM Tris pH8.0, 140mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>) und 3.) 50mM Tris pH6.8; b) wenn die anschließende Immunpräzipitation aus Cytoplasmaextrakt erfolgte, dreimal mit 7.5mM HEPES-KOH pH7.9, 60mM KCl, 75mM Tris pH7.8, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.375% NP-40. Nach jedem Waschen wurde die Sepharose 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert und der Überstand mit einer Kanüle (0.40 mm Durchmesser) abgezogen.

Zweiter Schritt der Immunpräzipitation war das sogenannte "preclearing", d.h. man führte die erste Immunpräzipitation mit dem Sepharose-gebundenen Kontroll-Kaninchenserum durch. Hierbei entfernt man die Proteine die unspezifisch an die Sepharose bzw. an die Antikörper aus nicht immunisierten Kaninchen binden. Hierzu wurde die ProteinA-Sepharose, die mit dem Kontroll-Kaninchenserum vorinkubiert worden war, mit dem <sup>35</sup>S-Methionin-markierten Cytoplasmaextrakt oder Medium einer 9cm PS für zwei Stunden unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert und mit dem Überstand, in einem dritten Schritt, die eigentliche Immunpräzipitation mit den spezifischen an ProteinA/G-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Die Sepharose wurde 2-4 Stunden bei 4°C unter Rotieren mit dem Überstand des "preclearings" inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Sepharose einmal mit Verdünnungspuffer, dreimal mit TSA und einmal mit 50mM Tris pH6.8 ge-

waschen und nach jedem Waschen 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert. Beim letzten Waschen wurde die Sepharose in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert und mit einer Kanüle (0.4mm Durchmesser) trockengesaugt. Die Sepharose wurde in 15µl 1x Laemmli-Probenpuffer (62.5mM Tris pH6.8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0.02% Bromphenolblau) 3 min aufgekocht und danach sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gradientengel (20%-7.5%) aufgetrennt, das Gel mit PPO aktiviert und auf einen Röntgenfilm bei -80°C aufgelegt.

## 22. Western-Analyse

Pro Punkt wurden  $2.0 \times 10^6$  HeLa-Zellen je 14cm PS angesetzt (10% FCS). Nach 40 Stunden wurden die Zellen nicht bestrahlt oder UV-bestrahlt. Nach der UV-Bestrahlung wurden die Zellen in Medium kultiviert, das kein FCS sondern nur BSA enthielt (pro PS 9ml Medium mit 25mg BSA). 48 Stunden nach der UV-Bestrahlung wurde das Medium abgenommen 3 min bei 300xg abzentrifugiert und der Überstand nochmals 10 min bei 16800xg abzentrifugiert. Dieser Überstand wurde mit TCA gefällt und auf einem SDS-Gradientengel aufgetrennt.

Die Proteine wurden mit einer "Feucht-Blot-Apparatur" bei 4°C mit 40V über Nacht (oder 4 Stunden mit 70V) auf eine PVDF-Membran übertragen (Blot-Puffer: 50mM Tris, 380mM Glycin, 1% SDS, 20% Ethanol). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mindestens 2x eine Stunde bei RT und unter Schütteln in Blocking-Lösung (10% Trockenmilchpulver, mager, in PBS) inkubiert. Danach wurde die Membran (12 x 6cm) in eine Plastikfolie eingeschweißt und mit dem primären Antikörper (IL-1α Antikörper, 1:500 verdünnt) in 2ml Inkubationslösung (Blocking-Lösung + 0.3% Tween) für 90 min bei RT auf einer sich drehenden Scheibe inkubiert. Danach wurde die Membran einmal mit Waschlösung (PBS + 0.3% Tween) abgespült und viermal 3 - 5 min mit je 100 - 150ml Waschlösung unter Schütteln gewaschen. Danach wurde die Membran wieder in eine Plastikfolie eingeschweißt und mit dem sekundären Antikörper (gegen Kaninchen IgG gerichteter Ziegen-

antikörper an den alkalische Phosphatase gekoppelt ist) in 3ml Inkubationslösung für 90 min bei RT auf der sich drehenden Scheibe inkubiert. Danach wurde die Membran einmal mit Waschlösung abgespült, zweimal 3 - 5 Minuten mit Waschlösung und zweimal 3 - 5 Minuten mit AP-Puffer pH7.5 (0.1M Tris, 0.1M NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% TritonX-100, mit HCl auf pH7.5 einstellen) gewaschen und dann in die Reaktionslösung gegeben. Zusammensetzung der Reaktionslösung: 5mg Nitro Blue Tetraolium (NBT) wurde in 15ml AP-Puffer pH9.5 (0.1M Tris, 0.1M NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub> mit HCl auf pH9.5 einstellen) auf einem Schüttler 1-2 min inkubiert. 2.5mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) wurde in 50ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und tropfenweise (aber dennoch rasch) unter leichtem Schütteln in die NBT-Stammlösung gegeben. Die so präparierte Entwicklerlösung wurde auf die Membran gegeben und diese im Dunkeln bei RT inkubiert. Wenn die Banden sichtbar waren, wurde die Membran kurz mit Wasser abgespült um die Reaktion abzustoppen. Es empfiehlt sich die gefärbte Membran im Dunkeln aufzubewahren bzw. gleich zu photographieren, da die gefärbten Membranen unter Lichteinwirkung verblassen.

### 23. Renaturierung

10ml der Kollagenase induzierenden Heparin-Sepharose Hochsalzfraktion (enthält genug Aktivität um 20 Aktivitätstests durchführen zu können), die aus etwa 250ml UV-Medium gereinigt worden waren, wurden mit Ammoniumsulfat (80% Sättigung) gefällt. Das Sediment wurde in 1% SDS, 10mM DTT, 1mM PMSF resuspendiert und im Deckel eines Eppendorf-Gefäßes zweimal 1.5 Stunden gegen je 250ml 0.1% SDS, 1mM DTT, 0.1mM PMSF dialysiert. Nach der Dialyse wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Zur Elektroelution wurden die Gelstücke mit je 250µl Elutionspuffer (20mM HEPES-KOH pH7.6, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% SDS, 200mg/ml BSA in Dialyseschläuche gegeben und 12 Stunden bei 50mA elektroeluiert. Nach den 12 Stunden wurde für 5 Minuten bei gleicher Stromstärke umgepolt (an dem Dialyseschlauch

haftendes Protein sollte sich dadurch wieder vom Dialyseschlauch lösen).

Die eluierten Proteine wurden anschließend mit der Methode von Wessel und Flügge (1984) ausgefällt: Zu 2.5ml Probe wurden 10ml Methanol gegeben; dann wurde gemischt und 20 sec bei 9000xg abzentrifugiert. Hierzu wurden 2.5ml Chloroform gegeben; dann wurde wiederum gemischt und 20 sec bei 9000xg abzentrifugiert. Nach Zugabe von 7.5ml H<sub>2</sub>O wurde erneut gemischt und 2 Minuten bei 9000xg abzentrifugiert. In der oberen Phase befindet sich nun Methanol und H<sub>2</sub>O, in der Unterphase das Chloroform und in der Interphase das Protein. Die obere Phase wurde verworfen und der Rest mit 7.5ml Methanol gemischt. Nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 9000xg wurde der Überstand verworfen und das Sediment getrocknet.

Das Sediment wurde in je 20µl TE-50 (1x TE mit 50mM NaCl), 1mM DTE aufgenommen und gut gelöst. Diese 20µl wurden zu 20mg vorgelegtem festen Harnstoff gegeben und 6µl H<sub>2</sub>O bidest. und 2µl DTE (100mM) zugesetzt. Es wurde geschüttelt bis der gesamte Harnstoff gelöst war. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurde 10 min bei 13000xg abzentrifugiert, der Überstand in 400µl Mix II (10mM Tris pH7.8, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTE, 250mg/ml BSA) gegeben, sofort gut durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurde die gesamte Menge (etwa 400µl) zusammen mit 400µl frischem Medium dreimal für je zwei Stunden gegen je einen Liter frisches Medium dialysiert. Nach der Dialyse wurde mit frischem Medium auf 2ml aufgefüllt, FCS bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und der Test auf Kollagenase induzierende Aktivität durchgeführt.

## **24. Proteinreinigung**

(durchgeführt auf einer HPLC und einer FPLC-Anlage)

### **a.) Q-Sepharose Säule**

400ml UV-Medium wurden mit Ammoniumsulfat (80% Sättigung) gefällt, das Sediment in 2ml Puffer A (0.02M Tris-HCl, 0.05M NaCl,

pH7.8) aufgenommen und zweimal 3 Stunden gegen je 2 Liter Puffer A dialysiert. Die nach der Dialyse erhaltenen 7ml Probe wurden mit einer Amicon-Kammer auf 1.5ml eingeengt. Die Probe wurde auf eine selbstgepackte Q-Sepharose Säule (Bettvolumen: 15ml) appliziert, die mit Puffer A äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit 3 Bettvolumen (=45ml) Puffer A wurde die Säule mit einem 150ml Gradienten von 50-1000mM NaCl entwickelt. Die Flußrate betrug 3ml/min. 7.5ml Fraktionen wurden gesammelt und auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurde je 1ml der Fraktionen dreimal je 2 Stunden gegen je 1 Liter frisches Medium dialysiert. Nach der Dialyse wurde jeder Probe (Volumen etwa 1ml) 1ml frisches Medium und FCS bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und jede Probe auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet.

#### **b.) Heparin-Sepharose Säule**

380ml Ko- oder UV-Medium wurden mit Ammoniumsulfat gefällt, das Sediment in Puffer A (0.02M Tris-HCl, 0.05M NaCl, pH7.6) aufgenommen und dreimal 2 Stunden gegen je 1 Liter Puffer A dialysiert. Die Probe (etwa 20ml) wurde dann auf eine selbstgepackte Heparin-Sepharose Säule (Bettvolumen: 18ml) appliziert, die mit Puffer A äquilibriert worden war. Nach dem Waschen der Säule mit 140ml Puffer A wurde die Säule mit einem 200ml Gradienten von 50 - 2000mM NaCl entwickelt. Die Flußrate bei Applikation und Elution betrug 0.25ml/min, beim Waschen 0.5ml/min. 10ml Fraktionen wurden gesammelt und je 1ml der Fraktionen auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden die Proben, wie unter a.) für die Q-Sepharose Säule beschrieben, behandelt.

Alle hier geschilderten Schritte der Proteinreinigung wurden bei 4°C durchgeführt.

### **25. Inkubation der Säulenfraktionen mit Antikörpern**

Die Antikörper (5µl anti IL-1α, 25µl anti IL-1β, 25µl anti TNFα, 15µl anti IL-6, 15µl anti PDGF, 15µl anti aFGF, 10µl anti bFGF, 50µl anti TCSF) wurden zuerst an ProteinA-Sepharose (alle Antikörper außer den TCSF-Antikörpern) oder an ProteinG-Sepharose (monoklonale TCSF-Antikörper) gekoppelt. Hierzu wurden die Antikörper mit 50µl

der ProteinA/G-Sepharose [ 1:1 mit TSA (10mM Tris pH8.0, 140mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>) äquilibriert] für zwei Stunden unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose, an die jetzt die Antikörper gebunden waren, dreimal mit 500µl PBS gewaschen. Nach jedem Waschen wurde die Sepharose 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle (0.40mm Durchmesser) vollständig abgezogen.

Zu dieser Sepharose wurde 1ml der in Frage kommenden Säulenfraktionen gegeben. Diese waren, wie unter Abschnitt 23 beschrieben, gegen frisches Medium dialysiert worden. Das Ganze wurde für 2-4 Stunden unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Danach wurde 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals, um alle Sepharosepartikel abzutrennen, 15 sec bei 10000xg abzentrifugiert. Diesem Überstand wurde 1ml frisches DMEM und 1% FCS zugesetzt. Die so behandelten Proben wurden dann auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. In dem Versuch, der im Ergebnisteil in Abschnitt 5 (Abb.9) beschrieben ist, wurde etwas anders vorgegangen: Je 1ml der in Frage kommenden, gegen Medium dialysierten, Säulenfraktionen wurde mit dem Antiserum für 2 Stunden unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Danach wurde 1ml frisches Medium und 1% FCS zugesetzt und die Proben in Gegenwart der Antikörper auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet.



# Ergebnisse

## 1. UV-Bestrahlung führt zur Sekretion des extrazellulären Proteinsynthese induzierenden Faktors "EPIF".

### 1.1. EPIF-Aktivität läßt sich auch im Medium UV-bestrahlter menschlicher Zellen, epithelialen Ursprungs, nachweisen.

Ultraviolette Strahlung führt in Säugerzellen zu einer ganzen Reihe von genetischen Veränderungen. Neben der Erhöhung der Mutations- und Aberrationsrate (Protic-Sabljić et al., 1986) und der verstärkten Replikation einzelner Gene (Gen-Amplifikation) (Lücke-Huhle et al., 1986, 1989, Schimke et al., Lavi et al.) kommt es nach UV-Bestrahlung auch zur transkriptionellen Aktivierung spezifischer Gene (Büscher et al., 1988, Fornace et al., 1988, Kartasova und van der Putte, 1988, Maltzman und Czyzyk, 1984, Rotem et al., 1987, Miskin und Ben-Ishai, 1981, Stein et al., 1989a, 1989b, 1988, Valerie et al., 1988, Schorpp et al., 1984, Krämer et al., 1990). Zur dieser Aktivierung kommt es auch dann, wenn man unbestrahlte Zellen mit dem Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen behandelt. Dies zeigt, daß das Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen im Gegensatz zum Kulturmedium unbestrahlter Zellen einen Faktor (EPIF) enthält, der nach UV-Bestrahlung vermehrt im Medium auftritt und das gleiche genetische Programm induziert wie UV-Bestrahlung selbst (Schorpp et al., 1984). Eines der Gene, das durch diesen extrazellulären Faktor aktiviert wird, ist das Kollagenase-Gen, das für eine extrazelluläre Protease kodiert (Brinckerhoff und Auble, 1990, Harris et al., 1984). EPIF-Behandlung führt zu einer Akkumulation der Kollagenase mRNA und zu einer erhöhten Neusynthese und Sekretion des Kollagenase Proteins. *Abb. 1* zeigt, daß EPIF-Aktivität nicht nur im Medium UV-bestrahlter Fibroblasten sondern auch im Medium UV-bestrahlter Zellen epithelialen Ursprungs (HeLa-Zellen) nachzuweisen war. Hierzu wurden primäre menschliche Fibroblasten (NFB) mit Medium von nicht bestrahlten und UV-bestrahlten Fibroblasten oder Medium von nicht bestrahlten und UV-bestrahlten HeLa-Zellen behandelt.

Nach einer Behandlungszeit von 12 Stunden wurden die Zellen für 2 Stunden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert, die sezernierten Proteine mit TCA gefällt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Bei der mit dem Pfeil gekennzeichneten Bande handelt es sich um das Kollagenase Protein (siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.). Die stärkere Induktion der Kollagenase durch Medium UV-bestrahlter HeLa-Zellen (im Vergleich zu NFB) läßt sich folgendermaßen erklären: Bei der Herstellung von EPIF-enthaltendem Medium befinden sich auf der gleichen Petrischalen-Fläche etwa 8x so viele HeLa-Zellen wie NFB ( da die HeLa-Zellen wesentlich kleiner sind als die NFB). Da mehr Zellen auch mehr EPIF sezernieren können, ist die stärkere Kollagenase-Induktion durch konditioniertes Medium UV-be-strahlter HeLa-Zellen auch zu erwarten.

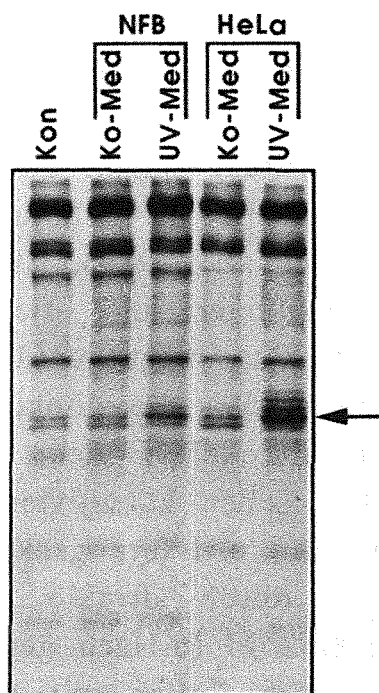


Abb.1: Medium normaler menschlicher Fibroblasten und Medium epithelialer Zellen zeigt EPIF-Aktivität. Normale menschliche Fibroblasten wurden nicht behandelt (Kon) oder mit konditioniertem Medium unbestrahlter (Ko-Med) oder bestrahlter Zellen (UV-Med) behandelt. Das konditionierte Medium stammte von normalen menschlichen Fibroblasten (NFB) oder von HeLa-Zellen (HeLa). Die behandelten Zellen wurden 12h nach der Behandlung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 2h pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

## 1.2. Nachweis der Existenz EPIF's mit Hilfe von Kokultivierungsexperimenten.

Die Existenz dieses extrazellulären, UV-induzierten Faktors ließ sich auch in einem anderen Versuchsansatz, nämlich in Kokultivierungsexperimenten, nachweisen. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, daß EPIF nicht nur die Transkription endogener Gene, sondern auch die Transkription stabil oder transient transfizierter Gene erhöht. Dies gilt z.B. auch für ein HIV-1 Promoter Gen-Konstrukt (Stein et al., 1989a).

In diesen Kokultivierungsexperimenten wurden UV-bestrahlte oder nicht bestrahlte Zellen, die nicht transfiziert waren, zusammen mit Zellen kultiviert, die transient mit diesem Gen-Konstrukt transfiziert und unbehandelt waren. Bei dem verwendeten Konstrukt handelte es sich um ein chimäres Gen-Konstrukt, welches den Bereich -121/+232 des HIV-LTR, gekoppelt an das bakterielle Chloramphenicol - Acetyltransferase (CAT) - Reporter gen enthält (*Abb. 2, rechts*). Dieses Konstrukt enthält die DNA-Sequenzen, die für die UV-Induktion und die EPIF-Induktion des HIV-LTR verantwortlich sind (Stein et al., 1989a, 1989b). Das Konstrukt wurde in HeLa-Zellen transfiziert und die CAT-Enzymaktivität gemessen. Wie *Abb.2 (links)* zeigt, wird die Expression des Konstruktes in den Zellen erhöht, die direkt UV-bestrahlt wurden und auch in den Zellen, die selbst nicht UV-bestrahlt wurden, sondern mit UV-bestrahlten Zellen kokultiviert worden waren. Der Induktionsfaktor in den Kokultivierungsexperimenten ist etwa identisch mit dem, der durch direkte UV-Bestrahlung der transfizierten Zellen erreicht wird (6.1fach gegenüber 8.1fach). Dies zeigt, daß die UV-bestrahlten Zellen mit hoher Effizienz EPIF sezernieren und ist neben den in Abschnitt 1.1. dargestellten Experimenten mit konditioniertem Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen ein weiterer Beweis für die Existenz eines extrazellulären Faktors, der in unbestrahlten Zellen das gleiche genetische Programm induziert wie UV-Bestrahlung selbst.

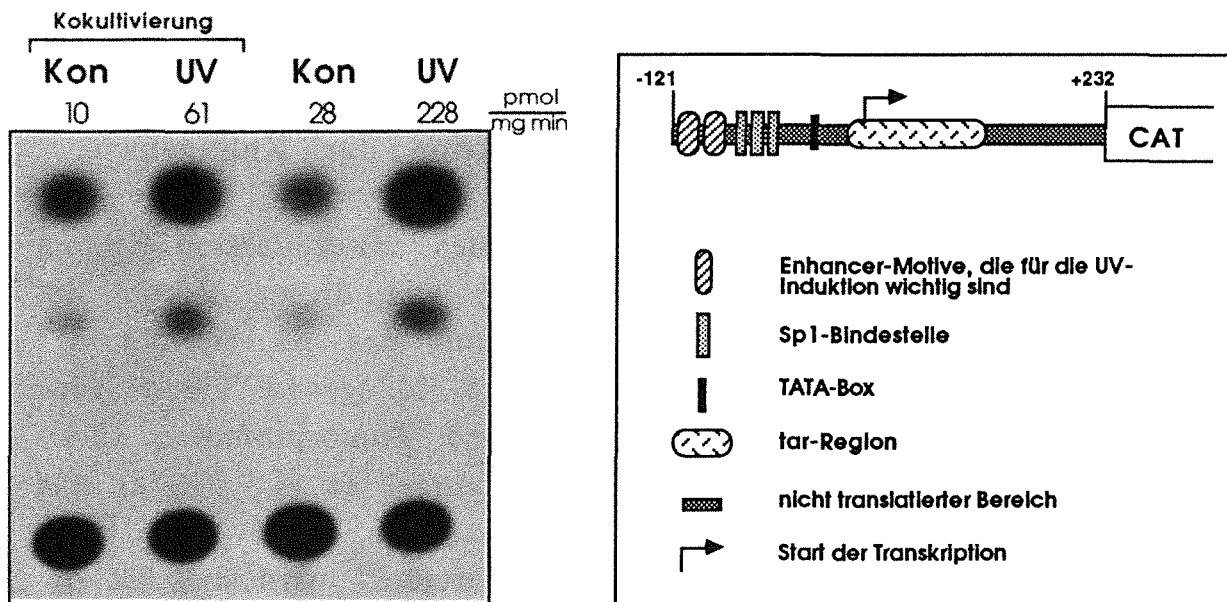


Abb.2: Kokultivierung von bestrahlten nicht transfizierten Zellen mit unbestrahlten HIV-1 transfizierten Zellen führt zu einer Erhöhung der HIV-1 vermittelten CAT-Aktivität. HeLa-Zellen wurden mit einem -121/+232 HIV-1 CAT-Konstrukt (rechte Abbildung) transfiziert und für 24h in Medium kultiviert, das 0.5% FCS enthält. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und im Verhältnis 1:1 mit nicht transfizierten Zellen (die auch 24h lang in Medium, das 0.5% FCS enthält, kultiviert worden waren) gemischt. 20 min vor dem Mischen der Zellen waren die nicht transfizierten Zellen nicht bestrahlt (Kon) oder mit  $45\text{J/m}^2$  UV-bestrahlt (UV) worden. 40h nach dem Mischen wurde die CAT-Aktivität bestimmt (Kon/UV-Kokultivierung). Die angegebene CAT-Aktivität bezieht sich auf die Proteinmenge der transfizierten Zellen. Die beiden Spuren rechts zeigen die CAT-Aktivität von HeLa-Zellen, die mit dem gleichen Konstrukt transfiziert worden waren und nicht bestrahlt (Kon) oder mit  $45\text{J/m}^2$  UV-bestrahlt (UV) worden waren. 40h nach der Bestrahlung wurde die CAT-Aktivität bestimmt. Sie ist in  $\text{pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  angegeben. Der rechte Teil der Abbildung zeigt das eingesetzte HIV-1 CAT-Konstrukt und dessen schematischen Aufbau.

## 2. Suramin beeinflusst die durch UV-Bestrahlung induzierte Signalkette.

### 2.1. Suramin hemmt die EPIF-Induktion der Kollagenase.

Nachdem die Existenz eines UV-induzierten extrazellulären Faktors bewiesen war, stellte sich die Frage, wie dieser Faktor die Signalkette in Gang setzt, die u.a. mit der Aktivierung des Kollagenase-Gens endet. Für zwei andere Kollagenase induzierende Faktoren, nämlich den Phorbol-ester und Tumorpromoter 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) (Angel et al., 1987a) und das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  (Postlewaite et al., 1983) ist diese Frage bereits weitgehend geklärt. Als TPA-"Rezeptor" wird die Proteinkinase C, ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Enzym, welches durch die Bindung von Diacylglycerol reguliert wird, angesehen (Blumberg, 1988, Nishizuka, 1984). Als hydrophobe Substanz kann TPA in die Zellmembran eindringen und durch seine diacylglycerol-ähnliche Struktur an dieselbe Domäne der PKC binden, wie der physiologische Ligand und dadurch das Enzym aktivieren. Beim Cytokin IL-1 $\alpha$  verläuft dieser erste Teil der Signalkette dagegen anders. IL-1 $\alpha$  ist ein wasserlösliches Molekül, das viel zu hydrophil ist um die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran zu passieren. Stattdessen bindet es an spezifische Rezeptorproteine an der Zelloberfläche (Dinarello et al., 1989, Mizel et al., 1987) und setzt dadurch die Signalkette in Gang.

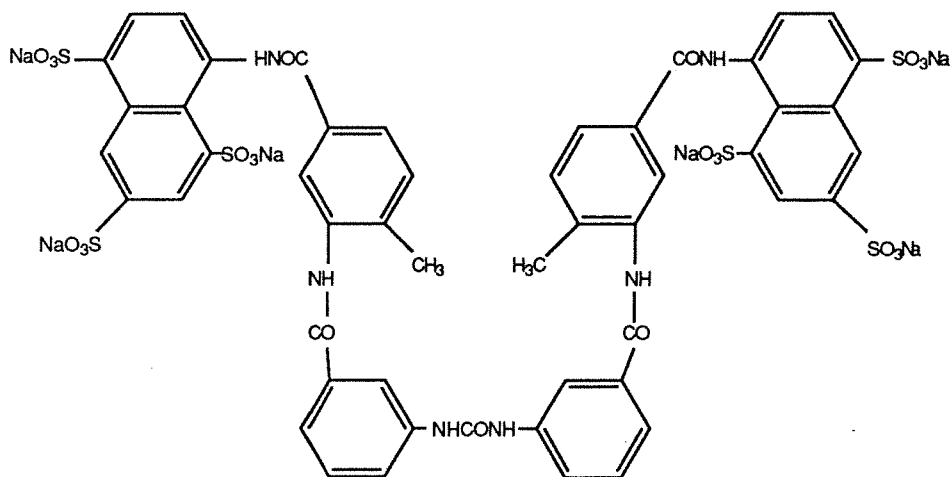


Abb.3: Strukturformel von Suramin

Um zu untersuchen, ob EPIF, wie TPA, die Plasmamembran passieren kann oder ob es, wie IL-1 $\alpha$ , Rezeptoren auf der Plasmamembran benötigt um die Signalkette in Gang zu setzen, wurden Experimente mit dem Polyanion Suramin durchgeführt. In *Abb.3* ist die Strukturformel von Suramin dargestellt. Suramin ist als eine Substanz beschrieben worden, die die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit ihren Membranrezeptoren verhindert, bzw. dazu führt, daß sich bereits gebundener Faktor wieder von seinem Rezeptor löst (Fantini et al., 1989, Coffey et al., 1987). Demzufolge sollte die TPA-Induktion der Kollagenase durch Suramin nicht gehemmt, die IL-1 $\alpha$ -Induktion der Kollagenase hingegen gehemmt werden.

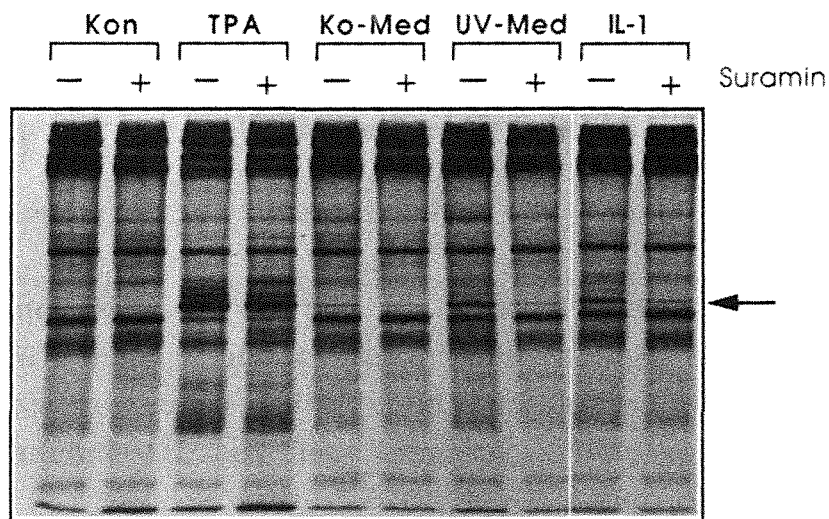


Abb.4: Suramin hemmt die EPIF-Induktion der Kollagenase. Normale menschliche Fibroblasten wurden nicht behandelt (Kon), mit 60ng/ml TPA (TPA), mit 30ng/ml IL-1 $\alpha$  (IL-1), mit Medium von unbestrahlten Zellen (Ko-Med) oder Medium von bestrahlten Zellen (UV-Med) behandelt und zwar in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Suramin. Suramin wurde in einer Endkonzentration von 0.3mM eingesetzt und gleichzeitig mit den Induktoren auf die Zellen gegeben. 12h nach der Behandlung wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

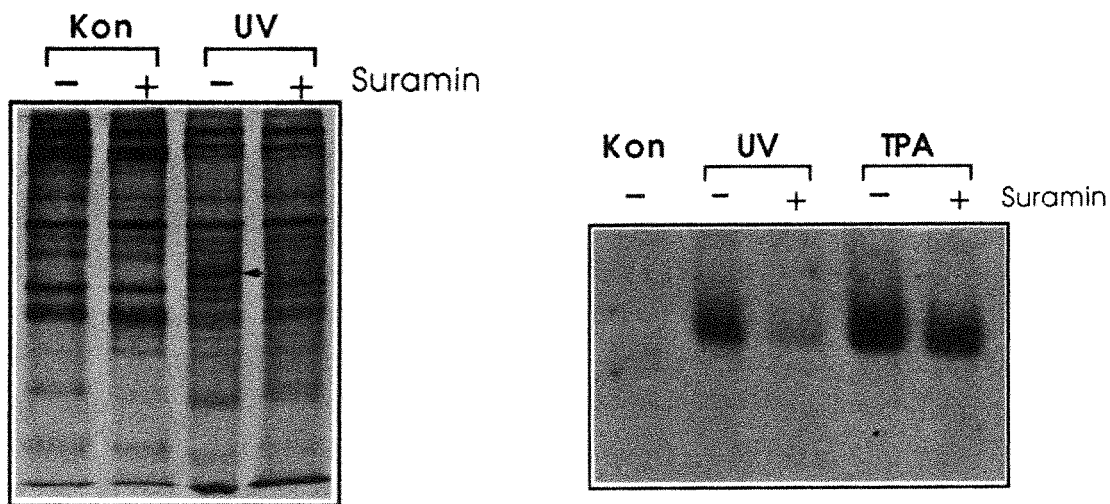
Um zu untersuchen, wie sich EPIF verhält, wurden primäre menschliche Fibroblasten mit TPA, IL-1 $\alpha$  oder EPIF behandelt und zwar in Anwesenheit oder Abwesenheit von Suramin. Die Zellen wurden 12 Stunden nach der Behandlung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. *Abb.4* zeigt, daß die TPA-Induktion der Kollagenase nicht gehemmt, die IL-1 $\alpha$ -Induktion und die EPIF-Induktion der Kollagenase dagegen gehemmt wird. Suramin erniedrigt auch die "basale" Menge an Kollagenase Protein, d.h. die Menge an neusynthetisiertem Kollagenase Protein, die von unbehandelten Zellen sezerniert wird; dies ist ein Hinweis darauf, daß auch das Basalniveau der Kollagenase-Synthese über eine Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion reguliert wird. Diese Experimente zeigen, daß es sich bei EPIF mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Signalmolekül handelt, das die Bindung an einen Rezeptor benötigt, um seine Wirkung (in diesem Fall die Induktion der Kollagenase) ausüben zu können.

## **2.2. Suramin hemmt die UV-Antwort der bestrahlten Zelle.**

Es könnte sein, daß EPIF nicht nur die UV-Antwort von bestrahlten auf unbestrahlte Zellen übermittelt, sondern auch für die UV-Induktion in den bestrahlten Zellen selbst verantwortlich ist. Wenn dies so ist, dann sollte Suramin auch die UV-Induktion in den bestrahlten Zellen verhindern.

Um diese Frage zu beantworten, wurde untersucht, ob Suramin die UV-induzierte Neusynthese des Kollagenase Proteins und die UV-induzierte Akkumulation von c-fos mRNA hemmt. Hierzu wurden Xeroderma-Pigmentosum-Zellen (bei normalen menschlichen Fibroblasten werden diese Gene erst nach einer Bestrahlung mit  $30\text{J}/\text{m}^2$  aktiviert), die nicht bestrahlt oder UV-bestrahlt worden waren ( $2\text{J}/\text{m}^2$ ) und mit oder ohne Suramin kultiviert wurden, 44 Stunden nach der Bestrahlung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Für die Messung der c-fos RNA-Akkumulation wurde polyA<sup>+</sup>-mRNA aus nicht bestrahlten, UV-bestrahlten und TPA-behandelten XP-Zellen präpariert, die mit oder ohne Suramin kultiviert worden waren. Die

Menge an c-fos mRNA wurde mit Hilfe einer Northern-Hybridisierung bestimmt. Hierzu wurde die RNA auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einer viralen fos-Probe hybridisiert. Die virale fos-Probe kreuzreagiert mit der zellulären fos mRNA. Durch eine Kontrollhybridisierung war nachgewiesen worden, daß gleiche Mengen an RNA eingesetzt worden waren (Daten nicht gezeigt). *Abb.5* zeigt, daß sowohl die UV-Induktion der Kollagenase (*linke Abb.*), als auch die UV-Induktion von c-fos (*rechte Abb.*) durch Suramin gehemmt wird. Die TPA-Induktion von c-fos wird durch Suramin nicht beeinflußt (*rechte Abb.*).



*Abb.5:* Suramin hemmt die UV-induzierte Synthese des Kollagenase-Proteins und die UV-induzierte Akkumulation der c-fos mRNA. Linke Abbildung: XP-Zellen wurden nicht bestrahlt (Kon) oder mit  $2\text{J/m}^2$  UV-bestrahlt (UV) und zwar in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Suramin (Endkonzentration  $0.3\text{mM}$ ). 44h nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein. Rechte Abbildung: XP-Zellen wurden nicht behandelt (Kon), mit  $60\text{ng/ml}$  TPA (TPA) behandelt oder mit  $2\text{J/m}^2$  UV-bestrahlt (UV). 60 Minuten vor der UV-Bestrahlung bzw. der TPA-Behandlung wurde Suramin (+) in einer Endkonzentration von  $0.3\text{mM}$  oder kein Suramin (-) auf die Zellen gegeben. 45 Minuten nach der Induktion wurde die mRNA präpariert. Je  $5\ \mu\text{g}$  polyA<sup>+</sup>-RNA aus diesen Zellen wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf HybondN<sup>+</sup> übertragen und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten viralen fos cDNA-Probe hybridisiert.



Die UV-Induktion der Kollagenase in XP-Zellen ist ein relativ langsamer Prozeß, der frühestens 24 Stunden nach der UV-Bestrahlung nachweisbar ist. Man könnte sich also durchaus vorstellen, daß dieser langsame Prozeß über einen extrazellulären Faktor verläuft. Die Hemmung der UV-Induktion von c-fos durch Suramin ist dagegen nur schwer zu verstehen. Das Protooncogen c-fos gehört zur Gruppe der sogenannten "immediate-early" Gene und wird durch UV-Bestrahlung sehr schnell aktiviert (Büscher et al., 1988). Für diese Aktivierung ist keine Protein-Neusynthese notwendig und die Akkumulation der c-fos mRNA erreicht bereits 30 Minuten nach der UV-Bestrahlung ein Maximum. Man kann sich nur schwer vorstellen, daß eine solch schnelle Reaktion über einen extrazellulären Faktor verläuft. Bei den, in diesem Abschnitt, beschriebenen Experimenten wurde davon ausgegangen, daß Suramin die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren auf der Plasmamembran verhindert. Dies scheint nach neueren Erkenntnissen nur zum Teil richtig zu sein. Suramin hemmt zwar die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren (Fantini et al., 1989, Coffey et al., 1987), aber die Substanz gelangt auch in die Zelle hinein (Huang und Huang, 1988, Constantopoulos et al., 1980). Die hier mit Suramin erhaltenen Ergebnisse zeigen also, daß sowohl die EPIF-Induktion der Kollagenase als auch die UV-Induktion der Kollagenase und die UV-Induktion von c-fos über eine Signalkette verlaufen, die auch eine Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion beinhaltet. Diese Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion muß aber nicht an der Plasmamembran stattfinden. In der Diskussion wird auf diese Frage näher eingegangen.

### **3. Vorversuche zur EPIF-Reinigung.**

Hauptziel der Arbeit war die Reinigung, Identifizierung und Charakterisierung der Faktoren, die für die EPIF-Aktivität verantwortlich sind. Im Folgenden wird kurz erläutert, von welchem Kulturmedium bei der Reinigung ausgegangen wurde und wie die EPIF-Aktivität der bei der Reinigung erhaltenen Fraktionen nachgewiesen wurde.

### **3.1. Herstellung von EPIF-enthaltendem Kulturmedium.**

Als "Produzenten" von EPIF-Medium wurden HeLa-Zellen ausgewählt. Es handelt sich bei diesen Zellen um adhärent wachsende Cervix-Karzinom-Zellen. Da sie eine kurze Generationszeit (etwa 24 Stunden) besitzen, war es möglich, sie in großer Zahl zu ziehen und relativ große Mengen an Zellüberstand zu ernten. Die Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, angesetzt und UV-bestrahlt. Nach der UV-Bestrahlung wurden die Zellen in Medium kultiviert, dem kein fötales Kälberserum (FCS) sondern nur 0.05mg Rinderserumalbumin (BSA)/ml zugesetzt worden war. Dadurch sollte die Menge an nicht definierten Proteinen und anderen Faktoren möglichst klein gehalten werden. Dieses Medium wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, geerntet und weiterbehandelt. In der Arbeit wird EPIF-enthaltendes Medium, also konditioniertes Medium, das 40-48 Stunden nach UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen geerntet wurde, als UV-Medium (UV-Med.), konditioniertes Medium, das von unbestrahlten HeLa-Zellen geerntet wurde, als Ko-Medium (Ko-Med.) bezeichnet.

### **3.2. Nachweis der Kollagenase induzierenden Aktivität von EPIF.**

EPIF hat, wie oben beschrieben, eine ganze Reihe von biologischen Aktivitäten. Eine dieser biologischen Aktivitäten, nämlich die Fähigkeit die Neusynthese und Sekretion des Kollagenase-Proteins zu induzieren, wurde als Parameter zur EPIF-Reinigung ausgewählt, da für diese Aktivität die beste Nachweismethode existierte. Der Nachweis bestand darin, daß primäre menschliche Fibroblasten mit den in Frage kommenden Fraktionen behandelt und 8-12 Stunden danach mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert wurden. Die sezernierten Proteine wurden anschließend auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert. *Abb.6* zeigt ein typisches Autoradiogramm eines Experimentes (genauere Beschreibung siehe Material und Methoden), in dem normale menschliche Fibroblasten mit TPA oder UV-Medium behandelt worden waren. Die Menge an neusynthetisiertem, sezerniertem Kollagenase Protein, d.h. die Dicke der mit dem Pfeil gekennzeichneten Bande, war das Maß für

die Menge an EPIF-Aktivität in den getesteten Fraktionen. Der Nachweis, daß es sich bei dieser Protein-Bande um die Kollagenase handelt, war sowohl durch einen limitierten V8-Protease Verdau (Daten nicht gezeigt), als auch durch eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen das menschliche Kollagenase Protein gerichtet war, erbracht worden (Abb.6).

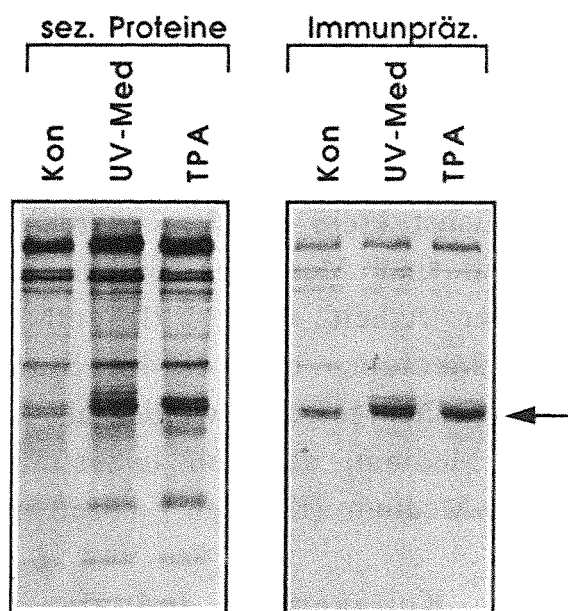


Abb.6: Bei dem, durch UV-Bestrahlung und TPA-Behandlung, induzierten Protein handelt es sich um das Kollagenase Protein. Normale menschliche Fibroblasten wurden nicht behandelt (Kon), mit Medium bestrahlter HeLa-Zellen behandelt (UV-Med) oder mit 60ng/ml TPA (TPA) behandelt. Nach 12h wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert. Die sezernierten Proteine wurden entweder direkt auf einem SDS-Gel aufgetrennt (sez. Proteine, links) oder mit Antikörpern, die gegen das menschliche Kollagenase Protein gerichtet waren, immunpräzipitiert und die immunpräzipitierten Proteine dann auf einem SDS-Gel aufgetrennt (Immunpräz., rechts). Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Wenn im Folgenden von EPIF-Reinigung die Rede ist, so ist damit immer die Reinigung dieser Kollagenase induzierenden Aktivität gemeint.

#### **4. Reinigung der Kollagenase induzierenden Aktivität des extrazellulären Proteinsynthese induzierenden Faktors.**

Der erste Schritt bei der EPIF-Reinigung war eine Ammoniumsulfat-Fällung (80% Sättigung). Durch diese Fällung wurden die im Medium enthaltenen Proteine auf möglichst schonende Art und Weise eingeengt. Die so konzentrierten Proteine wurden danach mit verschiedenen chromatographischen Techniken aufgetrennt. Die Durchfluß-, Wasch- und Gradientenfraktionen wurden, wie oben beschrieben, auf ihre Kollagenase induzierende Aktivität getestet (nähere Angaben hierzu: unter Material und Methoden, Abschnitt 24). Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Die gezeigten Elutionsprofile und die dazu gehörenden Tests auf Kollagenase induzierende Aktivität, stehen exemplarisch für eine Vielzahl solcher Experimente. Die dabei eingesetzten chromatographischen Techniken waren die Ionenaustauschchromatographie und die Affinitätschromatographie. Das Trennprinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf einem Ionenbindungsgleichgewicht zwischen geladenen Gruppen an einer festen Phase und ladungstragenden Proteinen in einer flüssigen Phase. Diese Technik hat gegenüber der Gelfiltration und der Affinitätschromatographie den Vorteil, relativ große Volumen zu konzentrieren und dabei mit hoher Flußrate in angemessener Zeit reinigen zu können. Bei der Affinitätschromatographie kommt es zu einer spezifischen Komplexbildung zwischen einem matrixgebundenen Reaktionspartner und einem gelösten Molekül.

##### **4.1. Eine Kollagenase induzierende Aktivität bindet an einen Anionenaustauscher.**

Ammoniumsulfat-gefälltes Medium UV-bestrahlter HeLa-Zellen wurde über eine Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose) gegeben. *Abb.7a* zeigt das chromatographische Profil dieser Reinigung, *Abb.7b* den dazu gehörenden Test auf Kollagenase induzierende Aktivität mit ausgewählten Fraktionen.

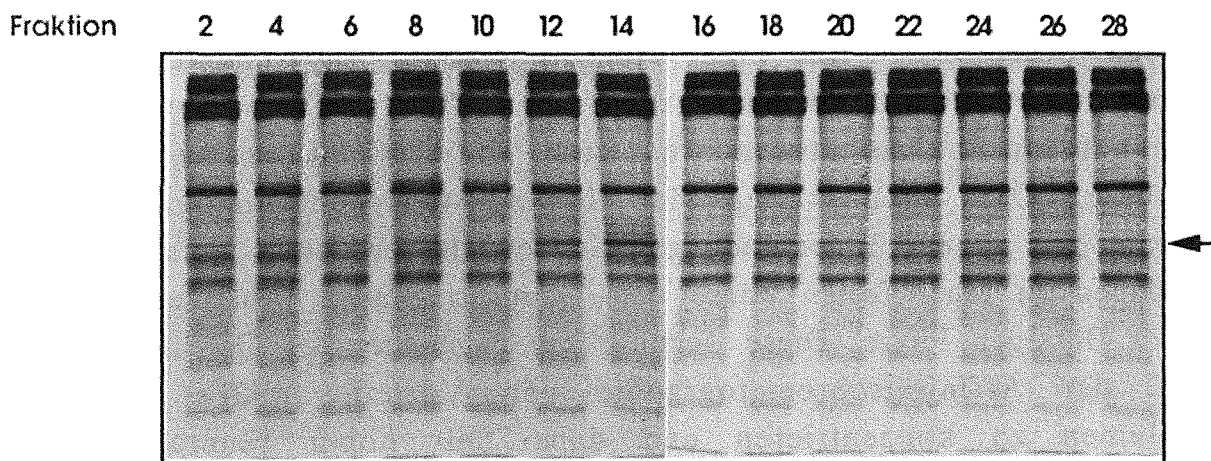
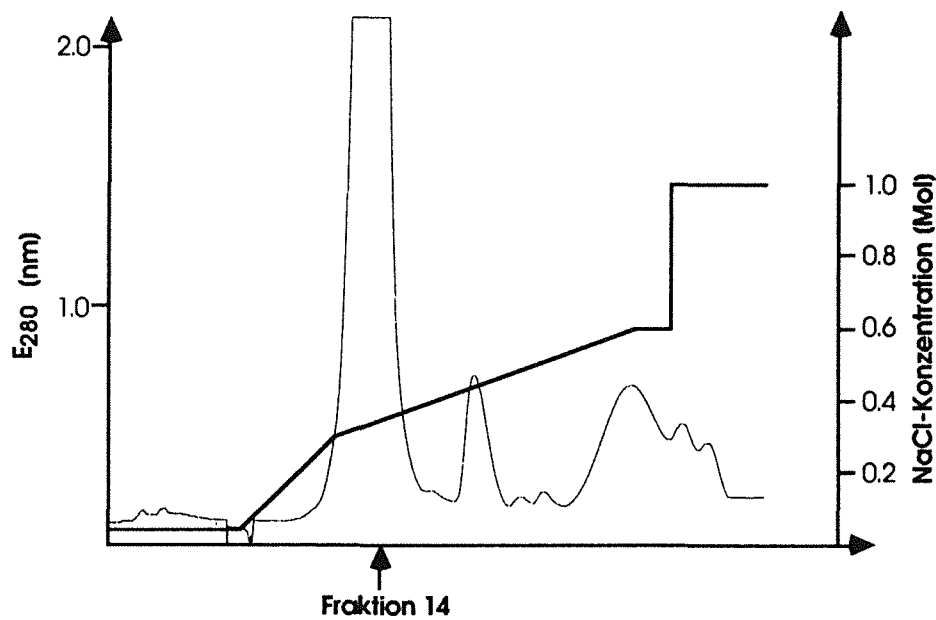


Abb.7: Auftrennung von Medium UV-bestrahlter HeLa-Zellen mittels einer Q-Sepharose-Säule. Abb.7 (oben) zeigt das chromatographische Profil der Q-Sepharose-Säule. Nach Applikation der Probe (die Zusammensetzung und das Aufarbeiten der Probe ist unter Material und Methoden im Abschnitt 24a genauer beschrieben) wurde mit Puffer, der 0.05M NaCl enthielt gewaschen und dann mit einem NaCl-Gradienten eluiert (von 0.05M bis 0.6M wurde mit einem linearen Gradienten eluiert und von 0.6M bis 1.0M mit einem Stufengradienten). Fraktion 14 enthielt die Kollagenase induzierende Aktivität. Abb.7 (unten) zeigt den Test auf Kollagenase induzierende Aktivität. Normale menschliche Fibroblasten wurden mit 1ml der insgesamt 7.5ml enthaltenden Fraktionen 2,4,6-28 behandelt (nähere Angaben hierzu: Material und Methoden, Abschnitt 24a). 12h nach der Behandlung wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Die gebundenen Proteine wurden mit einem teils linearen, teils stufigen NaCl-Gradienten eluiert. Ein Vergleich des Elutionsprofils (*Abb.7a*) und des Aktivitätstests (*Abb.7b*) zeigt, daß der Reinigungseffekt sehr gering ist, da die Kollagenase induzierende Aktivität genau in den Fraktionen zu finden ist, die auch den weitaus größten Teil der Proteine enthalten. Durch dieses Experiment ließ sich aber zumindest eine Aussage über die Ladung der Proteine machen, die für die, in diesem Versuch nachgewiesene, Kollagenase induzierende Aktivität verantwortlich sind. Da sie an einen Anionenaustauscher binden, sollten sie unter den hier eingesetzten Pufferbedingungen eine negative Nettoladung tragen. Wegen des geringen Reinigungseffekts wurde diese Trenntechnik bei der weiteren Reinigung allerdings nicht mehr eingesetzt.

#### **4.2. Mit einer Heparin-Sepharose-Säule lassen sich drei Kollagenase induzierende Aktivitäten voneinander trennen.**

Ammoniumsulfat-gefälltes Ko-Medium und UV-Medium wurde über eine Heparin-Sepharose-Säule gegeben. Bei Heparin-Sepharose handelt es sich um kovalent an Sepharose gebundenes Heparin. Dieses Säulenmaterial wird u.a. auch zur Aufreinigung von Koagulationsfaktoren des Blutplasmas (Miller-Andersson et al., 1974) und von DNA-bindenden Proteinen (Bickle et al., 1977) eingesetzt. *Abb.8a und 8b* zeigen die Aktivitätstests und das dazugehörige chromatographische Profil, das für Ko-Medium und UV-Medium identisch aussah. Da Vorversuche gezeigt hatten, daß zumindest eine Kollagenase induzierende Aktivität offenbar eine sehr hohe Affinität zu Heparin-Sepharose hat, wurde das gebundene Material mit einem Gradienten eluiert, der so gewählt war, daß er im hochmolaren Bereich gut auftrennt. Nach Applikation der Probe und Waschen der Säule mit 0.05M NaCl wurde zuerst mit 0.75M NaCl eluiert um die Proteine zu eluieren, die mit geringer Affinität an die Säule binden. Danach wurden die mit hoher Affinität gebundenen Proteine mit einem gut auftrennenden, d.h. relativ "flachen" linearen NaCl-Gradienten von 0.75M bis 2.0M NaCl eluiert.

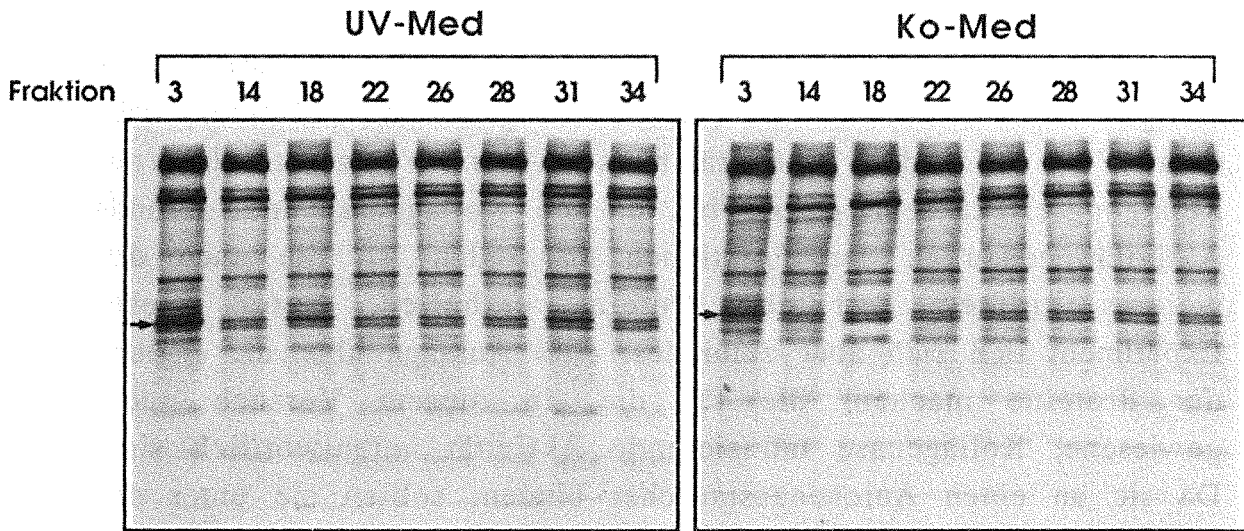


Abb.8: Auftrennung von Medium unbestrahlter und bestrahlter HeLa-Zellen mittels einer Heparin-Sepharose-Säule.

Abb.8a: Test der Heparin-Sepharose-Fractionen auf Kollagenase induzierende Aktivität. Fractionen der Heparin-Sepharose-Säule, die bei der Auftrennung von 360ml Medium unbestrahlter (Ko-Med) oder von Medium UV-bestrahlter Zellen (UV-Med) erhalten worden waren, wurden auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden normale menschliche Fibroblasten mit jeweils 1ml der einzelnen, insgesamt 10ml enthaltenden, Fractionen behandelt (nähere Angaben hierzu: Material und Methoden, Abschnitt 24b). 12h danach wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

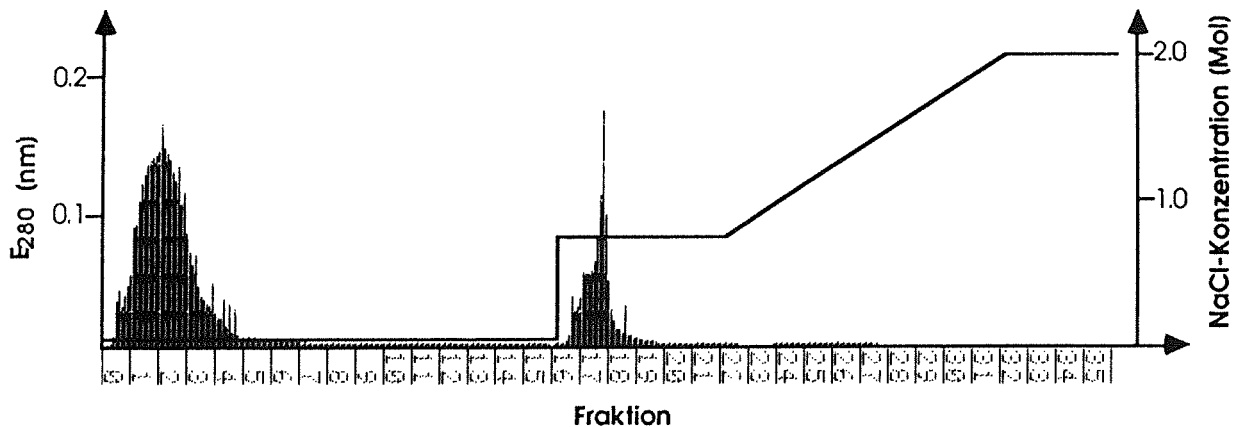


Abb.8b: Chromatographisches Profil der Heparin-Sepharose-Säule. Nach Applikation der Probe (die Zusammensetzung und das Aufarbeiten der Probe ist unter Material und Methoden im Abschnitt 24b genauer beschrieben), die in diesem Fall von UV-bestrahlten HeLa-Zellen stammte, wurde mit Puffer, der 0.05M NaCl enthielt gewaschen und dann mit einem NaCl-Gradienten eluiert (von 0.05M bis 0.75M wurde mit einem Stufengradienten und von 0.75M bis 2.0M mit einem linearen Gradienten eluiert).

Abb.8a zeigt, daß im UV-Medium drei Kollagenase induzierende Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Die Aktivitäten befinden sich im Durchlauf (Fraktion 3), in der Fraktion (18), die mit 0.75M NaCl eluiert wurde und in der Fraktion (31), die mit 1.9M NaCl eluiert wurde. Im Ko-Medium war nur eine Kollagenase induzierende Aktivität im Durchlauf nachweisbar. Eine quantitative Auswertung wurde mit Hilfe eines Laserdensitometers durchgeführt. Hierzu wurde die Intensität der Bande, die dem Kollagenase Protein entspricht, densitometrisch bestimmt (Abb.8c).

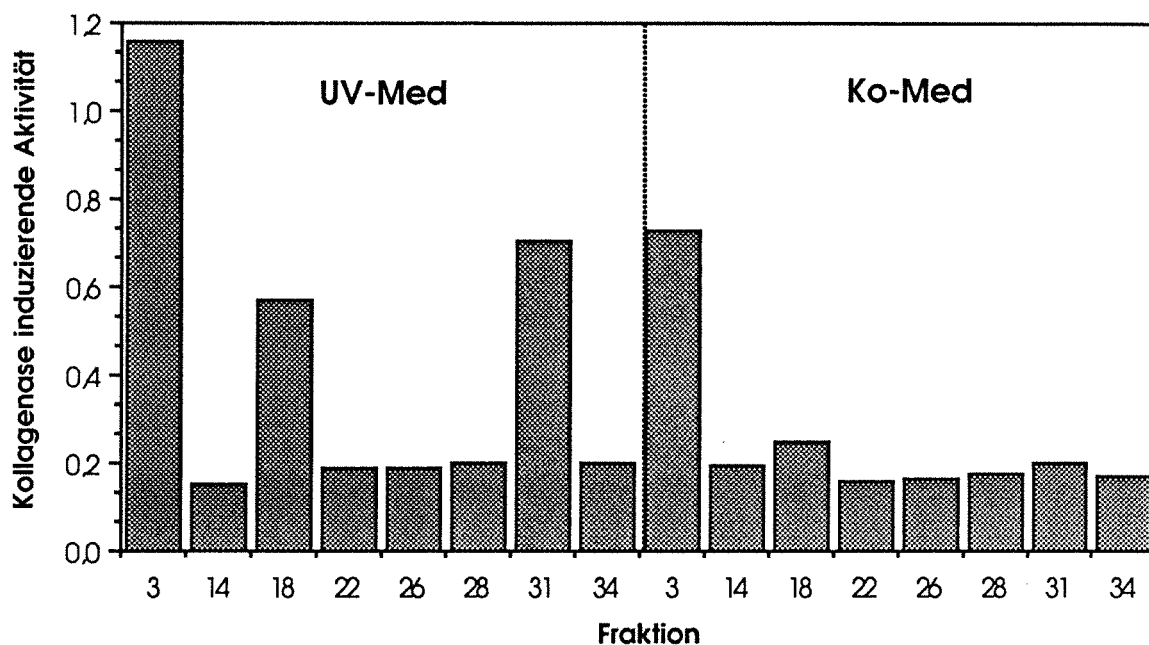


Abb.8c: Laserdensitometrische Auswertung der Abbildung 8a. Die Intensität der Bande, die dem Kollagenase Protein entspricht wurde mit Hilfe eines Laserdensitometers bestimmt. Die Einheiten auf der y-Achse sind die Absolutwerte, die bei der densitometrischen Auswertung erhalten wurden und sind ein Maß für die Kollagenase induzierende Aktivität der einzelnen Fraktionen. Eine Aktivität von etwa 0.15 entspricht der Kollagenase Syntheserate, wie man sie in unbehandelten Zellen findet.



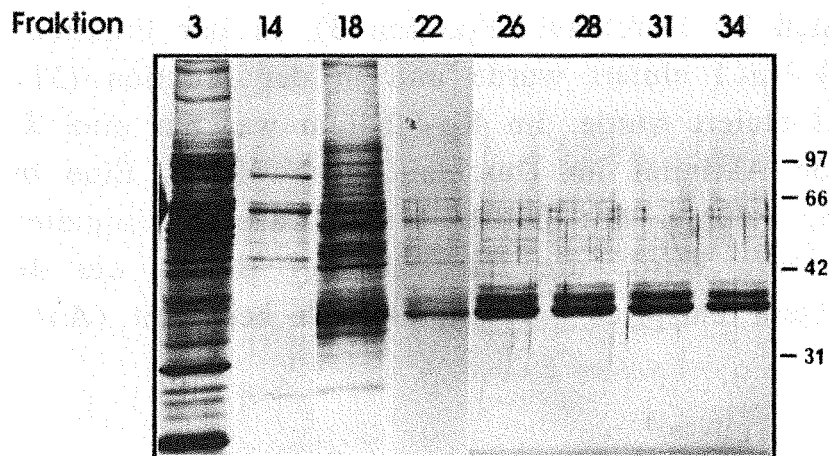


Abb.8d: Nachweis, der in den Heparin-Sepharose-Fractionen enthaltenen Proteine. Je 1ml der Fraktionen, die bei der Auftrennung von Medium bestrahlter Zellen erhalten worden waren, wurden mit TCA gefällt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Silberionen gefärbt. Die Zahlen auf der rechten Seite geben das Molekulargewicht in kD an.

Nach diesen Auswertungen sollte es sich bei allen drei Kollagenase induzierenden Aktivitäten, die im UV-Medium nachzuweisen waren, um Proteine handeln, die nach UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen vermehrt oder mit höherer Aktivität im Medium auftreten. Eine Analyse der in den UV-Fractionen enthaltenen Proteine mit Hilfe silbergefärbter SDS-Gele zeigt, daß der größte Teil der Proteine nicht an die Säule bindet (Fraktion 3), ein anderer Teil gleich zu Beginn des NaCl-Gradienten eluiert wird (Fraktion 18) und, daß in der Kollagenase induzierenden "Hochsalzfraktion" (Fraktion 31) nur noch wenige Proteine enthalten sind (*Abb.8d*).

##### **5. Antikörper gegen Interleukin-1 $\alpha$ hemmen zwei der drei Kollagenase induzierenden Aktivitäten.**

Nachdem gezeigt worden war, daß das Kulturmedium UV-bestrahlter HeLa-Zellen mindestens drei Kollagenase induzierende Aktivitäten enthält, wurde geprüft, ob es sich hierbei um schon bekannte Proteine handelt. Einer der möglichen Kandidaten war

das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ). IL-1 $\alpha$  war ursprünglich als ein von aktivierten Makrophagen abgegebener Faktor beschrieben worden. Inzwischen ist bekannt, daß IL-1 $\alpha$  nicht nur von Makrophagen, sondern auch von einer Vielzahl anderer Zellen gebildet wird. Es übt eine zentrale Funktion im Immunsystem aus und spielt in Wachstums- und Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle (Durum et al., 1985, Giovine und Duff, 1990, Kronheim et al., 1985). In Abschnitt 2.1. wurde bereits gezeigt, daß es in menschlichen Fibroblasten, wie EPIF, die Kollagenase induziert. Zudem existieren Daten, die zeigen, daß IL-1 $\alpha$ -Aktivität nach UV-Bestrahlung von Keratinocyten vermehrt im Kulturmedium nachzuweisen ist (Gahring et al., 1984).

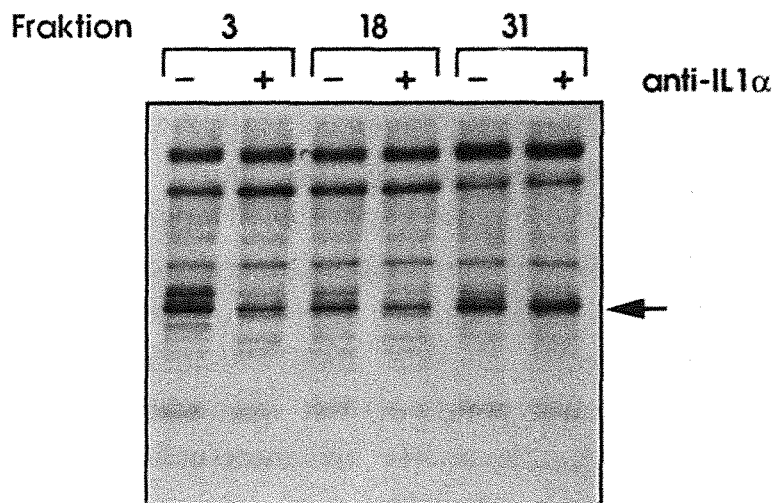


Abb.9: Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  hemmen zwei der Kollagenase induzierenden Aktivität enthaltenden Heparin-Sepharose-Fractionen. Je 1ml der entsprechenden Fractionen (3/18/31) wurde für 2h mit Serum aus nicht immunisierten Kaninchen (-) oder mit Antiserum gegen IL-1 $\alpha$  (+) auf einer sich drehenden Scheibe bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Fractionen in Gegenwart der Antikörper bzw. des Serums aus nicht immunisierten Kaninchen auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden die Überstände auf normale menschliche Fibroblasten gegeben. Nach 12h wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Um zu prüfen, ob es sich bei einer der Kollagenase induzierenden Aktivitäten der Heparin-Sepharose-Säule um IL-1 $\alpha$  handelt, wurde versucht, die Kollagenase induzierende Aktivität der Heparin-Sepharose-Fractionen mit Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$  zu hemmen. Hierzu wurden die entsprechenden Fractionen in Gegenwart der Antikörper auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um Kaninchenserum, das gegen das menschliche IL-1 $\alpha$  gerichtet war (Wingfield et al., 1987). Es zeigte sich, daß die Aktivität im Durchfluß (Fraction 3) und die Aktivität in der Fraction (18), die mit 0.75M NaCl eluiert wurde, mit diesen Antikörpern zu hemmen ist (*Abb.9*). Bei beiden Aktivitäten sollte es sich demnach um IL-1 $\alpha$  oder ein immunologisch verwandtes Molekül handeln. Die Aktivität (Fraction 31) mit der extrem hohen Affinität zu Heparin-Sepharose ließ sich mit diesen Antikörpern nicht hemmen. An dieser Stelle muß ein weiteres Ergebnis erwähnt werden, dessen Daten hier nicht gezeigt werden. Die Kollagenase induzierende Aktivität in ungereinigtem EPIF-Medium wird vollständig durch Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  gehemmt, d.h. die mit der Heparin-Sepharose-Säule angereicherte Aktivität in der Hochsalzfraction spielt bei der Induktion der Kollagenase durch ungereinigtes UV-Medium nur eine untergeordnete Rolle. Da sie aber UV-induziert ist, und für andere EPIF-Aktivitäten verantwortlich sein könnte, erschien es wichtig auch diese Aktivität weiter zu untersuchen.

## **6. Charakterisierung der Kollagenase induzierenden Hochsalzfraction.**

Im Folgenden wurde versucht, die Kollagenase induzierende Hochsalzfraction durch verschiedene experimentelle Ansätze genauer zu charakterisieren.

### **6.1. Antikörper gegen verschiedene Kollagenase induzierende Proteine hemmen die Kollagenase induzierende Aktivität nicht.**

Neben IL-1 $\alpha$  existieren noch eine ganze Reihe von Faktoren, für die eine Kollagenase induzierende Aktivität beschrieben worden ist (Ellis et al., 1989, Dayer et al., 1985, Bauer et al., 1985). Alle ver-

fügbaren, gegen diese Faktoren gerichteten, Antikörper wurden im nächsten Versuch eingesetzt. Wie schon im vorangegangenen Versuch wurde auch hier getestet, ob es möglich ist, die Aktivität der Hochsalzfraktion (Fraktion 31) mit diesen Antikörpern zu hemmen. *Abb.10* zeigt, daß dies mit keinem der Antikörper möglich war. Im Einzelnen handelte es sich um Kaninchenserum gegen Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), den Tumour Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), den acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF), den Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Interleukin-6 (IL-6) und einen monoklonalen Antikörper gegen den Tumor Cell Collagenase-stimulatory Factor (TCSF).

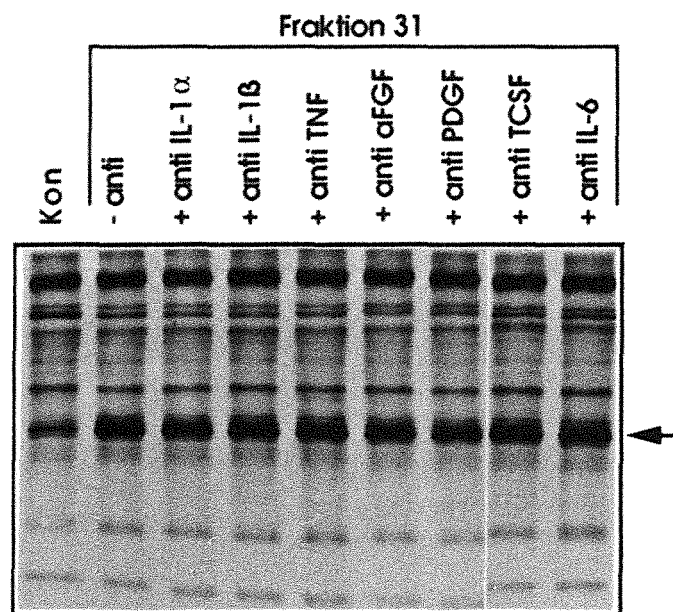


Abb.10: Die Kollagenase induzierende Aktivität der Heparin-Sepharose-Fraktion 31 läßt sich mit Antikörpern, die gegen unterschiedliche Kollagenase induzierende Proteine gerichtet sind, nicht hemmen. Je 1ml der Fraktion 31 wurde für 2h ohne Antiserum (-anti) oder mit Antiserum (anti IL1 $\alpha$ , anti IL1 $\beta$ , anti TNF, anti aFGF, anti PDGF, anti IL6) oder mit monoklonalen Antikörpern (anti TCSF) die an ProteinA/G-Sepharose gebunden worden waren, auf einer sich drehenden Scheibe bei 4°C inkubiert. Die an die ProteinA/G-Sepharose gebundenen Antikörper wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und der Überstand auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurde der Überstand auf normale menschliche Fibroblasten gegeben. Kontrollzellen (Kon) wurden nicht behandelt. Nach 12h wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

## 6.2. Suramin hemmt die Kollagenase induzierende Aktivität.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Hochsalzfraktion um ein Protein handelt, welches die Bindung an einen Rezeptor benötigt, um seine Kollagenase induzierende Aktivität ausüben zu können, wurden Versuche mit Suramin durchgeführt. Die Experimente waren ähnlich angelegt, wie die unter 2. beschriebenen Suramin-Experimente. Normale menschliche Fibroblasten wurden mit der Hochsalzfraktion (Fraktion 31), in An- oder Abwesenheit von Suramin, behandelt und 12 Stunden nach der Induktion mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für 2 Stunden pulsmarkiert. Die sezernierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

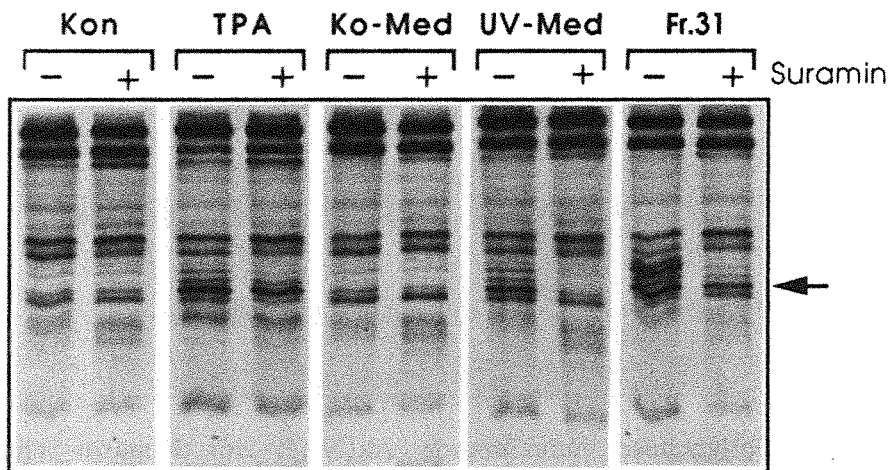


Abb.11: Suramin hemmt die Kollagenase induzierende Aktivität der Heparin-Sepharose-Fraktion 31. Normale menschliche Fibroblasten wurden mit 60ng/ml TPA (TPA), Medium unbestrahlter Zellen (Ko-Med), Medium UV-bestrahlter Zellen (UV-Med) oder 1ml der Fraktion 31 behandelt und zwar in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Suramin. Suramin wurde in einer Endkonzentration von 0.3mM eingesetzt und gleichzeitig mit den Induktoren auf die Zellen gegeben. Nach 12h wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Abb.11 zeigt, daß Suramin die Aktivität der Hochsalzfraction hemmt. Als Kontrolle diente die TPA-Induktion der Kollagenase, die durch Suramin nicht gehemmt wird und die EPIF-Induktion (UV-Med. = ungereinigtes EPIF-Medium) der Kollagenase, die durch Suramin gehemmt wird. Nach diesen Ergebnissen sollte die Hochsalzfraction, ähnlich wie IL-1 $\alpha$ , über eine Signalkette wirken, in deren Verlauf auch eine Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion eine Rolle spielt.

### 6.3. Die Kollagenase induzierende Aktivität hat ein Molekulargewicht, das unter 31kD liegt.

Für eine weitere Charakterisierung des gesuchten Moleküls war es wichtig, zusätzliche Information, z.B. über seine Größe zu erhalten. Die in solchen Fällen im allgemeinen angewandte Technik der Gelfiltration konnte nicht eingesetzt werden, da das gesuchte Protein in zu geringer Menge vorlag.

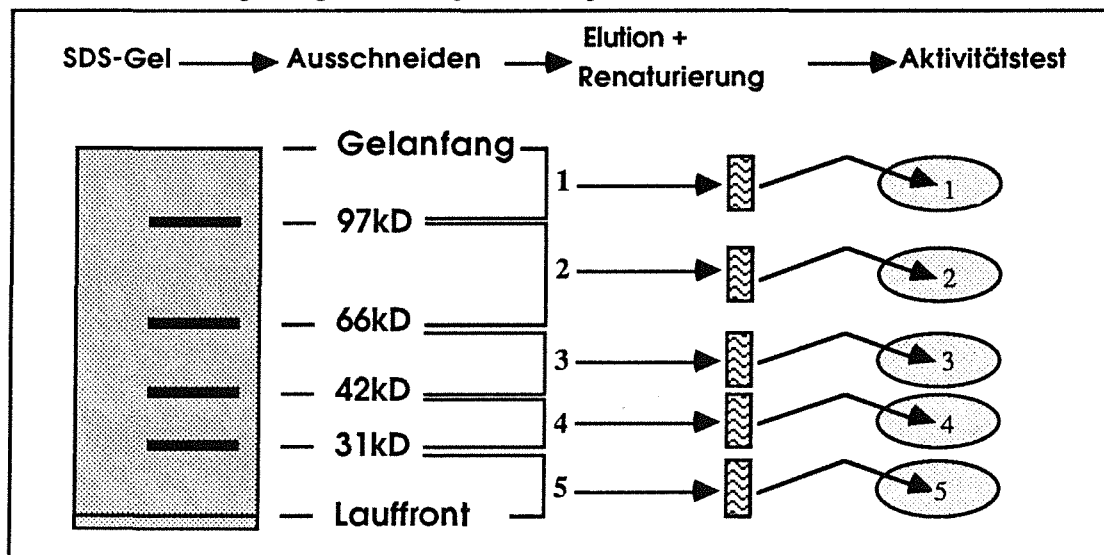


Abb.12: Schematische Darstellung des Renaturierungsexperimentes. Die in der Heparin-Sepharose-Fraktion 31 enthaltenen Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Gelspur wurde in 5 Stücke geschnitten ( orientiert wurde sich hierbei an einem Molekulargewichtsmarker), die darin enthaltenen Proteine wurden eluiert, renaturiert und auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet.

Stattdessen wurde versucht, mit Hilfe eines Renaturierungsexperimentes das Molekulargewicht des gesuchten Moleküls zu bestimmen. In *Abb.12* ist dargestellt, wie hierbei vorgegangen wurde. 10ml der Hochsalzfraktion, die aus 250ml konditioniertem UV-Medium, wie oben beschrieben, über Heparin-Sepharose aufgereinigt worden waren, wurden gefällt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Gelspur mit der Probe wurde in fünf Stücke geschnitten, wobei die Schnittstellen an einem Molekulargewichtsmarker orientiert waren, d.h. Gelstück 1 enthielt den Bereich Gelanfang bis 97kD, Gelstück 2 den Bereich 97kD bis 66kD, Gelstück 3 den Bereich 66kD bis 42kD, Gelstück 4 den Bereich 42kD bis 31kD und Gelstück 5 den Bereich 31kD bis Lauffront. Die Proteine wurden aus dem Polyacrylamid eluiert und renaturiert.

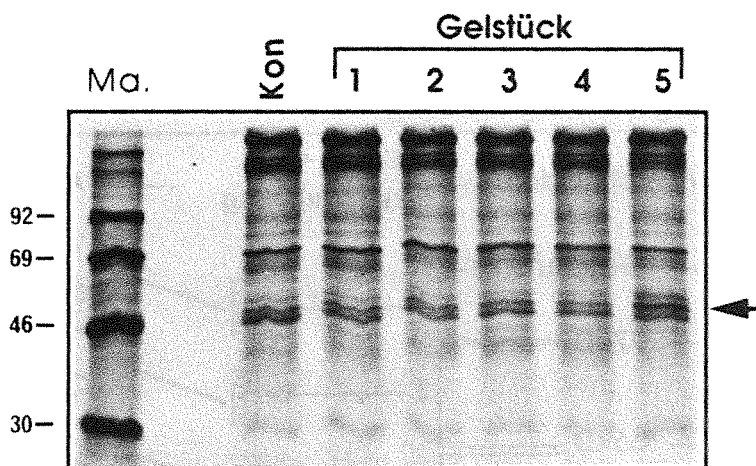


Abb.13: Das Molekulargewicht der Kollagenase induzierenden Heparin-Sepharose-Fraktion 31 ist kleiner als 31kD. Die aus den 5 Gelstücken (siehe *Abb.12*) eluierten Proteine wurden auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden die 5 Proben (1=Gelanfang-97kD, 2=97-66kD, 3=66-42kD, 4=42-31kD, 5=31kD-Lauffront) auf normale menschliche Fibroblasten gegeben. Kontrollzellen wurden nicht behandelt (Kon). Nach 12h wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein. Die Zahlen auf der linken Seite geben das Molekulargewicht der Markerproteine (Ma) in kD an.

Anschließend wurde getestet, ob eine der Proben 1-5 eine Kollagenase induzierende Aktivität enthält. In der Tat enthielt Probe 5 eine solche Aktivität (*Abb.13*). Da es sich bei dieser Probe um die renaturierten Proteine des Gelstücks 5 handelte, sollte das gesuchte Molekül ein Molekulargewicht haben, das unter 31kD liegt.

### **7. Antikörper gegen den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor hemmen die Kollagenase induzierende Aktivität der Hochsalzfraktion.**

Die bisher bekannten Daten und die Ergebnisse der eigenen Experimente ermöglichten folgende Charakterisierung des gesuchten Moleküls: 1. es tritt vermehrt im Medium UV-bestrahlter HeLa-Zellen auf, 2. es induziert in primären menschlichen Fibroblasten die Kollagenase, 3. die Induktion der Kollagenase läßt sich durch Suramin hemmen, 4. es zeigt eine extrem hohe Affinität zu Heparin-Sepharose, 5. sein Molekulargewicht liegt zwischen 15kD und 31kD ( die Untergrenze von 15kD ergab sich aus der Tatsache, daß der Faktor nicht durch Dialyseschläuche diffundierte, die ein Ausschlußgröße von 15kD hatten).

In der Literatur war eine ganze Gruppe von Faktoren, die sogenannten "Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren" (Lobb et al., 1986), beschrieben worden, die sich durch eine extrem hohe Affinität zu Heparin-Sepharose auszeichnet. Viele dieser, meist aus unterschiedlichen Geweben isolierten, Faktoren konnten als Produkte des gleichen Gens identifiziert werden. Es handelte sich hierbei um das Gen des basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors (basic fibroblast growth factor = bFGF). Das Genprodukt wurde als Faktor entdeckt, der das Wachstum von Fibroblasten stimuliert und im Gegensatz zum sauren Fibroblasten Wachstumsfaktor (acidic fibroblast growth factor = aFGF) einen isoelektrischen Punkt von 9 hat. Er induziert in Fibroblasten die Kollagenase (Edwards et al., 1987) und hat ein Molekulargewicht von 17kD (Folkman und Klagsbrun, 1987). All diese Daten stimmten sehr gut mit den Daten überein, die bisher über die Kollagenase induzierende Hochsalzfraktion der Heparin-Sepharose Säule vorlagen. Aus diesem Grund



wurde untersucht, ob Antikörper gegen den bFGF die Kollagenase induzierende Aktivität der Hochsalzfraktion hemmen. *Abb.14* zeigt, daß Kaninchenserum gegen den bFGF diese Aktivität tatsächlich hemmt. Kontroll-Kaninchenserum (NRS) zeigte keine Wirkung.

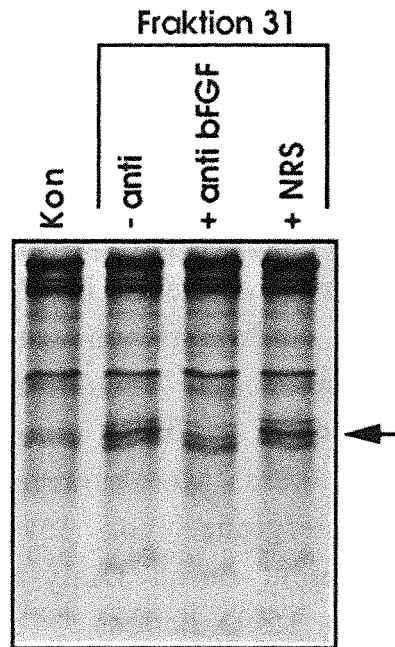


Abb.14: Antikörper gegen den bFGF hemmen die Kollagenase induzierende Aktivität der Heparin-Sepharose-Fraktion 31. Je 1ml der Fraktion 31 wurde für 2h mit ProteinA-Sepharose inkubiert, an die keine Antikörper (-anti), Antikörper gegen den bFGF (anti bFGF; R2/119) oder Antikörper von nicht immunisierten Kaninchen (NRS) gebunden worden waren. Nach Abtrennen der an die ProteinA-Sepharose gebundenen Antikörper durch Zentrifugation, wurde der Überstand auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden die Überstände für 12h auf normale menschliche Fibroblasten gegeben. Kontrollzellen (Kon) wurden nicht behandelt. Die Zellen wurden für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Zusammenfassend läßt sich Folgendes sagen: Mittels einer einzigen Trenntechnik, nämlich der Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose, war es möglich, im Kulturmedium UV-bestrahlter HeLa-Zellen drei Kollagenase induzierende Aktivitäten nachzuweisen. Sie konnten als IL-1 $\alpha$  und bFGF oder immunologisch verwandte Proteine identifiziert werden. IL-1 $\alpha$ -Aktivität war im UV-Medium, im Vergleich zu Kontroll-Medium, vermehrt, bFGF-Aktivität war ausschließlich im UV-Medium nachweisbar.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, wie es zu der verstärkten IL-1 $\alpha$ - und bFGF-Aktivität im Kulturmedium UV-bestrahlter HeLa-Zellen kommt. Durch UV-Bestrahlung könnte es zu einer verstärkten Sekretion der beiden Proteine oder zur Sekretion von Proteinen mit höherer Aktivität kommen, ohne daß UV-Bestrahlung deren Neusynthese beeinflußt. Es wäre aber auch denkbar, daß UV-Bestrahlung zu einer verstärkten Neusynthese der beiden Proteine führt, die dann auch verstärkt sezerniert werden und so für die höhere Aktivität verantwortlich sind.

## **8. UV-Induktion der Interleukin-1 $\alpha$ Synthese.**

Das menschliche IL-1 $\alpha$  Gen wurde auf Chromosom 2 lokalisiert. Es hat eine Größe von etwa 12kb und besteht aus 7 Exons und 6 Introns (Furutani et al., 1986). Die IL-1 $\alpha$  mRNA hat eine Größe von 2002 Nukleotiden (March et al., 1985). Das IL-1 $\alpha$  Protein wird als 31kD großes Vorläufermolekül synthetisiert, welches in eine 17kD-Form überführt wird (Beuscher et al., 1988, Giri et al., 1985, Hazuda et al., 1988, Koboyashi et al., 1988). Es kommt außer im Cytoplasma auch im Kulturmedium und auch als membrangebundenes Molekül vor (Bakouche et al., 1987, Brody und Durum, 1989, Junming et al., 1987). Im Gegensatz zu den meisten sezernierten Proteinen besitzt IL-1 $\alpha$  kein hydrophobes Signalpeptid (Muesch et al., 1990, Hazuda et al., 1988), wodurch der klassische Weg der Proteinsekretion über das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Komplex als Sekretionsmechanismus ausscheidet. Über die genauen Mechanismen,

d.h. wie und wo aus der 31kD-Form die 17kD-Form entsteht, und wie das Molekül an die Membran bzw. aus der Zelle gelangt, ist zwar sehr viel geschrieben worden, aber es gibt noch kein allgemein anerkanntes Modell. Man geht heute davon aus, daß das 31kD-Molekül die cytoplasmatische Form ist und, daß das 17kD-Molekül hauptsächlich oder ausschließlich die im Zellüberstand vorkommende Form darstellt. Daneben ist für eine ganze Reihe von Zellen auch eine membrangebundene Form beschrieben.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, auf welche Weise UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einer vermehrten IL-1 $\alpha$ -Aktivität im Zellkulturmedium führt.

### **8.1. UV-Bestrahlung führt zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$ mRNA.**

Um festzustellen, ob es nach UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einer Zunahme der Menge an IL-1 $\alpha$  mRNA kommt, wurden Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Hierzu wurde polyA<sup>+</sup>-mRNA aus unbestrahlten und UV-bestrahlten HeLa-Zellen mit einer IL-1 $\alpha$  cDNA-Probe hybridisiert. Es zeigte sich, daß es nach UV-Bestrahlung zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$  mRNA kommt (*Abb.15*). Die RNA-Menge steigt bereits eine Stunde nach UV-Bestrahlung leicht an, erreicht nach 8 Stunden ein Maximum und hat nach 24 Stunden fast wieder das Niveau der Kontrolle erreicht. Zu der UV-induzierten RNA-Akkumulation und zur Abnahme der RNA-Menge nach Erreichen des Maximums kommt es auch in Gegenwart des Proteinsynthesehemmers Anisomycin. Als Kontrolle, daß gleiche Mengen an RNA eingesetzt worden waren, wurde der Filter mit einer GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) cDNA-Probe nachhybridisiert. Man weiß, daß UV-Bestrahlung die Menge dieser mRNA in diesen Zellen nicht beeinflusst. Um die Wirksamkeit von Anisomycin zu überprüfen, wurde der Filter ein weiteres Mal, diesmal mit einer Kollagenase cDNA-Probe nachhybridisiert. Die UV-Induktion der endogenen Kollagenase findet nur statt, wenn man Proteinneusynthese zuläßt.

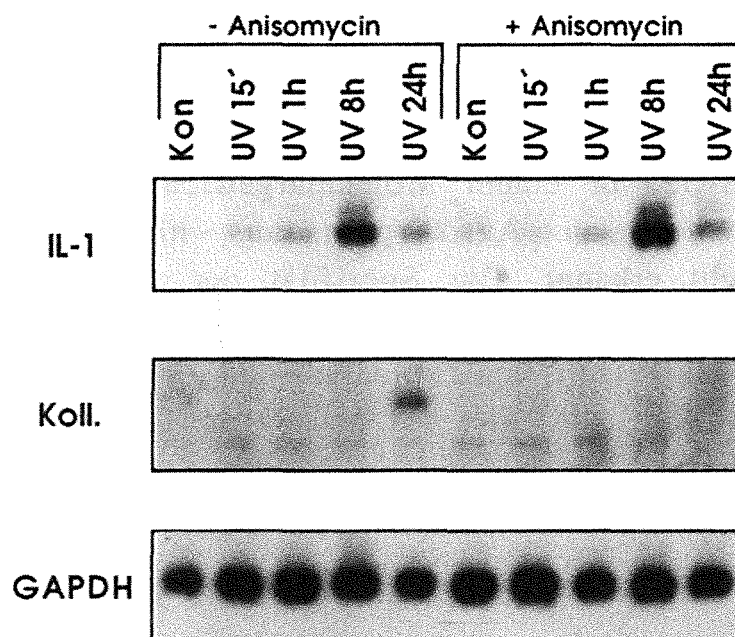


Abb.15: UV-induzierte Akkumulation der IL-1 $\alpha$  mRNA. HeLa-Zellen wurden nicht bestrahlt (Kon) oder mit 30J/m<sup>2</sup> UV-bestrahlt (UV). Nach der UV-Bestrahlung wurde dem Medium kein Anisomycin (-Anisomycin) oder 100 $\mu$ M Anisomycin (+Anisomycin) zugesetzt. Zu verschiedenen Zeiten nach der UV-Bestrahlung wurde polyA<sup>+</sup>-RNA präpariert. Je 5 $\mu$ g der RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf HybondN<sup>+</sup> übertragen. Der HybondN<sup>+</sup>-Filter wurde nacheinander mit einer <sup>32</sup>P-markierten IL-1 $\alpha$  (IL1), Kollagenase (Koll.) und GAPDH (GAPDH) cDNA-Probe hybridisiert.

## 8.2. UV-Bestrahlung führt zur vermehrten Neusynthese des IL-1 $\alpha$ Proteins.

Da die IL-1 $\alpha$  mRNA nach UV-Bestrahlung akkumuliert, wurde im folgenden Experiment untersucht, ob UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen auch zu einer vermehrten Neusynthese des IL-1 $\alpha$  Proteins führt. Um dies zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen nicht bestrahlt oder UV-bestrahlt und 11 Stunden nach der Bestrahlung mit <sup>35</sup>S-Methionin für 5 Stunden pulsmarkiert. Cytoplasmaextrakte aus diesen Zellen wurden mit Kaninchenserum gegen menschliches IL-1 $\alpha$  und zur Kontrolle mit Serum von nicht immunisierten Kaninchen (NRS) immunpräzipitiert. Die Antikörper waren vor der Immun-

präzipitation an ProteinA-Sepharose gekoppelt worden. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. UV-Bestrahlung führt zur vermehrten Neusynthese eines Proteins, das spezifisch von den IL-1 $\alpha$ -Antikörpern erkannt wird (Abb.16). Das Protein befindet sich auf dem SDS-Gel in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 33kD und wird von Antikörpern aus nicht immunisierten Kaninchen nicht erkannt. Die Spezifität der Antikörper und die Tatsache, daß die cytoplasmatische Form des IL-1 $\alpha$  Proteins im SDS-Gel bei 33kD läuft, spricht dafür, daß es sich bei dem UV-induzierten Protein um die cytoplasmatische Form des IL-1 $\alpha$  Proteins handelt.

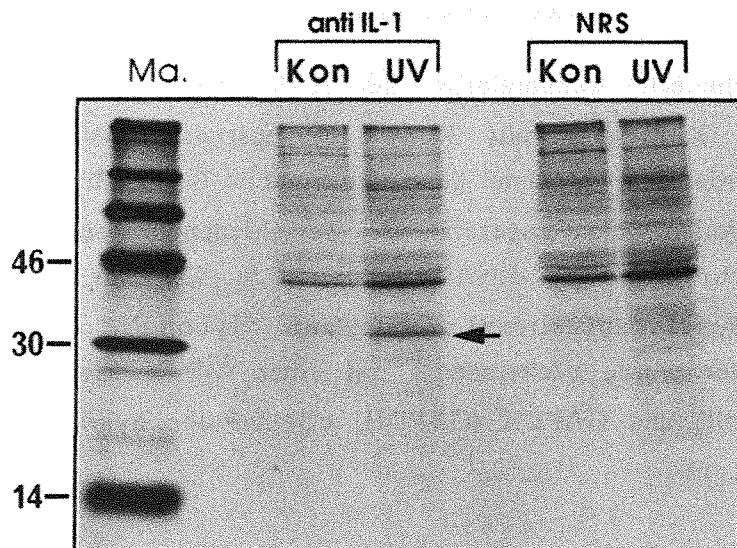


Abb.16: UV-induzierte Neusynthese des IL-1 $\alpha$  Proteins. Cytoplasmaextrakte aus unbestrahlten (Kon) und mit 30J/m<sup>2</sup> UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen, die 11h nach der Bestrahlung für 5h mit <sup>35</sup>S-Methionin pulsmarkiert worden waren, wurden mit Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$  (anti IL-1) und Antikörpern aus nicht immunisierten Kaninchen (NRS) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Zahlen auf der linken Seite geben das Molekulargewicht der Markerproteine (Ma) in kD an. Der Pfeil zeigt auf das Protein, das nach UV-Bestrahlung verstärkt synthetisiert wird und mit den IL-1 $\alpha$  Antikörpern immunpräzipitiert werden konnte.

### **8.3. IL-1 $\alpha$ ist nach UV-Bestrahlung vermehrt im Kulturmedium nachweisbar.**

Da in dieser Arbeit nach UV-Bestrahlung eine erhöhte IL-1 $\alpha$ -Aktivität im Kulturmedium der Zellen nachzuweisen war (Abschnitt 5), und nach den, im vorherigen Abschnitt gezeigten Daten über die UV-induzierte Synthese der cytoplasmatischen Form des IL-1 $\alpha$ -Proteins, war es wahrscheinlich, auch eine, durch UV-Bestrahlung erhöhte Menge an IL-1 $\alpha$  Protein im Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen nachweisen zu können. Dies wird im Folgenden sowohl für das neusynthetisierte IL-1 $\alpha$  Protein, als auch für die Gesamtmenge an IL-1 $\alpha$  Protein gezeigt.

#### **8.3.1. Die Menge an neusynthetisiertem IL-1 $\alpha$ im Kulturmedium nimmt nach UV-Bestrahlung zu.**

Der Nachweis, daß die Menge an neusynthetisiertem IL-1 $\alpha$  Protein im Medium nach UV-Bestrahlung zunimmt, wurde durch einen ähnlichen experimentellen Ansatz erbracht, wie er unter 8.2. für das cytoplasmatische Protein beschrieben worden ist. Hierzu wurden HeLa-Zellen nicht bestrahlt oder UV-bestrahlt und 11 Stunden nach der UV-Bestrahlung mit <sup>35</sup>S-Methionin für 5 Stunden pulsmarkiert. Danach wurde das Medium mit ProteinA-gebundenen Kaninchenantikörpern gegen IL-1 $\alpha$  immunpräzipitiert, die präzipitierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographiert (*Abb.17a*). Die spezifisch präzipitierte, UV-induzierte Protein-Bande befindet sich an der Stelle des SDS-Gels, wo man die sezernierte 17kD-Form des IL-1 $\alpha$  Proteins erwarten würde. Verglichen mit der UV-Induktion des neusynthetisierten 31kD IL-1 $\alpha$  Proteins im Cytoplasma (*Abb.16*), ist die UV-Induktion des 17kD IL-1 $\alpha$  Proteins im Medium viel geringer. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß es technisch sehr schwierig ist, eine relativ geringe Menge Antigen aus einem relativ großen Volumen mit Antikörpern zu präzipitieren. Das Experiment weist aber darauf hin, daß nicht das gesamte UV-induzierte IL-1 $\alpha$  Protein in das Kulturmedium gelangt.

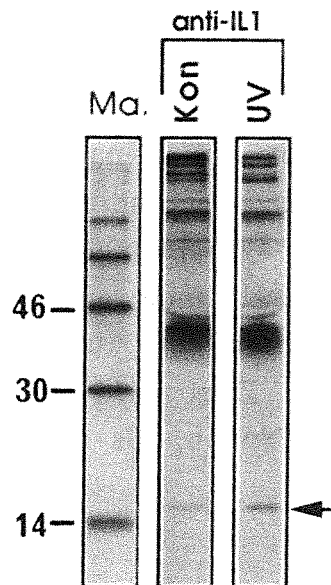


Abb.17a: UV-induziertes neusynthetisiertes IL-1 $\alpha$  Protein (17kD-Form) wird in das Zellkulturmedium sezerniert. Kulturmedium von unbestrahlten (Kon) und mit 30J/m<sup>2</sup> UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen, die 11h nach der UV-Bestrahlung für 5h mit <sup>35</sup>S-Methionin pulsmarkiert worden waren, wurde mit Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$  (anti IL-1) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Zahlen auf der linken Seite geben das Molekulargewicht der Markerproteine (Ma) in kD an. Der Pfeil zeigt auf das Protein, das nach UV-Bestrahlung verstärkt synthetisiert und sezerniert wurde und mit den IL-1 $\alpha$  Antikörpern immunpräzipitiert werden konnte.

### 8.3.2. Die Gesamtmenge an IL-1 $\alpha$ im Kulturmedium nimmt nach UV-Bestrahlung zu.

Um zu überprüfen wie es sich mit der Gesamtmenge des IL-1 $\alpha$  Proteins im Medium UV-bestrahlter Zellen verhält, wurde die Technik der Western-Analyse eingesetzt. Kulturmedium von unbestrahlten und von bestrahlten Zellen wurde 48 Stunden nach der UV-Bestrahlung geerntet, TCA-gefällt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine proteinbindende Membran transferiert und das gesuchte Antigen, in diesem Fall das IL-1 $\alpha$  Protein, mit der Methode der "indirekten Immunfärbung"

nachgewiesen. Bei dieser Methode inkubiert man die Membran in einem ersten Schritt mit dem spezifischen, sogenannten primären Antikörper, der das gesuchte Antigen erkennt und bindet. In einem zweiten Schritt inkubiert man die Membran mit einem sogenannten sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und an diesen bindet. An den sekundären Antikörper ist ein Enzym, in diesem Fall die alkalische Phosphatase, gekoppelt. Der Nachweis des Antigens besteht nun darin, daß der Filter in einem dritten Schritt mit einem Substrat für die alkalische Phosphatase inkubiert wird, und dieses Substrat an der Stelle des Filters umgesetzt wird und zu einer intensiven Färbung der Membran führt, an der sich das gesuchte Antigen befindet.

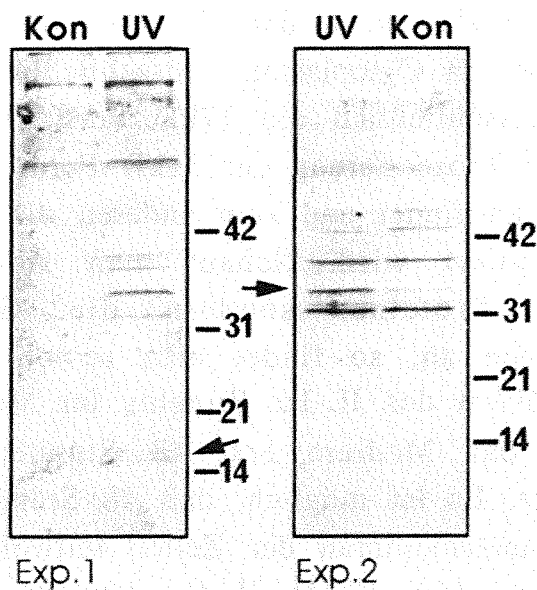


Abb.17b: Western Blot Analyse der UV-induzierten Proteine mit Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$ . Kulturmedium von unbestrahlten (Kon) und mit 30J/m<sup>2</sup> UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen, das 48h nach der UV-Bestrahlung geerntet worden war, wurde auf einem SDS-Gradientengel aufgetrennt und auf eine proteinbindende Membran übertragen. Die Membran wurde in einem ersten Schritt mit Kaninchenantiserum, das gegen IL-1 $\alpha$  gerichtet war und in einem zweiten Schritt mit Ziegenantiserum, das gegen Kaninchen IgG gerichtet war inkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch die, an die Ziegenantikörper gekoppelte, alkalische Phosphatase. Die Zahlen auf der rechten Seite geben das Molekulargewicht in kD an. Die Pfeile zeigen auf die UV-induzierten Banden im Bereich von 17 und 33kD. Es handelt sich um zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente (Exp1/Exp2).



*Abb.17b* zeigt, daß mit dieser Methode mit den IL-1 $\alpha$ -Antikörpern, sowohl im Bereich von 33 kD als auch im Bereich von 17kD UV-induzierte Banden auftreten. Aus welchem Grund in einem Experiment (*Abb.17b, links*) im Bereich von 33kD und 17kD UV-induzierte Banden auftreten, in einem anderen Experiment (*Abb. 17b, rechts*) dagegen nur im Bereich von 33kD, läßt sich derzeit nicht sagen.

Zusammenfassend läßt sich über die UV-Induktion von IL-1 $\alpha$  auf Proteinebene Folgendes sagen: UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen führt zu einer verstärkten Neusynthese des 31kD IL-1 $\alpha$  Proteins im Cytoplasma und zu einer verstärkten Sekretion des neu-synthetisierten 17kD IL-1 $\alpha$  Proteins ins Medium. Unter diesen Bedingungen (11 Stunden nach der UV-Bestrahlung für 5 Stunden markiert) findet man im Cytoplasma ausschließlich die 31kD Form und im Medium ausschließlich die 17kD Form, was dafür spricht, daß, zum einen, die Prozessierung der 31kD Form in die 17kD-Form nicht in der Zelle stattfindet und zum anderen die 31kD Form nicht ins Medium sezerniert wird. Schaut man sich nicht nur die neusynthetisierten Proteine, sondern die Gesamtmenge an sezernierten Proteinen an, so findet man sowohl die größere, als auch die kleinere Form des IL-1 $\alpha$  Proteins im Medium. Bei diesen Versuchen wurde das Medium erst 48 Stunden nach der UV-Bestrahlung geerntet. Es ist möglich, daß 48 Stunden nach der UV-Bestrahlung die Plasmamembran der Zellen teilweise schon so stark geschädigt war, daß das 31kD IL-1 $\alpha$  Protein passiv durch die zerstörte Membran ins Medium gelangt ist.

#### **8.4. Nach UV-Bestrahlung ist die Kollagenase induzierende Aktivität von membrangebundenem IL-1 $\alpha$ verstärkt nachweisbar.**

Neben der löslichen intrazellulären und extrazellulären Form existiert in verschiedenen Zelltypen auch eine membrangebundene Form des IL-1 $\alpha$  Proteins (Bakouche et al., 1987, Brody und Durum, 1989, Junming et al., 1987). Ob es sich hierbei um eine eigenständige Form handelt, oder ob es sich um eine Zwischenstufe

handelt, über die die cytoplasmatische Form schließlich ins Medium gelangt, weiß man derzeit nicht. Nach den bisher in dieser Arbeit gezeigten Daten über die UV-Induktion der löslichen IL-1 $\alpha$  Proteine, erschien es sinnvoll zu untersuchen, ob in HeLa-Zellen ein membrangebundenes IL-1 $\alpha$  Protein existiert, und, sofern es existiert, ob es nach UV-Bestrahlung vermehrt nachzuweisen ist. Zu diesem Zweck wurden aus unbestrahlten und bestrahlten HeLa-Zellen Membranen präpariert. Die Membranen wurden in Puffer aufgenommen, dem Kulturmedium normaler menschlicher Fibroblasten zugesetzt und auf Kollagenase induzierende Aktivität untersucht.

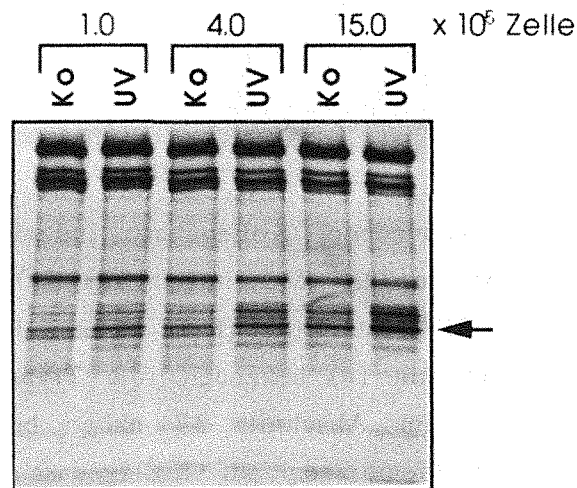


Abb.18a: UV-Bestrahlung induziert eine membrangebundene Kollagenase induzierende Aktivität. Aus unbestrahlten (Ko) und mit 30J/m<sup>2</sup> UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen wurden 24h nach der Bestrahlung Membranen präpariert. Membranen aus 1.0 x 10<sup>5</sup>, 4.0 x 10<sup>5</sup> und 1.5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden für 12h auf normale menschliche Fibroblasten gegeben und auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden die Zellen für 2h mit <sup>35</sup>S-Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Es zeigte sich, daß auch Membranen von unbestrahlten Zellen eine Kollagenase induzierende Aktivität besitzen und daß sich diese Aktivität durch UV-Bestrahlung verstärken läßt (Abb.18a). Behandelt man die Membranen mit Trypsin, so geht die Aktivität

verloren (*Abb.18b*). Demzufolge sollte es sich um ein Protein handeln, das für diese Aktivität verantwortlich ist.

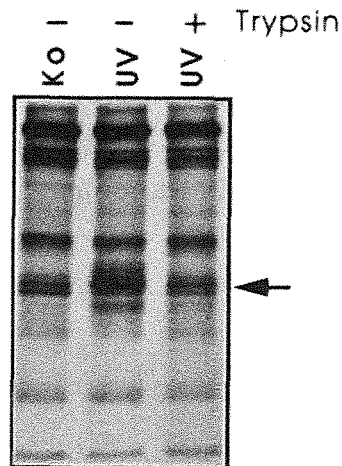


Abb.18b: Die membrangebundene, Kollagenase induzierende Aktivität wird durch Trypsinbehandlung zerstört. Membranen aus  $1.0 \times 10^6$  unbestrahlten (Ko) oder mit  $30\text{J/m}^2$  UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen wurden nicht mit Trypsin (-) oder mit Trypsin (+) behandelt (die Trypsinbehandlung ist unter Material und Methoden im Abschnitt 17 näher beschrieben). Nach der Behandlung wurden die Membranen auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Hierzu wurden die Membranen für 12h auf normale menschliche Fibroblasten gegeben. Danach wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

Führt man den Test auf Kollagenase induzierende Aktivität in Gegenwart von Kaninchenantikörpern gegen IL-1 $\alpha$  durch, so verschwindet die Aktivität ebenfalls (*Abb.18c*). Dagegen hat Serum von nicht immunisierten Kaninchen keinen Einfluß (*Abb.18c*). Diese Experimente zeigen, daß in HeLa-Zellen, neben den löslichen IL-1 $\alpha$  Proteinen auch ein membrangebundenes IL-1 $\alpha$  Protein vorkommt, dessen Kollagenase induzierende Aktivität durch UV-Bestrahlung verstärkt wird.

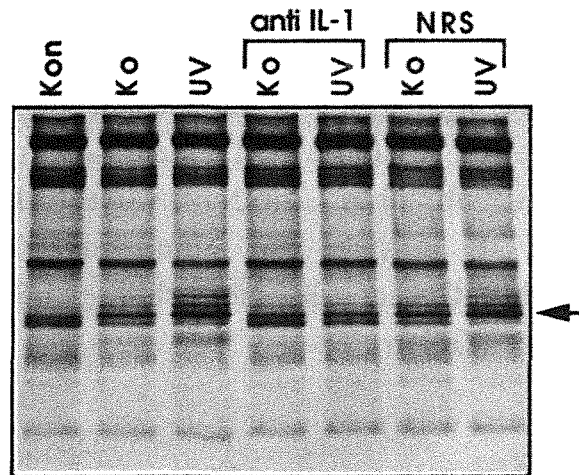


Abb.18c: IL-1 $\alpha$  Antikörper hemmen die membrangebundene, Kollagenase induzierende Aktivität. Membranen aus  $1.0 \times 10^6$  nicht bestrahlten (Ko) und mit  $30\text{J/m}^2$  UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen wurden nicht mit Antikörpern inkubiert, mit IL-1 $\alpha$  Antikörpern (anti IL-1) inkubiert oder mit Serum aus nicht immunisierten Kaninchen inkubiert (NRS). Die Inkubation erfolgte 4h bei  $4^\circ\text{C}$  auf einer sich drehenden Scheibe (die Behandlung der Membranen mit den Antikörpern ist unter Material und Methoden im Abschnitt 17 näher beschrieben). Danach wurden die Membranen auf normale menschliche Fibroblasten gegeben und auf Kollagenase induzierende Aktivität getestet. Kontrollzellen (Kon) wurden nicht behandelt. Nach 12h wurden die Zellen für 2h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert und die sezernierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt auf das Kollagenase-Protein.

### 9.UV-Induktion des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors.

Über die genomische Organisation des menschlichen bFGF-Gens ist noch relativ wenig bekannt. Die Größe der bFGF mRNA in verschiedenen Zellen und Geweben variiert (Halaban et al., 1988, Kurokawa et al., 1987). Das bFGF Protein ist ein 17kD großes Molekül, das in dieser Größe sowohl intrazellulär als auch

extrazellulär vorkommt und besitzt, ähnlich wie das IL-1 $\alpha$  Protein kein typisches Signalpeptid (Halaban et al., 1988, Yayon und Klagsbrun, 1990b). Weil dadurch der klassische Weg über endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Komplex als Sekretionsmechanismus ausscheidet (Muesch et al., 1990), werden auch im Falle des bFGF neue Arten der Sekretion diskutiert. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob eine durch UV-Bestrahlung verstärkte Akkumulation der bFGF mRNA und eine verstärkte Neusynthese des bFGF Proteins der Grund für die erhöhte bFGF-Aktivität im Medium UV-bestrahlter Zellen ist.

### **9.1. UV-Bestrahlung führt zur Akkumulation der bFGF mRNA.**

Um zu überprüfen, ob es nach UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einer Akkumulation von bFGF mRNA kommt, wurden Northern-Hybridisierungen mit polyA<sup>+</sup>-mRNA aus HeLa-Zellen durchgeführt. RNA aus unbestrahlten und UV-bestrahlten Zellen wurde mit einer Rinder-bFGF cDNA-Probe hybridisiert. Diese Probe kreuzreagiert mit der menschlichen RNA. Mit dieser Methode waren sechs RNA-Spezies mit Größen zwischen 1,2kb und 7,0kb nachweisbar (*Abb.19*). Transkripte mit dieser Größe sind auch in unterschiedlichen menschlichen Melanomzelllinien und in embryonalen menschlichen Lungenzellen nachgewiesen worden (Halaban et al., 1988, Kurokawa et al., 1987). Die Menge des größten Transkripts steigt bereits 15 Minuten nach der UV-Bestrahlung an, erreicht nach einer Stunde ein Maximum und hat 8 Stunden nach der UV-Bestrahlung wieder das Niveau der Kontrolle erreicht. Aus welchem Grund es sechs verschieden große Transkripte gibt und weshalb nur das größte Transkript UV-induzierbar ist, läßt sich nach dem derzeitigen Wissensstand nicht sagen. Bemerkenswert ist, daß die Akkumulation der bFGF mRNA sehr schnell nach der UV-Bestrahlung einsetzt. Die Kinetik dieser Akkumulation gleicht sehr stark derjenigen der sogenannten "immediate early" Gene. Als Kontrolle, daß gleiche Mengen an RNA eingesetzt worden waren, wurde der Filter mit einer GAPDH cDNA-Probe nachhybridisiert.

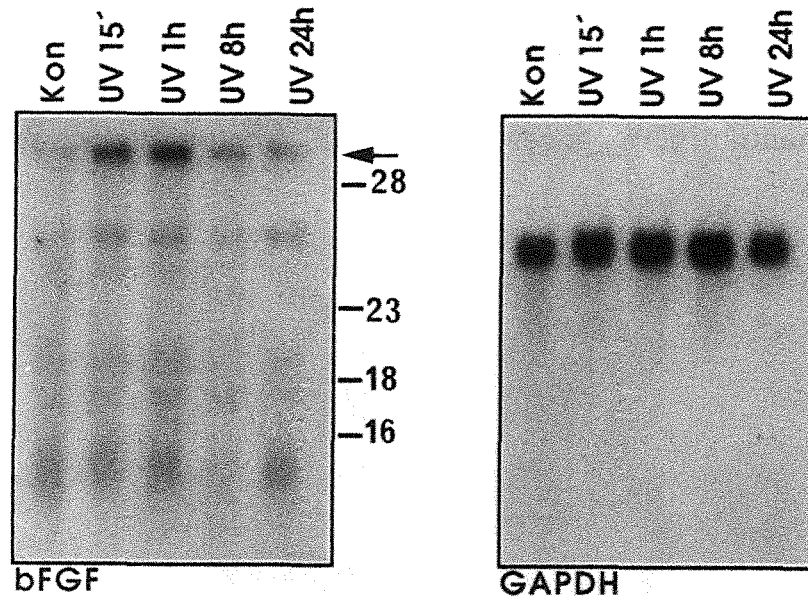


Abb.19: UV-induzierte Akkumulation der bFGF mRNA. HeLa-Zellen wurden nicht bestrahlt (Ko) oder mit  $30\text{J/m}^2$  UV-bestrahlt (UV). Zu den angegebenen Zeiten nach der UV-Bestrahlung wurde polyA<sup>+</sup>-RNA präpariert. Je  $5\mu\text{g}$  RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf HybondN<sup>+</sup> übertragen. Der HybondN<sup>+</sup>-Filter wurde zuerst mit einer <sup>32</sup>P-markierten bFGF cDNA-Probe (linke Abbildung) und nach Dehybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten GAPDH cDNA-Probe hybridisiert (rechte Abbildung). Die Zahlenangaben auf der rechten Seite markieren die Stellen an denen die 28S (4718 Nukleotide), 23S (2904 Nukleotide), 18S (2237 Nukleotide) und die 16S (1541 Nukleotide) rRNA's laufen. Der Pfeil zeigt das UV-induzierte, größte Transkript.

## 9.2. UV-Bestrahlung führt zur vermehrten Neusynthese des bFGF Proteins.

Die UV-induzierte Akkumulation der bFGF mRNA führt zu einer erhöhten Synthese des bFGF Proteins. Um dies zu zeigen, wurden Cytoplasmaextrakte aus unbestrahlten und UV-bestrahlten HeLa-Zellen präpariert, die unmittelbar nach der UV-Bestrahlung für 4 Stunden mit <sup>35</sup>S-Methionin pulsmarkiert worden waren. Die Cytoplasmaextrakte wurden mit, an ProteinG-gebundenen, monoklonalen Mausantikörpern gegen den bFGF immunpräzipitiert

(ProteinG bindet spezifisch Mausantikörper des IgG-Typs), auf einem SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Zur Kontrolle wurden die gleichen Extrakte mit, an ProteinA-gebundenen, Kaninchenantikörpern gegen den aFGF immunpräzipitiert.

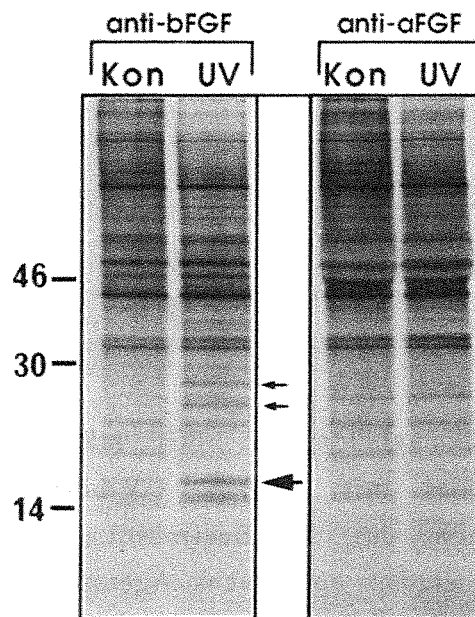


Abb.20: UV-induzierte Neusynthese des bFGF Proteins. Cytoplasmacxtrakte aus unbestrahlten (Kon) und mit  $30\text{J/m}^2$  UV-bestrahlten (UV) HeLa-Zellen, die unmittelbar nach der UV-Bestrahlung für 4h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin pulsmarkiert worden waren, wurden mit Antikörpern gegen den bFGF (anti-bFGF; MAK 8/16) oder mit Antikörpern gegen den aFGF immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Pfeile in der Mitte zeigen auf die Proteine, die nach UV-Bestrahlung verstärkt synthetisiert wurden und die mit den bFGF-Antikörpern immunpräzipitiert werden konnten. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Molekulargewichte in kD an.

UV-Bestrahlung führt zu einer verstärkten Neusynthese einiger Proteine, die spezifisch von den bFGF-Antikörpern erkannt werden (Abb.20). Eines dieser Proteine befindet sich auf dem SDS-Gel in dem Molekulargewichtsbereich, in dem man auch das 17kD große bFGF Protein erwarten würde. Auf die Identität der beiden anderen Proteine wird in der Diskussion näher eingegangen. Da im bFGF Protein nur zwei der 155 Aminosäuren Methionin sind (Abraham

et al., 1986), war die Technik der Immunpräzipitation  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter Proteine nicht empfindlich genug, um neu-synthetisiertes bFGF im Kulturmedium UV-bestrahlter Zellen nachweisen zu können. Auch die Bestimmung des gesamten bFGF Proteins mit Hilfe der "Western-Blot" Technik war wegen des Fehlens geeigneter Antikörper unmöglich. Dennoch zeigen die, in diesem Abschnitt geschilderten Daten, daß es nach UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einer Akkumulation von bFGF-mRNA und zu einer verstärkten Neusynthese des bFGF-Proteins kommt und, daß dies sicherlich einer der Gründe ist, durch die es zu einer erhöhten bFGF-Aktivität im Kulturmedium UV-bestrahlter HeLa-Zellen kommt.

**10. IL-1 $\alpha$  ist möglicherweise für die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität eines HIV-1 Promoter-Konstruktes durch EPIF-Medium verantwortlich.**

Hauptziel der Arbeit war, wie anfangs erwähnt, die Reinigung, Identifizierung und Charakterisierung der Faktoren, die für die Kollagenase induzierende Aktivität von EPIF verantwortlich sind. Dieses Ziel ist, wie die in den vorangegangenen Abschnitten geschilderten Ergebnisse zeigen, auch erreicht worden. Neben der Kollagenase induzierenden Aktivität besitzt EPIF aber noch eine Reihe anderer Aktivitäten, beispielsweise erhöht es die transkriptionelle Aktivität eines HIV-1 Promoter-Konstruktes (Abb.2, Stein et al., 1989a). Es stellte sich daher die Frage, ob die in dieser Arbeit als Kollagenase induzierende Faktoren identifizierten Proteine, IL-1 $\alpha$  und bFGF, auch für die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität eines HIV-1 Promoter-Konstruktes durch EPIF verantwortlich sind. Hierzu wurden HeLa-Zellen transient mit verschiedenen HIV-1 Promoter-Konstrukten, die an das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase(CAT)-Reportergen gekoppelt waren, transfiziert. Die Zellen wurden mit Ko-Medium, UV-Medium (Abb. 21a), rekombinantem IL-1 $\alpha$  oder rekombinantem bFGF (Abb. 21b) behandelt und die CAT-Enzymaktivität gemessen.



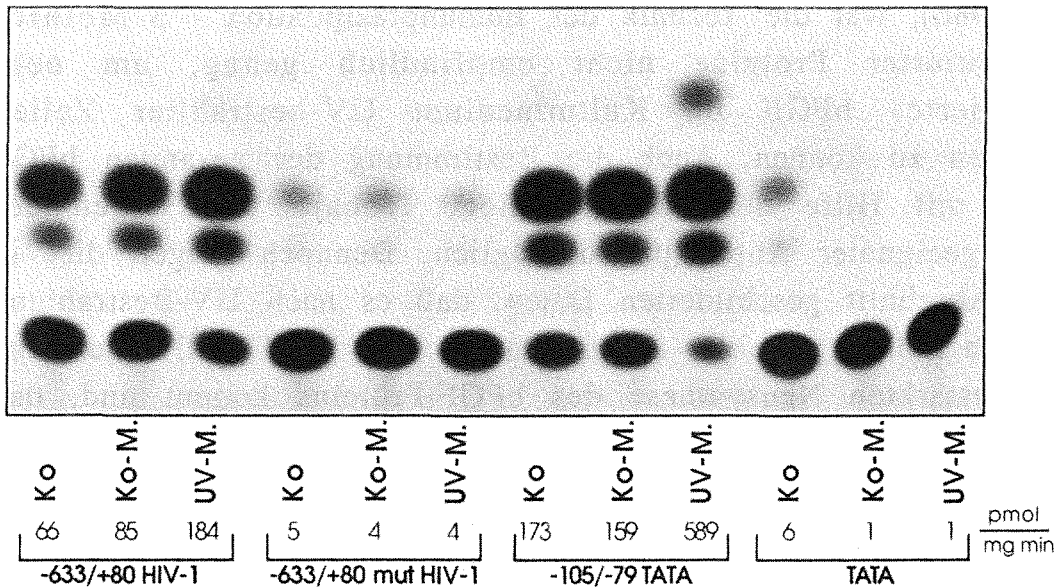


Abb. 21a: Medium UV-bestrahlter Zellen erhöht die transkriptionelle Aktivität von HIV-1 CAT-Konstrukten. Die angegebenen CAT-Konstrukte (10 $\mu$ g) wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nicht behandelt (Ko), mit Medium unbestrahlter HeLa-Zellen (Ko-M.) behandelt oder mit Medium von, mit 30J/m<sup>2</sup>, UV-bestrahlten HeLa-Zellen (UV-M.) behandelt. Die CAT-Aktivität wurde 42h nach der Induktion bestimmt und ist in pmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> angegeben.

Die Expression eines HIV-1 Promoter-CAT-Konstruktes (-633/+80 HIV-1), das den gesamten HIV-LTR, sowie einige env-Sequenzen enthält (Nabel und Baltimore, 1987, Rosen et al., 1985, Tong-Starksen et al., 1987), ist in HeLa-Zellen durch UV-Medium und IL-1 $\alpha$  induzierbar. Mutationen im sogenannten HIV-1 Enhancer (-633/+80 mut HIV-1) zerstören dagegen die Antwort des Gens auf EPIF und IL-1 $\alpha$ . Als Enhancer bezeichnet man DNA-Elemente, die die Transkription auch in größerer Entfernung zur Initiationsstelle und orientierungsunabhängig positiv regulieren (Ptashne, 1988, Serfling et al., 1985). Der HIV-1 Enhancer besteht aus zwei, fast identischen Kopien eines Sequenzmotivs (kB-enhancer), das ursprünglich im Promoter des Gens, das für die leichte Kette der Kappa-Immunglobuline kodiert, gefunden wurde (Picard und Schaffner, 1984, Sen und Baltimore, 1986). Dieser Enhancer stellt eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NFkB (Nuklearer Faktor kB) dar (Osborn et al., 1989).

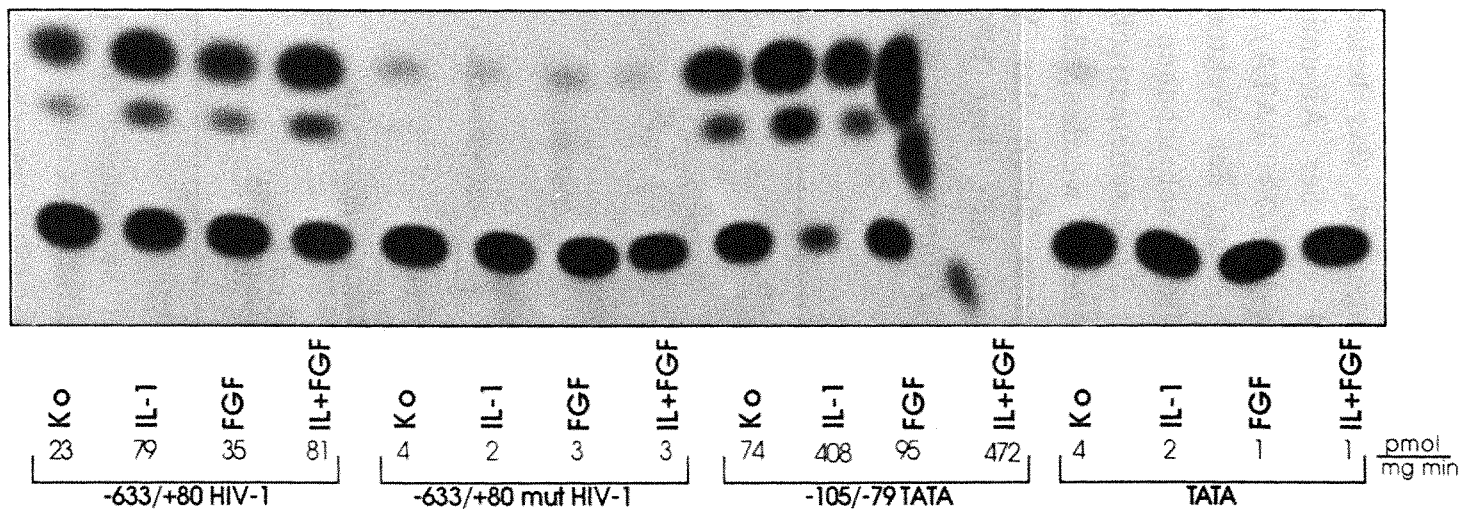


Abb. 21b: IL-1 $\alpha$  erhöht die transkriptionelle Aktivität von HIV-1 CAT-Konstrukten. Die angegebenen CAT-Konstrukte (10 $\mu$ g) wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nicht behandelt (Ko), mit 30ng/ml IL-1 $\alpha$  (IL-1), 10ng/ml bFGF (FGF) oder mit 30ng/ml IL-1 $\alpha$  und 10ng/ml bFGF (IL+FGF) behandelt. Die CAT-Aktivität wurde 42h nach der Induktion bestimmt und ist in pmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> angegeben.

Das hier eingesetzte Konstrukt (-633/+80 mit HIV-1) enthält Punktmutationen in beiden kB-Sequenzmotiven. Die Punktmutationen zerstören nicht nur die IL-1 $\alpha$ - und EPIF-Induktion, sondern reduzieren auch die basale Expression von HIV-1. Um zu beweisen, daß der HIV-1 Enhancer nicht nur nötig sondern auch ausreichend für die EPIF- und IL-1 $\alpha$ -Induktion ist, wurde ein synthetisches Oligonukleotid eingesetzt, das beide Enhancer-Motive von der Position -105 bis -79 vor der Albumin TATA-Box des *Xenopus* Albumingens enthält (-105/-79 TATA). Dieses Konstrukt ist durch EPIF und IL-1 $\alpha$  induzierbar, der Vektor (TATA) dagegen nicht. Die in diesem Abschnitt beschriebenen HIV-1 Promoter-Konstrukte sind in *Abbildung 21c* schematisch dargestellt. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß sich die EPIF-Wirkung auf den HIV-1 Promoter durch das Vorhandensein von IL-1 $\alpha$  im EPIF-Medium erklären läßt. Der bFGF aktiviert unter diesen Bedingungen den HIV-1 Promoter nur geringfügig.

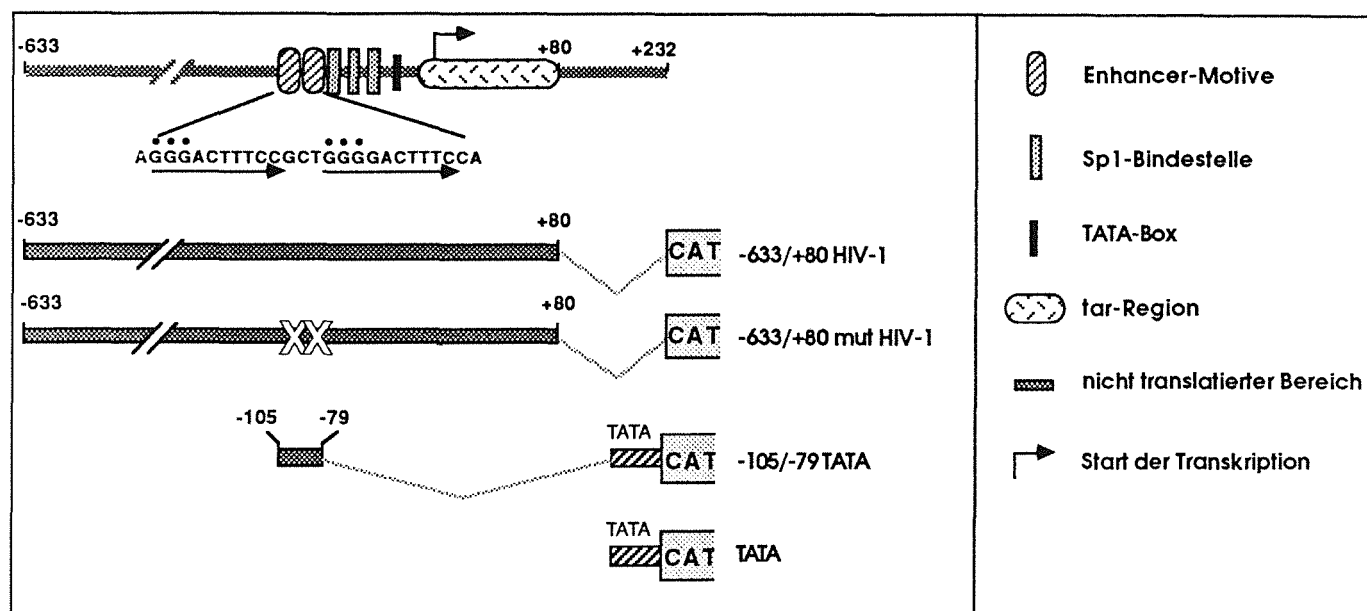


Abb. 21c: Schematischer Aufbau der verwendeten HIV-1 CAT-Konstrukte mit einigen wichtigen DNA-Elementen. Mit XX sind die Punktmutationen im HIV-1-Enhancer gekennzeichnet (aus GGG zwischen -104/-102 wurde CTC und aus GGG zwischen -90/-88 wurde CTC). Außerdem ist die CAT-kodierende Region und der *Xenopus* Albumin-Promoter (TATA) gekennzeichnet.

## **Diskussion:**

UV-Strahlung ist eine niederenergetische Strahlung, die nicht sehr tief in den Körper eindringt. Da die Haut die meiste Strahlungsenergie absorbiert, zeigt sich besonders an ihr die karzinogene Wirkung der UV-Strahlung. Der Zusammenhang zwischen UV-Strahlung und Hautkrebs ist schon sehr lange bekannt und gilt heute als gesichert (Scott und Straf, 1977). Da UV-Strahlung zudem eines der mutagenen Agenzien ist, denen sich der Mensch kaum gänzlich entziehen kann, ist es wichtig, den Einfluß von UV-Strahlung auf Säugerzellen zu untersuchen. UV-Strahlung führt beispielsweise dazu, daß bestrahlte Zellen einen Faktor (EPIF) sezernieren (Schorpp et al., 1984), der in unbestrahlten Zellen das gleiche genetische Programm induziert wie UV-Bestrahlung selbst. Hierzu zählt die Aktivierung des Gens, das für die extrazelluläre Protease Kollagenase kodiert (Schorpp et al., 1984) und die Aktivierung des HIV-1 Provirus (Stein et al., 1989a). Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung des Faktors oder der Faktoren, die hierfür verantwortlich sind. Es ist in dieser Arbeit gelungen zu zeigen, daß das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor für diese Aktivitäten verantwortlich sind. Ferner konnte gezeigt werden, daß UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einer Akkumulation von IL-1 $\alpha$ - und bFGF-mRNA und zu einer verstärkten Neusynthese der beiden Proteine führt.

### **EPIF-Reinigung**

An dieser Stelle sollen einige Anmerkungen über meine Vorgehensweise bei der EPIF-Reinigung gemacht werden. Sie unterscheidet sich in zwei Punkten wesentlich vom konventionellen Typ einer Proteinreinigung. Das Ziel war die Reinigung einer biologischen Aktivität und zwar der Kollagenase induzierenden Aktivität, d.h. jede Säulenfraktion wurde im biologischen Test auf Aktivität hin untersucht. Hierzu wurden die Fraktionen nach Dialyse auf lebende Zellen gegeben und die Menge des, von diesen Zellen,

neusynthetisierten und sezernierten Kollagenase Proteins bestimmt. Aus diesem Grund wurde auf den Zusatz von Protease-Inhibitoren und Substanzen wie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol verzichtet, denn es war nicht auszuschließen, daß Reste dieser Substanzen auch nach der Dialyse noch in den Proben sind und den biologischen Test unmöglich machen. Auch das Ergebnis der Reinigung war ein anderes, als es bei konventionellen Proteinreinigungen üblich ist. Normalerweise ist das Ziel einer Reinigung, den zu reinigenden Faktor in ausreichender Reinheit und Menge zu erhalten, so daß beispielsweise eine Identifizierung des gesuchten Proteins anhand einer Sequenzierung möglich ist. Die Reinigung von EPIF endete in dieser Arbeit damit, daß es möglich war, drei Kollagenase induzierende Faktoren voneinander zu trennen und die einzelnen Faktoren mittels Antikörpern, die gegen bekannte Kollagenase induzierende Faktoren gerichtet waren zu hemmen und damit zu identifizieren.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß die Identifizierung der sogenannten "Hochsalzfraktion", d.h. der Fraktion, die mit extrem hoher Affinität an Heparin-Sepharose bindet und die später als basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor identifiziert wurde, lange Zeit nicht aufgeklärt werden konnte. Diese Fraktion enthielt nur noch wenige Proteine und es wurden größere Mengen der Aktivität aus vielen Litern Kulturmedium aufgereinigt und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt, in der Hoffnung monoklonale Antikörper gegen diese Aktivität zu erhalten. Die immunisierten Tiere zeigten keine Immunantwort auf dieses Protein. Nachdem es dann gelungen war, diesen Faktor als basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor zu identifizieren, gab es hierfür eine Erklärung: Die Aminosäuresequenz des menschlichen bFGF Proteins hat eine 99%ige Homologie zu der des Rinderproteins (Abraham et al., 1986a, 1986b) und ist wahrscheinlich auch im Vergleich zu derjenigen der Maus stark konserviert. Demzufolge scheint ein sehr starker Selektionsdruck auf der Erhaltung der Struktur und Funktion dieses Proteins zu liegen. Aus diesem Grund ist es nicht erstaunlich, daß das Immunsystem einer Maus auf menschliches bFGF Protein nicht reagiert.

## UV-Induktion des Cytokins Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ).

IL-1 $\alpha$  wurde als Protein entdeckt, welches hauptsächlich von Makrophagen produziert wird und im Immunsystem bei der Aktivierung von T-Zellen und der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von B-Lymphocyten eine wichtige Rolle spielt (Übersichtsartikel: Giovine und Duff, 1990). Neben diesen Funktionen im Immunsystem hat es noch eine Fülle anderer Funktionen (z.B. es reguliert die Proliferation von Fibroblasten, Schmidt et al., 1982; es stimuliert die Kollagenase-Synthese in Fibroblasten, Postlewaite et al., 1983; es induziert die Transkription des Stromelysinpromoters, Frisch und Ruley, 1987; es stimuliert den HIV-1 Enhancer, Osborn et al., 1989) und wird außer von Makrophagen auch noch von vielen anderen Zellen (z.B. B-Zellen, T-Helfer-Zellen, Endothelzellen, Keratinocyten, Fibroblasten) produziert (Übersichtsartikel: Giovine und Duff, 1990). Es gibt zwei Formen des IL-1, das IL-1 $\alpha$  und das IL-1 $\beta$ . Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrem isoelektrischen Punkt (IL-1 $\alpha$  5.0, IL-1 $\beta$  7.0), sondern auch sehr stark in ihrer Aminosäuresequenz (Larrick, 1989). Die beiden menschlichen Proteine haben eine Aminosäuresequenzhomologie von nur 26%. Ihre Tertiärstruktur ist allerdings sehr ähnlich und sie binden auch an den gleichen Rezeptor (Larrick, 1989, Mizel et al., 1987). Beide Proteine induzieren in menschlichen Fibroblasten die Transkription des Kollagenase-Gens (Postlewaite et al., 1983). Eine UV-Induktion von IL-1 ist in früheren Arbeiten schon beschrieben worden. Allerdings wurde in diesen Arbeiten immer nur eine von vielen IL-1 $\alpha$ -Aktivitäten gemessen (diejenige, die Proliferation von Thymocyten zu aktivieren) (Ansel et al., 1984, Gahring et al., 1984). Da zudem IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  diese Aktivität besitzen, konnte bei diesen Versuchen nicht zwischen beiden differenziert werden. Ob UV-Bestrahlung zu einer verstärkten Transkription des IL-1-Gens, zu einer verstärkten Neusynthese des Proteins oder zur Aktivierung oder Sezernierung des Proteins führt, war bisher noch nicht bekannt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$  mRNA und zu einer verstärkten Neusynthese des IL-1 $\alpha$  Proteins führt. Eine UV-Induktion der IL-1 $\beta$  mRNA war nicht nachweisbar.

Sehr kontrovers ist derzeit die Diskussion darüber, wie IL-1 aus der Zelle gelangt. Da es kein typisches hydrophobes Signalpeptid besitzt, scheint der konventionelle Weg über endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Komplex nicht möglich zu sein.

Ich möchte im Folgenden exemplarisch einige Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen schildern, die sich mit der zellulären Verteilung und möglichen Sekretionsmechanismen beschäftigen. Im Großen und Ganzen ist man sich darüber einig, daß IL-1 nicht über das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Komplex sezerniert wird. So beschreiben einige Gruppen, daß IL-1-Aktivität in verschiedenen Zellkompartimenten z.B. in der Plasmamembran, in den Lysosomen und im Cytoplasma, jedoch nicht im endoplasmatischen Reticulum nachweisbar ist. Einigkeit herrscht auch weitgehend darüber, daß die 31kD-Form die Hauptform im Cytoplasma und die 17kD-Form die Hauptform im Zellüberstand darstellt. Wie aber die Sekretion bzw. die Prozessierung des IL-1 abläuft, ist bis heute nicht geklärt. Man erhält von Zelle zu Zelle unterschiedliche Ergebnisse. Zudem scheint die Sekretion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  unterschiedlich reguliert zu werden. Untersuchungen von Giri et al. (1985) lassen den Schluß zu, daß aus der 31kD-Form durch eine extrazelluläre Protease die 17kD-Form entsteht (da die 17kD-Form nicht in Zellysaten nachzuweisen ist). Eine extrazelluläre Protease, die die 31kD-Form in die 17kD-Form überführt, konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden (Hazuda et al., 1988). Die Arbeitsgruppe von Brody (1989) beschreibt, daß eine membran-gebundene Form des IL-1 $\alpha$ , die über Lektin-ähnliche Interaktion an die Plasmamembran gebunden ist, die Zwischenstufe darstellen könnte, über die IL-1 $\alpha$  prozessiert und sezerniert wird. Die Arbeitsgruppen von Kobayashi (1988) und Beuscher (1988) zeigen, daß IL-1 phosphoryliert werden kann und daß diese Phosphorylierung möglicherweise etwas mit dem Sekretionsmechanismus zu tun haben könnte. An den eben geschilderten Beispielen wird deutlich wie kompliziert der Prozessierungs- und Sekretionsmechanismus des IL-1 offensichtlich ist. Außerdem ist anzunehmen, daß er, nach den bisher vorliegenden Daten, von Zelle zu Zelle variiert.

Es gibt zwei interessante und einleuchtende Hypothesen, aus welchem Grund einige Signalmoleküle nicht über den

konventionellen Weg (endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Komplex) sezerniert werden.

Es könnte sein, daß ein anderer Weg gewählt wird, um so das "oxidierende" Milieu des endoplasmatischen Reticulums zu vermeiden (Rubartelli et al., 1990). Die biologisch aktive Form des IL-1 $\beta$  enthält beispielsweise zwei freie Cysteinreste (Priestle et al., 1988), die im Lumen des endoplasmatischen Reticulums oxidiert werden könnten, was dann zum Verlust der biologischen Aktivität des IL-1 $\beta$  führen könnte. Freie Thiol-Gruppen gibt es auch beim bFGF, der wie IL-1 kein hydrophobes Signalpeptid besitzt und auch nicht über den konventionellen Weg sezerniert wird.

Der Grund für einen anderen Sekretionsmechanismus könnte auch sein, daß dadurch vermieden wird, daß Ligand und Rezeptor über das gleiche Zellkompartiment nach außen transportiert werden. Wäre dies der Fall, könnte es passieren, daß der Wachstumsfaktor schon intrazellulär an seinen Rezeptor bindet und diesen innerhalb der Zelle aktiviert. Welche Folgen solch eine interne Aktivierung eines Wachstumsfaktor-Rezeptors haben kann, zeigt sich am Beispiel des bFGF, der wie oben erwähnt, normalerweise kein Signalpeptid besitzt. Transfiziert man in 3T3-Zellen, die bFGF-Rezeptor exprimieren, ein bFGF-Gen, das eine Signalsequenz enthält, so führt dies zu einer unkontrollierten autokrinen Stimulation und zur Transformation der Zellen (Yayon und Klagsbrun, 1990a, 1990b, Halaban et al., 1988).

Die hier vorliegende Arbeit erbrachte im Hinblick auf die UV-Induktion des IL-1 $\alpha$  Proteins folgende Ergebnisse: Nach UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen kommt es zu einer verstärkten Neusynthese der 31kD-Form des IL-1 $\alpha$  Proteins im Cytoplasma. Auch im Cytoplasma unbestrahlter Zellen ist eine geringe Syntheserate von IL-1 $\alpha$  Protein nachweisbar. Dies zeigt, daß IL-1 $\alpha$  wohl auch ständig von unbehandelten Zellen benötigt wird. IL-1 $\alpha$  scheint also nicht nur im Immunsystem essentiell zu sein. Die 17kD-Form war in diesen Experimenten im Cytoplasma nicht nachweisbar. Dies bestätigt die oben erwähnten Experimente anderer Arbeitsgruppen, die zeigen, daß die 17kD-Form nicht im Cytoplasma vorkommt und die Prozessierung demzufolge auch nicht im Cytoplasma stattfinden kann.



Der Nachweis der neusynthetisierten 17kD-Form im Kulturmedium gestaltete sich, wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, äußerst schwierig. Es ist für manche Zellen gezeigt worden, daß sehr große intrazelluläre Speicher an IL-1 $\alpha$  existieren und daß die Sekretion nur sehr langsam erfolgt (Hazuda et al., 1988). Das bedeutet, daß man bei einer Pulsmarkierung mit <sup>35</sup>S-Methionin nur einen Teil des intrazellulären IL-1 $\alpha$  Proteins, eben den neusynthetisierten Teil markiert. Da wiederum nur ein Teil dieses markierten Proteins im Laufe des Experimentes sezerniert wird, kann man nur geringe Mengen an sezerniertem, markiertem Protein im Kulturmedium erwarten. Dennoch zeigt diese Arbeit, daß UV-Bestrahlung in HeLa-Zellen auch verstärkt zur Sekretion der neusynthetisierten 17kD-Form führt. In diesen Experimenten, bei denen 11h nach UV-Bestrahlung für 5h mit <sup>35</sup>S-Methionin pulsmarkiert wurde (d.h. die Neusynthese zwischen der 11. und 16. Stunde nach UV-Bestrahlung gemessen wurde), war die 31kD-Form im Kulturmedium nicht nachweisbar. Bei den "Western-Analysen" waren UV-induzierte Proteine im Bereich von 17kD und im Bereich von 30-40kD nachweisbar. Im Unterschied zu der Immunpräzipitation mit <sup>35</sup>S-markierten Zellextrakten bzw. Kulturmedium weist man hierbei die Gesamtmenge an IL-1 $\alpha$  und nicht nur den neusynthetisierten Teil nach. Bei der Western-Analyse fiel auf, daß im Bereich von 17kD zwei UV-induzierte Banden und im Bereich von 31kD sogar mehrere UV-induzierte Banden mit den IL-1 $\alpha$  Antikörpern nachweisbar waren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist vielleicht im experimentellen Ansatz zu suchen. Im Gegensatz zur Immunpräzipitation bei der kurze Zeit (11-16h) nach UV-Bestrahlung, d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem der größte Teil der Zellen noch nicht strukturell geschädigt war, nach dem IL-1 $\alpha$  Protein geschaut wurde, wurde das Kulturmedium für die Western-Analyse erst 48h nach der UV-Bestrahlung geerntet. Zu diesem Zeitpunkt waren viele Zellen durch die UV-Bestrahlung schon abgetötet oder zumindest äußerlich schon sehr stark geschädigt. Dieser späte Zeitpunkt nach der UV-Bestrahlung wurde gewählt, da nach dieser Zeit die UV-induzierte EPIF-Aktivität am höchsten war. Das Auftreten der 31kD-Form im Medium ist also möglicherweise auf, durch Zellyse freigesetztes, IL-1 $\alpha$  zurückzuführen und spricht nicht für die Sekretion der 31kD Form des IL-1 $\alpha$ . Das Auftreten mehrerer Banden in beiden Mole-

kulargewichtsbereichen könnte auf eine proteolytische Aktivität zurückgeführt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit ließ sich auch die Existenz einer membrangebundenen Form des IL-1 $\alpha$ , wie sie für einige Zellen in der Literatur beschrieben ist, nachweisen (Bakouche et al., 1987, Brody und Durum, 1989, Lange-Wantzin et al., 1987, Kurt-Jones et al., 1985, Nagelkerken und van Breda Vriesman, 1986). Wie beim löslichen IL-1 $\alpha$  wurde auch hier die Kollagenase induzierende Aktivität dieser membrangebundenen IL-1 $\alpha$  Form nachgewiesen. Statt des konditionierten Mediums wurden Membranen aus unbestrahlten oder UV-bestrahlten Zellen auf normale menschliche Fibroblasten gegeben und die Menge an Kollagenase Protein bestimmt, das von diesen Zellen neusynthetisiert wurde. Schon unbestrahlte Zellen zeigen diese membrangebundene Aktivität, die sich durch UV-Bestrahlung noch verstärken läßt. Auch dieses membrangebundene Molekül kann bei der durch UV-Bestrahlung induzierten Signalkette eine Rolle spielen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß auch eine Zelle, die nicht Teil des Immunsystems ist, die Möglichkeit hat, über IL-1 $\alpha$  mit anderen Zellen in Kontakt zu treten. Dies geschieht offensichtlich in verstärktem Maß nach UV-Bestrahlung der Zellen. Im Falle des IL-1 $\alpha$  hat die Zelle die Möglichkeit diesen Kontakt zu unmittelbar benachbarten Zellen mit Hilfe von membrangebundenem IL-1 $\alpha$  und den Kontakt zu weiter entfernten Zellen durch lösliches IL-1 $\alpha$ , das von der Zelle sezerniert wird, herzustellen. Dies könnte im Falle der Aktivierung des HIV-1 Provirus von höchster Brisanz sein, da IL-1 $\alpha$ , das von bestrahlten Zellen der Haut gebildet und sezerniert wird, über die Körperflüssigkeiten zu HIV-1 infizierten Zellen im Körperinneren gelangen und dadurch zum Ausbruch von AIDS führen könnte. Die Möglichkeit einer Beteiligung von IL-1 $\alpha$  an der Signalkette, die *in der bestrahlten Zelle* zu einer Aktivierung des c-fos-Gens und des Kollagenase-Gens führt, wird in einem späteren Teil dieser Diskussion angesprochen.

## **UV-Induktion des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF).**

Es gibt zwei Arten des FGF, den basischen FGF mit einem isoelektrischen Punkt von 8-10 und den sauren FGF mit einem isoelektrischen Punkt von 5-7 (Folkman und Klagsbrun, 1987). Beide konnten in einer Vielzahl von Zellen und Geweben nachgewiesen werden und zeigen je nach Gewebe ein etwas unterschiedliches Molekulargewicht (15-18kD) und etwas unterschiedliche isoelektrische Punkte. Dies ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Prozessierung des Faktors in unterschiedlichen Geweben zurückzuführen. Die Aminosäuresequenz beider Proteine zeigt eine 53%ige Homologie und ihre Tertiärstruktur ist ähnlich (Folkman und Klagsbrun, 1987). Beide Wachstumsfaktoren zeigen sehr viele unterschiedliche biologische Aktivitäten; beispielsweise führen sie zur Proliferation, Migration und Differenzierung einer ganzen Reihe von Zellen (Übersichtsartikel: Yayon und Klagsbrun, 1990b, Folkman und Klagsbrun, 1987). Sowohl bFGF als auch aFGF besitzen, wie im letzten Abschnitt bereits erwähnt, kein typisches Signalpeptid, sind aber dennoch in der extrazellulären Matrix nachweisbar (Yayon und Klagsbrun, 1990b). Dies spricht dafür, daß ähnlich wie beim IL-1, ein vom konventionellen Typ des Sekretionsmechanismus abweichender Weg existieren muß. Es gibt eine ganze Familie von Oncogenen, die eine hohe Homologie zu aFGF und bFGF aufweisen. Zu dieser Familie gehören die Oncogene int2, hst/K-fgf, FGF5 und FGF7 (Yayon und Klagsbrun, 1990b, Delli-Bovi et al., 1988, Mansour und Martin, 1988, Zhan et al., 1988). Im Gegensatz zum aFGF und bFGF besitzen diese Proteine Signalpeptide. Diese Oncogene transformieren Zellen und induzieren Tumore. Im letzten Abschnitt wurde bereits angedeutet, wie man sich dies erklären kann. An dieser Stelle möchte ich auf diesen sehr interessanten Aspekt noch etwas genauer eingehen. Transformiert man 3T3-Zellen mit normaler bFGF cDNA (d.h. ohne Signalsequenz) (Yayon und Klagsbrun, 1990b, Rogelj et al., 1989) und erzeugt damit eine 20-100fach verstärkte Expression des bFGF, so kommt es lediglich zu einem etwas schnelleren Wachstum und einer etwas höheren Zelldichte. Transformiert man hingegen die 3T3-Zellen mit einer bFGF cDNA, der eine Signalsequenz hinzugefügt wurde, so

zeigen diese Zellen alle morphologischen und biochemischen Merkmale einer stark transformierten Zelle. Injiziert man 3T3-Zellen, die mit der normalen bFGF cDNA transfiziert sind in Nacktmäuse, so führt das weder zu Tumoren noch zu Lungenmetastasen; injiziert man dagegen Zellen, die das bFGF Protein exprimieren, das die Signalsequenz enthält, so zeigen diese Zellen etwa das gleiche tumorbildende und metastasierende Potential wie ras-transformierte Zellen. Diese Experimente deuten darauf hin, daß dieser Transformation eine autokrine Stimulierung durch den bFGF zugrunde liegt.

Es werden zwei autokrine Mechanismen diskutiert, die bei der Transformation eine Rolle spielen sollen. Zum einen die autokrine Transformation über einen externen Weg, d.h. der Wachstumsfaktor wird sezerniert und bindet an der Plasmamembran an seinen Rezeptor und zum zweiten die autokrine Transformation über einen internen Weg, d.h. der Wachstumsfaktor bindet schon innerhalb der Zelle z.B. auf dem Sekretionsweg an seinen Rezeptor und aktiviert diesen. Im Falle einer Transformation durch den bFGF wird angenommen, daß es sich um den internen autokrinen Weg handelt. Denn in den oben geschilderten Experimenten, in denen die Transfektion von 3T3-Zellen mit einer Signalsequenz enthaltenden bFGF cDNA zu einer Transformation dieser Zellen führte, konnte keine erhöhte Menge an extrazellulärem bFGF im Zellüberstand nachgewiesen werden. An einem anderen Beispiel wird deutlich, daß sich die Existenz eines internen autokrinen Wegs, im Falle des bFGF auch in einem anderen Versuchansatz nachweisen läßt (Halaban et al., 1988). Metastasierende Melanomzellen benötigen im Gegensatz zu normalen menschlichen Melanocyten keine Serumfaktoren zum Wachstum. Inkubiert man normale menschliche Melanocyten mit Extrakten aus Melanomzellen, so wachsen diese auch ohne Serumzugabe. Dieser Effekt läßt sich mit Antikörpern, die gegen den bFGF gerichtet sind, hemmen. Das Wachstum von Melanomzellen läßt sich dagegen nicht hemmen, wenn man dem Kulturmedium diese Antikörper zusetzt, sondern nur wenn man die Antikörper injiziert. Der gleiche Effekt wird erreicht, wenn man zu den Melanomzellen synthetische Peptide zusetzt, die dem Bereich des bFGF Proteins entsprechen, der für die Rezeptorbindung notwendig ist. Dieser Versuch zeigt, daß es Bedingungen gibt, unter

denen der bFGF schon intrazellulär an seinen Rezeptor bindet und diesen aktiviert und zwar ohne daß man dem bFGF Protein ein Signalpeptid hinzugefügt hat. Wieso der bFGF in Melanomzellen dazu in der Lage ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Sowohl bei den Experimenten, die mit der Signalsequenz enthaltenden bFGF cDNA durchgeführt wurden, als auch bei den Versuchen mit den menschlichen Melanomzellen war keine bFGF Aktivität im Medium nachzuweisen; dies könnte daran liegen, daß in diesen Fällen nur sehr wenig bFGF nach außen gelangt oder daß freier sezernierter bFGF sehr instabil ist.

Prinzipiell ist eine Sekretion und Speicherung des bFGF in der extrazellulären Matrix allerdings möglich (Yayon und Klagsbrun, 1990b). Wie dies geschieht ist noch nicht geklärt. Einige Wissenschaftler gehen davon aus, daß der bFGF nach dem Tod der Zelle durch Zellyse freigesetzt wird (Yayon und Klagsbrun, 1990b). Ob solch eine unkontrollierte Freisetzung tatsächlich eine physiologische Bedeutung hat, ist fraglich. Ein anderer Mechanismus, der derzeit diskutiert wird, ist die sogenannte polare Sekretion und Komigration von bFGF mit Heparansulfat-enthaltenden Oberflächen- und Matrixproteoglycanen (Yayon und Klagsbrun, 1990b, Moscatelli, 1988). Der bFGF in der extrazellulären Matrix ist teilweise an Heparansulfat-enthaltende Proteoglycane gebunden. Es könnte sein, daß er schon in der Zelle daran gebunden ist und deswegen mit diesen Molekülen zusammen sezerniert wird. Wie IL-1 ist auch der bFGF ein Substrat für Proteinphosphorylierung (Feige und Baird, 1989, Mascarelli et al., 1989). Man diskutiert derzeit auch eine Beteiligung von Phosphorylierung und Dephosphorylierung bei der Prozessierung und Sekretion des bFGF Proteins. Experimente, die dies eindeutig beweisen, fehlen zur Zeit aber noch.

An den hier geschilderten Experimenten wird deutlich, welche wichtige Rolle der bFGF in der Zelle spielen kann. Umso interessanter sind die, in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, daß bFGF einen Teil der EPIF-Aktivität darstellt und, daß UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zur Akkumulation der bFGF mRNA und zu einer verstärkten Neusynthese des bFGF Proteins führt. Es war bisher nicht bekannt, daß UV-Bestrahlung den bFGF induziert. Eine mögliche Erklärung für die, in dieser Arbeit gezeigte,

Existenz von mindestens 6 verschiedenen großen Transkripten könnte sein, daß die Transkription an mehreren Stellen stoppt (Kurokawa et al., 1987). Hierfür spricht der Nachweis mehrerer polyA bzw. polyA-ähnlicher Signale im 3'-Bereich des Gens. Die Tatsache, daß nur das größte Transkript UV-induziert ist, spricht dafür, daß UV-Bestrahlung in jedem Fall auch posttranskriptional wirken muß. Beispielsweise könnte UV-Bestrahlung gleichzeitig die Transkription erhöhen und die Erzeugung kurzer Transkripte hemmen oder UV-Bestrahlung könnte spezifisch die längste RNA stabilisieren (Pays et al., 1990).

Neben der Akkumulation der bFGF mRNA war es möglich eine UV-induzierte Neusynthese des bFGF Proteins nachzuweisen. Bei der Immunpräzipitation wurden neben einer induzierten Bande im Bereich von 17kD noch zwei weitere UV-induzierte Banden nachgewiesen, die ein etwas größeres Molekulargewicht haben. Die Spezifität der verwendeten Antikörper (mit den gegen das aFGF Protein gerichteten Antikörpern präzipitiert man keines dieser Proteine) und die Tatsache, daß man nach einer UV-induzierten Akkumulation der mRNA eigentlich auch eine verstärkte Synthese des Proteins erwarten muß, sprechen dafür, daß es sich bei den UV-induzierten immunpräzipitierten Proteinen um bFGF oder immunologisch verwandte Proteine handelt. Auch andere Arbeitsgruppen haben mit bFGF Antikörpern drei Proteine mit der hier gefundenen Größe immunpräzipitieren können (Li und Shipley, 1990). Da das bFGF Protein jedoch nicht als Vorläufermolekül synthetisiert wird, das anschließend in die 17kD-Form überführt wird, ist nicht klar, wie es zu den beiden größeren Proteinen kommt. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die UV-induzierten Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30kD die Genprodukte der schon oben erwähnten Oncogene *int2* (MG: 27000kD), *hst/K-fgf* (MG: 23000kD), *FGF5* (MG: 29000kD) oder *FGF7* (MG: 28000kD) sind, die eine 40-50%ige Aminosäuresequenz-Homologie zum aFGF und bFGF aufweisen. Es ist nicht auszuschließen, daß die bFGF-Antikörper mit einem dieser Proteine kreuzreagieren. Es müßte sich um Proteine handeln, die in dem Bereich, der von den Antikörpern erkannt wird, eine hohe Aminosäuresequenzhomologie zum bFGF nicht aber zum aFGF aufweisen, da sonst auch die aFGF Antikörper die Proteine ausfällen sollten.

Diese Daten zeigen, daß der Zelle neben IL-1 $\alpha$  ein weiteres Signalmolekül, nämlich der bFGF zur Verfügung steht, um andere Zellen nach UV-Bestrahlung zu erreichen. Wie IL-1 $\alpha$  könnte auch der bFGF an der Signalkette beteiligt sein, die in der bestrahlten Zelle zur Aktivierung von Genen, beispielsweise des c-fos oder des Kollagenase-Gens führt. Im letzten Abschnitt der Diskussion werden einige Aspekte dieser Signalkette dargestellt und eine Beteiligung von IL-1 $\alpha$  und bFGF bei diesem Mechanismus diskutiert.

An dieser Stelle ist noch zu sagen, daß mit IL-1 $\alpha$  und bFGF die Faktoren, die den Teil der EPIF-Aktivität darstellen, der für die Aktivierung des Kollagenase-Gens und die Aktivierung der HIV-1 Gen-Konstrukte verantwortlich ist, identifiziert werden konnten. Für einen anderen Teil der EPIF-Aktivität ist diese Frage noch nicht geklärt. EPIF besitzt auch die Fähigkeit in unbestrahlten Zellen die Mutationsfrequenz zu erhöhen. Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich zu untersuchen, ob IL-1 $\alpha$  und bFGF oder ein anderer, im EPIF-Medium enthaltener Faktor für diese Aktivität verantwortlich ist.

**Sind IL-1 $\alpha$  und bFGF an der UV-induzierten Aktivierung des c-fos-Gens und des Kollagenase-Gens in der bestrahlten Zelle beteiligt?**

Wie im letzten Abschnitt bereits erwähnt, könnte IL-1 $\alpha$  und/oder bFGF auch an der Signalkette beteiligt sein, die in der bestrahlten Zelle zur Aktivierung von Genen führt. Prinzipiell könnte man sich drei Wege vorstellen über die ein Signal, das vom UV-induzierten DNA-Schaden ausgeht, schließlich seine "Ziel-Gene", d.h. die UV-induzierbaren Gene erreicht.

1.) Der kürzeste Weg wäre sicherlich der intranukleäre Weg, denn sowohl der Anfang der Signalkette (DNA-Schaden) als auch deren Ende (Ziel-Gene) befinden sich im Zellkern.

2.) Der, auf den ersten Blick wahrscheinlichste Weg, wäre wohl der Weg über das Cytoplasma, denn das Cytoplasma ist der stoffwechselaktivste Teil der Zelle und der Ort an dem die Proteinbiosynthese stattfindet. Man kann sich nur schwer vorstellen, daß

eine anscheinend so komplizierte Signalkette ohne Beteiligung des Cytoplasmas ablaufen kann.

3.) Der auf den ersten Blick umständlichste Weg, wäre der extrazelluläre Weg, denn das Signal müßte zuerst aus dem Kern, durch das Cytoplasma aus der Zelle herausgelangen und dann den ganzen Weg wieder zurück um schließlich die entsprechenden Gene im Kern zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Experimente mit der Substanz Suramin durchgeführt, die Rückschlüsse auf die UV-induzierte Signalkette und die dabei beteiligten Komponenten zulassen. Suramin ist eine polyanionische Substanz, die die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren verhindert (Coffey et al., 1987, Fantini et al., 1989). Diese Wirkung von Suramin gilt als gesichert. Dagegen ist nicht geklärt, ob Suramin in die Zelle eindringt oder nicht. Zum einen wird beschrieben, daß es in v-sis transformierten Zellen zur Aufnahme von Suramin kommt und zum anderen wird bezweifelt, daß ein solch hochgeladenes Molekül wie Suramin die Plasmamembran passieren kann (Huang und Huang, 1988, Yayon und Klagsbrun, 1990b). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Suraminexperimente zeigen, daß Suramin sowohl die UV-Induktion der Kollagenase als auch die UV-Induktion von c-fos hemmt, die TPA-Induktion der Kollagenase und die TPA-Induktion von c-fos aber nicht. Demnach könnte bei der UV-induzierten Signalkette eine Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion eine Rolle spielen, die für die TPA-Induktion nicht nötig ist. Teile der UV- und TPA-induzierten Signalkette sind aber auch identisch. So wird sowohl die UV-Induktion als auch die TPA-Induktion von c-fos durch die gleichen Proteinkinase-Hemmstoffe inhibiert (Büscher et al., 1988, Krämer et al., 1990). Die Proteinkinasen, die in diesen Versuchen als UV- bzw. TPA-Induktion limitierend festgestellt wurden, sollten beiden Signalketten gemeinsam sein. Ein Unterschied zwischen UV- und TPA-induzierter Signalkette, im Hinblick auf Proteinkinasen besteht darin, daß es nach TPA-Behandlung im Unterschied zur UV-Bestrahlung zur Translokation der Proteinkinase C vom Cytoplasma zur Membran kommt. Die Aktivierung der Proteinkinase C durch TPA ist mit großer Wahrscheinlichkeit bei der TPA-Induktion von Genen beteiligt (Angel et al., 1987a, Blumberg, 1988, Nishizuka, 1984). Falls Sura-



min irgendwie die Aktivierung einer Proteinkinase beeinflusst, z.B. eine Liganden-aktivierte Rezeptor-Kinase und dadurch die UV-Induktion hemmt, muß es sich um eine solche Proteinkinase handeln, die nur bei der UV-Induktion eine Rolle spielt, bei der TPA-Induktion aber nicht.

Auch die Tatsache, daß Suramin sowohl die UV-Induktion der Kollagenase als auch die UV-Induktion von c-fos hemmt, läßt Rückschlüsse auf die Signalkette zu. Bei der UV-Induktion der Kollagenase könnte man sich durchaus eine Beteiligung der EPIF-Bestandteile IL-1 $\alpha$  und bFGF vorstellen. Wenn diese Faktoren in der Lage sind in unbestrahlten Zellen die Kollagenase zu induzieren, so könnten sie diese Funktion auch bei der bestrahlten Zelle selbst ausüben.

Das Kollagenase-Gen ist eines der Gene, das spät auf UV-Bestrahlung reagiert. UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen führt erst nach etwa 24 Stunden zu einer Akkumulation der Kollagenase mRNA. Zu dieser Akkumulation kommt es nur, wenn man Proteinsynthese zuläßt. Das bedeutet, daß für diese UV-Induktion Proteine notwendig sind, die ständig neusynthetisiert werden müssen. IL-1 $\alpha$  und bFGF sind Proteine, die nach UV-Bestrahlung verstärkt synthetisiert werden und zwar früh genug um bei der UV-Induktion der Kollagenase beteiligt sein zu können. Da zudem sowohl die IL-1 $\alpha$ - als auch die bFGF-induzierte transkriptionelle Aktivierung des Kollagenase-Gens eine Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion beinhaltet, die durch Suramin hemmbar ist, könnte man sich durchaus eine Beteiligung der EPIF-Komponenten IL-1 $\alpha$  und bFGF an der UV-Induktion der Kollagenase in der bestrahlten Zelle vorstellen. Die extrazelluläre Signalkette könnte demnach wie folgt verlaufen: Die UV-bestrahlte Zelle synthetisiert und sezerniert EPIF (IL-1 $\alpha$ /bFGF), dieses bindet an Oberflächenrezeptoren und induziert eine Signalkette, die schließlich mit der Induktion der Kollagenase endet. Suramin hemmt die Bindung von EPIF an die Rezeptoren und hemmt dadurch auch die UV-Induktion der Kollagenase.

Auch bei der UV-Induktion von c-fos in der bestrahlten Zelle könnte man sich eine Beteiligung der EPIF-Bestandteile IL-1 $\alpha$  und bFGF vorstellen. Im Gegensatz zur Kollagenase gehört das c-fos Gen zu den Genen, die sehr früh auf die UV-Bestrahlung reagieren. Bereits 15-30 Minuten nach der UV-Bestrahlung ist eine Akku-

mulation der c-fos mRNA nachzuweisen (Büscher et al., 1988). Die Kinetik der Akkumulation gleicht sehr stark derjenigen der bFGF mRNA und ist bedeutend schneller als diejenige der IL-1 $\alpha$  mRNA. Da zur UV-Induktion des c-fos-Gens aber keine Proteinneusynthese notwendig ist, könnte man sich in diesem Fall eine Beteiligung von bereits in der Zelle vorliegendem IL-1 $\alpha$  oder bFGF-Protein bei dieser UV-induzierten Signalkette vorstellen. Dies würde dann auch erklären, warum auch die UV-Induktion des c-fos-Gens durch Suramin hemmbar ist. Diese Signalkette könnte ähnlich wie die Signalkette, die zur UV-Induktion der Kollagenase führt, extrazellulär verlaufen. Die sehr schnelle Kinetik der c-fos RNA Akkumulation nach UV-Bestrahlung spricht aber eher gegen einen extrazellulären Verlauf. Da es möglich ist, daß Suramin auch in die Zelle eindringen kann, könnte man sich vorstellen, daß die Wachstumsfaktor-Rezeptor Interaktion, die bei der UV-Induktion von c-fos offensichtlich beteiligt ist und die durch Suramin hemmbar ist, intrazellulär stattfindet. Das Gleiche kann natürlich auch für die UV-Induktion der Kollagenase zutreffen, denn es ist bisher nicht bewiesen, daß die Induktion tatsächlich ausschließlich über den extrazellulären Weg läuft.

Man könnte sich durchaus vorstellen, daß IL-1 $\alpha$  oder bFGF bei einer solchen, intrazellulär ablaufenden Signalkette, eine Rolle spielen. Vorallem für den bFGF sind genau die Eigenschaften beschrieben worden, die ein Faktor, der Teil dieser Signalkette sein könnte, haben sollte. Zum einen ist im Falle des bFGF die Existenz eines autokrinen internen Weges bei der Transformation von Zellen durch Signalpeptid enthaltendes bFGF-Protein beschrieben (Yayon und Klagsbrun, 1990b, Rogelj et al., 1989) und zum anderen ist gezeigt worden, daß die autokrine Transformation von Zellen durch bFGF durch Suramin gehemmt wird (Yayon und Klagsbrun, 1990a). Allerdings handelt es sich bei dem bFGF-Protein, von dem hier die Rede ist, um ein Protein, das ein Signalpeptid enthält. Durch dieses Signalpeptid gelangt der bFGF wahrscheinlich in die gleichen Zellkompartimente, wie sein Rezeptor, aktiviert diesen intrazellulär und führt so zur Transformation. Die Existenz eines internen autokrinen Weges in menschlichen Melanomzellen zeigt, daß es offensichtlich auch Bedingungen gibt, unter denen das bFGF Protein, ohne daß man ihm ein Signalpeptid hinzufügt, intrazellulär an

seinen Rezeptor binden und diesen aktivieren kann. Wenn es nach UV-Bestrahlung zum Ablauf einer intrazellulären Signalkette unter Beteiligung des bFGF kommen sollte, müßte UV-Bestrahlung irgendwie dazu führen, daß bFGF intrazellulär an seinen Rezeptor binden kann. Man könnte sich zwei Wege vorstellen, wie dies geschehen könnte:

1.) UV-Bestrahlung könnte dazu führen, daß Zellkompartimente in denen der bFGF oder der Rezeptor gespeichert, oder an die Membran transportiert werden, strukturell geschädigt werden und eine intrazelluläre Bindung von bFGF an seinen Rezeptor möglich ist.

2.) An der UV-Antwort könnte neben dem bFGF eines der Oncogenprodukte (int2, hst/F-fgf, FGF5, FGF7) beteiligt sein. Diese Proteine weisen, wie oben erwähnt, eine hohe Sequenzhomologie zum bFGF-Protein auf. Für eine Beteiligung eines oder mehrerer dieser Proteine sprechen die Daten, die in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen. Mit den bFGF-Antikörpern konnten neben dem Protein, das die Größe des bFGF Proteins besitzt, noch zwei größere Proteine (20-30kD) immunpräzipitiert werden, deren Neusynthese, wie die des bFGF Proteins, durch UV-Bestrahlung verstärkt wird und die offensichtlich mit den bFGF-Antikörpern kreuzreagieren. Wenn es sich dabei tatsächlich um Produkte dieser Oncogene handelt, könnte man sich durchaus vorstellen, daß diese an einer intrazellulären Signalkette beteiligt sind. Diese Proteine besitzen ein Signalpeptid und werden demzufolge über endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Komplex transportiert. Sie könnten in diesen Zellkompartimenten an den ebenfalls in diesen Kompartimenten transportierten Rezeptor binden und intrazellulär die Signalkette auslösen, die beispielsweise zur Aktivierung des c-fos- oder des Kollagenase-Gens führt. Da die Neusynthese der Proteine durch UV-Bestrahlung verstärkt wird, würde man über diese Signalkette auch eine durch UV-Bestrahlung verstärkte Aktivierung dieser beiden Gene erwarten.

Zusammenfassend läßt sich Folgendes sagen: Es spricht vieles dafür, daß die UV-induzierte Signalkette, die zur Aktivierung des Kollagenase- und des c-fos Gens führt, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär ablaufen kann, und daß IL-1 $\alpha$  und bFGF daran beteiligt sein können. Der endgültige Beweis steht aber noch aus. In *Abb. 22*

ist schematisch dargestellt, wie man sich den Ablauf dieser Signalketten vorstellen könnte.

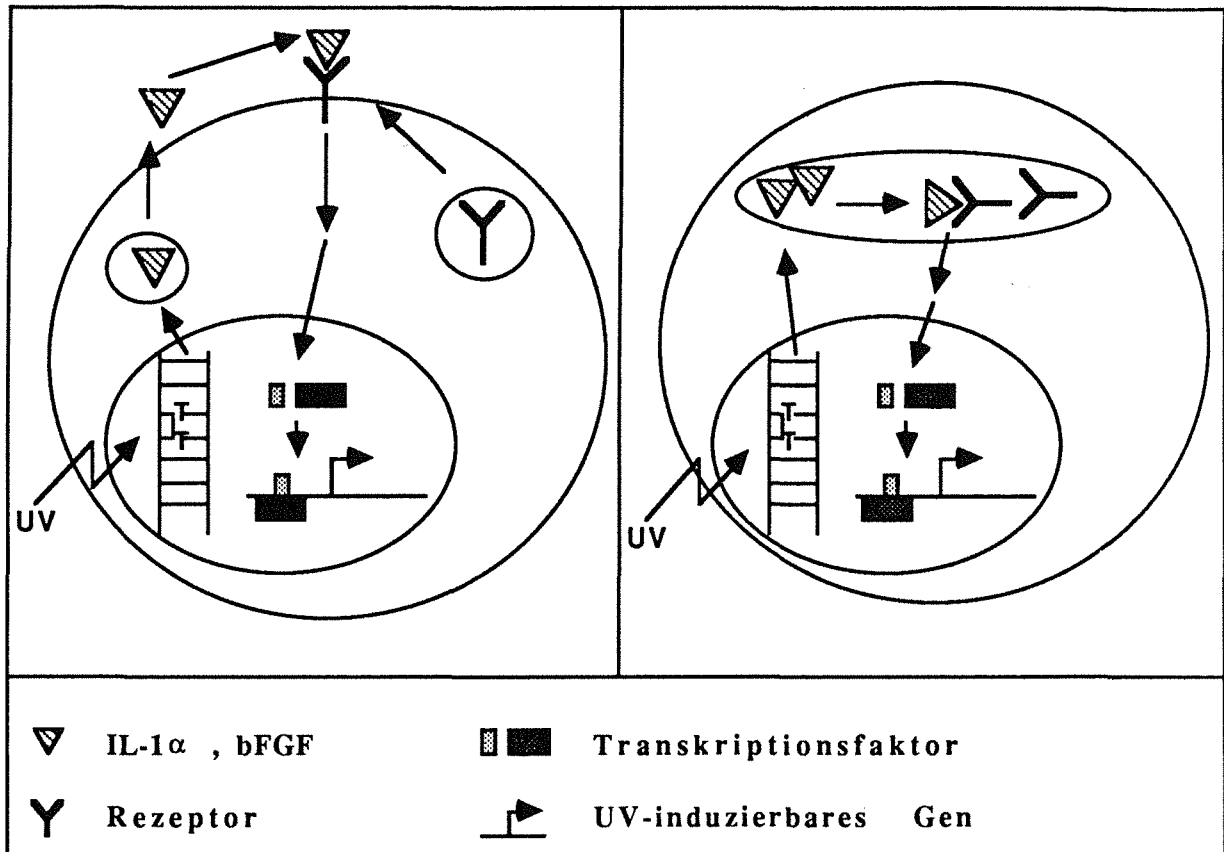


Abb. 22: Extrazellulär (links) und intrazellulär (rechts) verlaufende Signalkette bei der UV-induzierten Aktivierung von Genen. Linkes Schema: Nach UV-Bestrahlung werden IL-1 $\alpha$  und/oder bFGF verstärkt sezerniert und binden an ihre Rezeptoren in der Plasmamembran. Die dadurch aktivierten Rezeptoren, aktivieren ihrerseits direkt oder indirekt die Transkriptionsfaktoren (z.B. c-jun, c-fos), die für die Aktivierung der UV-induzierbaren Gene (z.B. des Kollagenase-Gens) verantwortlich sind. Rechtes Schema: Nach der UV-Bestrahlung binden IL-1 $\alpha$  und/oder bFGF intrazellulär an ihre Rezeptoren. Die dadurch aktivierten Rezeptoren, aktivieren ihrerseits direkt oder indirekt die Transkriptionsfaktoren (z.B. c-jun, c-fos), die für die Aktivierung der UV-induzierbaren Gene (z.B. des Kollagenase-Gens) verantwortlich sind.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß IL-1 $\alpha$  und bFGF für die EPIF-vermittelte Induktion des Kollagenase-Gens verantwortlich sind und IL-1 $\alpha$  für die EPIF-vermittelte Aktivierung von HIV-1 Gen-Konstrukten verantwortlich ist. UV-Bestrahlung führt zu einer Akkumulation der IL-1 $\alpha$ - und bFGF-mRNA und zu einer verstärkten Synthese der beiden Proteine. Außerdem hat man mit IL-1 $\alpha$  und dem bFGF möglicherweise zwei Faktoren identifiziert, die an der UV-induzierten Signalkette, die zur Aktivierung von Genen in der bestrahlten Zelle führt, beteiligt sein können.

### **Ausblick:**

Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze, mit denen man eine Beteiligung von IL-1 $\alpha$  und bFGF an der UV-induzierten Signalkette, die in der bestrahlten Zelle zur Aktivierung von Genen führt, nachweisen könnte.

1.) Bei der UV-Induktion des Kollagenase-Gens und des c-fos-Gens könnte man sich, wie oben erwähnt einen extrazellulären Weg unter Beteiligung von IL-1 $\alpha$  und/oder bFGF vorstellen. Wenn dieser Weg existiert, dann sollte es möglich sein, die UV-Induktion von c-fos und der Kollagenase durch Zugabe von IL-1 $\alpha$ - und bFGF-Antikörpern ins Kulturmedium zu verhindern.

2.) Eine Beteiligung von intrazellulär wirkendem IL-1 $\alpha$  und/oder bFGF bei der UV-Induktion der Kollagenase oder der UV-Induktion von c-fos könnte man folgendermaßen überprüfen:

a.) Mit sogenannten "antisense"-Oligonukleotiden. Hierbei handelt es sich um Nukleotidfolgen, die komplementär zu bestimmten Bereichen der mRNA, in diesem Fall der IL-1 $\alpha$  und bFGF mRNA sind. Mit dieser Methode ist es möglich die Neusynthese der betreffenden Proteine zu verhindern (Becker et al., 1989), da die "antisense"-Oligonukleotide an die mRNA binden und die Translation verhindern. Wenn Neusynthese von IL-1 $\alpha$ - und/oder bFGF-Protein bei der UV-Induktion eine Rolle spielt, sollte es möglich sein, diese UV-Induktion mit den "antisense"-Oligonukleotiden gegen die IL-1 $\alpha$ - und bFGF-mRNA zu verhindern. Diese Methode scheint geeignet zu sein, die UV-Induktion der Kollagenase zu untersuchen, denn es ist bekannt, daß Proteinneusynthese für die UV-Induktion der

Kollagenase notwendig ist. Die UV-Induktion des c-fos-Gens findet auch in Abwesenheit von Proteinsynthese statt; daher ist die Chance, die UV-Induktion von c-fos mit dieser Methode zu hemmen ziemlich gering. Man müßte relativ lange Zeit vor der UV-Induktion relativ große Mengen der "antisense"-Oligonukleotide anbieten, um so die intrazellulären Speicher an IL-1 $\alpha$  und bFGF zu entleeren.

b.) Mit Antikörpern, die gegen IL-1 $\alpha$  und bFGF gerichtet sind (Halaban et al., 1988) und die man mit geeigneten Methoden in die Zellen hineinbringt (Okada und Rechsteiner, 1982), sollte es möglich sein die Aktivität der beiden Proteine in der Zelle zu blockieren. Eine Möglichkeit, die Antikörper in die Zellen zu bringen, ist das Einschleusen der Antikörper mit Hilfe von Pinocytosevesikeln und eine anschließende osmotische Lyse dieser Vesikel (Okada und Rechsteiner, 1982), wodurch die Antikörper in der Zelle freigesetzt werden. Gegenüber, der unter 2a.) beschriebenen Methode hat diese Methode den Vorteil, daß auch bereits synthetisiertes Protein in der Zelle nicht wirken kann. Auch die UV-Induktion von c-fos, zu der keine Proteinneusynthese notwendig ist, sollte mit dieser Methode gehemmt werden, wenn IL-1 $\alpha$  und/oder bFGF dabei eine Rolle spielen.

c.) Auch mit der dritten Methode verhindert man, daß die Proteine in der Zelle ihre Wirkung ausüben können. Bei dieser Methode gibt man zu den Zellen synthetische Peptide (20-30 Aminosäuren lang), die dem Bereich des IL-1 $\alpha$ - oder bFGF-Proteins entsprechen, der für die Rezeptorbindung notwendig ist (Halaban et al., 1988, Baird und Ling, 1987). Diese Peptide werden von der Zelle aufgenommen und blockieren den Rezeptor. Eine UV-Induktion sollte, wenn die intrazelluläre Bindung von IL-1 $\alpha$  und bFGF an ihre Rezeptoren dazu notwendig ist, dann nicht mehr möglich sein.

Mit einer der geschilderten Methoden sollte es möglich sein, eine Beteiligung von IL-1 $\alpha$  und bFGF an der UV-induzierten Signalkette, die in der bestrahlten Zelle zur Aktivierung von Genen führt, nachzuweisen; ein Nachweis, der die Aufklärung der UV-induzierten Signalkette einen großen Schritt weiter bringen würde.

# Literaturverzeichnis

Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. und Fiddes, J.C. (1986a). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organisation. *EMBO J.* 5: 2523-2528.

Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D. und Fiddes, J.C. (1986b). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233: 545-548.

Alwine, J. C., Kemp, D. J. und Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354.

Angel, P., Pötting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Schorpp, M. und 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. und Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2256-2266.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729-739.

Ansel, J., Luger, T.A., Kock, A., Hochstein, D. und Green, I. (1984). The effect of in vitro UV irradiation on the production of IL 1 by murine macrophages and p388D<sub>1</sub> cells. *J. Immunology* 133: 1350-1355.

Auron, P.E. et al.: Studies on the molecular nature of human interleukin 1 (1987), *J. Immunology* 138, 1447-1456.

Aviv, H. und Leder, P. (1972). Purification of biological active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1409-1412.

Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988a). Activation of DNA binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NFκB transcription factor. *Cell* 53: 211-217.

Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988b). I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF $\kappa$ B transcription factor. *Science* **242**: 540-546.

Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1989). A 65-kD subunit of active NF- $\kappa$ B is required for inhibition of NF- $\kappa$ B by I $\kappa$ B. *Genes Dev.* **3**: 1689-1698.

Baird, A. und Ling, N. (1987). Fibroblast growth factors are present in extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro: implication for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**: 428-435.

Bakouche, O., Brown, D.C., Lachman, L.B. (1987). Subcellular localization of human monocyte IL1; evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL1 release. *J. Immunology* **138**: 4249-4255.

Bauer, E.A., Cooper, T.W., Huang, J.S., Altman J. und Deuel, T.F. (1985). Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 4132-4136.

Becker, D., Meier, C.B. und Herlyn, M. (1989). Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *EMBO J.*, **8**, 3685-3691.

Beuscher, H.U., Nickells, M.W. und Colten, H.R. (1988). The precursor of interleukin-1 $\alpha$  is phosphorylated at residue serine 90. *J. Biol. Chem.* **263**: 4023-4028.

Bickle, T.A., Pirotta, V. und Imber, R. (1977). A simple general procedure for purifying restriction endonucleases. *Nucl. Acids Res.* **4**: 2561-2572.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Blumberg, P. M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* **48**: 1-8.

Brinckerhoff, C.E. und Auble, D.T. (1990). Regulation of collagenase gene expression in synovial fibroblasts. *Structure, Molecular Biology, and Pathology of Collagen* **580**: 355-374.

Brody, D.T. und Durum, S.K. (1989). Membrane IL-1: IL-1 $\alpha$  precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J. Immunology*, **143**: 1183-1187.



Brown, P. C., Tlsty, T. D. und Schimke, R. T. (1983). Enhancement of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by treatment of mouse 3T6 cells with hydroxyurea. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1097-1107.

Bruls, W. A. G., Slaper, H., van der Leun, J. C. und Berrens, L. (1984). Transmission of human epidermis and stratum corneum as function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photobiol.* **40**: 485-494.

Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. und 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.

Cleaver, J.E.: Defective repair replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum cells (1968), *Nature*, **218**, 652-656.

Cleaver, J. E. (1969). Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 428-435.

Coffey Jr, R. J., Leof, E. B., Shipley, G. D. und Moses, H. L. (1987). Suramin inhibition of growth factor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J. Cell. Physiol.* **132**: 143-148.

Constantopoulos, G., Rees, S., Cragg, B.G., Barranger, J.A. und Brady, R.O. (1980). Experimental animal model for mucopolysaccharidosis: Suramin-induced glycosaminoglycan and sphingolipid accumulation in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 3700-3704.

Curran, T. und Franza, B.R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**: 395-397.

Dagleish, A. G., Beverley, C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. und Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767.

Dayer, J.M., Beutler, B. und Cerami, A. (1985). Cachectin/ tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* **162**: 2163-2168.

Delli-Bovi, P., Curatola, A.M., Newman, K.M., Sato, Y., Moscatelli, D., Hewick, R.M., Rifkin, D.B. und Basilico, C. (1988). Processing, secretion and biological properties of a novel growth factor of the fibroblast growth factor family with oncogenic potential. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2933-2941.

Denhardt, D. T. (1966). A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641-646.

Dinareello, C.A., Clark, B.D., Puren, A.J., Savage, N. und Rosoff, P.M. (1989). The interleukin 1 receptor. *Imm. Today* **10**: 49-51.

Durum, S.K., Schmidt, J.A. und Oppenheim J.J. (1985). Interleukin 1: An immunological perspective. *Ann. Rev. Imm.* **3**: 263-287.

Dynan, W. S. und Tjian, R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* **316**: 774-778.

Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J.P., Angel, P. und Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* **6**: 1899-1904.

Elledge, S.E., Walker, G.C.: Proteins required for UV-light and chemical mutagenesis; identification of the products of the umuC locus of E.coli (1983), *J. Mol. Biol.*, **164**, 175-192.

Ellis, S.M., Nabeshima, K. und Biswas, C. (1989). Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Research* **49**: 3385-3391.

Fantini, J., Rognoni, J.B., Roccabianca, M., Pommier, G. und Marvaldi, J. (1989). Suramin inhibits cell growth and glycolytic activity and triggers differentiation of human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D4. *J. Biol. Chem.* **264**: 10282-10286.

Feige, J.J. und Baird, A. (1989). Basic fibroblast growth factor is a substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 3174-3178.

Folkman, J. und Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* **235**: 442-447.

Fornace Jr., A. J., Schalch, H. und Alamo Jr., I. (1988). Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4716-4720.

Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouty, S., Dani, S., Jeanteur, P. und Blanchard, J.M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1431-1442.

- Frisch, S.M. und Ruley, H.E. (1987). Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. of Biol. Chem.* **262**: 16300-16304.
- Furutani, Y., Notake, M. und Fukui, T. (1986). Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucl. Acids Res.* **14**: 3167-3179.
- Gahring, L., Baltz, M., Pepys, M.B., Daynes, R.: Effect of ultraviolet radiation on production of epidermal cell thymocyte-activating factor/interleukin1 in vivo and in vitro (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 1198-1202.
- Gebel, S., Stein, B., König, H., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Risse, G., Neuberg, M., Müller, R. und 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-Verlag, Berlin, **34**: 385-397.
- Giovine, F.S. und Duff, G.W. (1990). Interleukin1: The first interleukin. *Imm. Today* **11**: 13-20.
- Giri, J.G., Lomedico, P.T. und Mizel, S.B. (1985). Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. *J. Immunology*, **134**: 343-349.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.
- Halaban, R., Kwon, B.S., Ghosh, S., Delli Bovi, P. und Baird, A. (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.* **3**: 177-186.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of *E. coli*. In "DNA cloning". (D. M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford, **1**: 109-135.
- Harris Jr., E. D., Welgus, H. G. und Krane, S. M. (1984). Regulation of the mammalian collagenases. *Coll. Rel. Res.* **4**: 493-512.
- Hazuda, D.J., Lee, J.C. und Young, P.R. (1988). The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. *J. Biol. Chem.* **263**: 8473-8479.
- Herrera, R.E., Shaw, P.E. und Nordheim, A. (1987). Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature* **340**: 68-70.

Herrlich, P., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Mallick, U., Pötting, A., Hieber, L., Lücke-Huhle, C. und Schorpp, M. (1986). The mammalian genetic stress response. *Adv. Enzyme Regul.* **25**: 485-504.

Herrlich, P., Ponta, H., Stein, B., Jonat, C., Gebel, S., König, H., Williams, R. O., Ivanow, V. und Rahmsdorf, H. J. (1989). Transcription factors in normal and malignant cells. In "Molecular Biology of Cancer Genes". (M. Sluysers, Ed.) Ellis Howard Ltd., Amsterdam, 150-168.

Huang, S.S. und Huang, J.S. (1988). Rapid turnover of the platelet-derived growth factor receptor in sis-transformed cells and reversal by suramin. *J. Biol. Chem.* **263**: 12608-12618.

Junming, Le, Wettstein, D., Gubler, U., Vilcek, J. (1987). Induction of membrane associated Interleukin1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J. Immunology* **138**: 2137-2142.

Kaina, B., Stein, B., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und 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., Ed.) Plenum Publ. Corp., New York, 149-165.

Kartasova, T. und van de Putte, P. (1988). Isolation, characterization, and UV stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2195-2203.

Kato, T. und Shinoura, Y. (1977). Isolation and characterization of mutants of E.coli deficient in induction of mutations by UV-light. *Mol. Gen. Genet.* **156**: 121-131.

Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174.

Kobayashi, Y., Appella, E., Yamada, M., Copeland, T.D., Oppenheim, J.J. und Matsushima, K. (1988). Phosphorylation of intracellular precursors of human IL-1. *J. of Immunology*, **140**: 2279-2287.

Krämer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., König, H., Loferer, H., Grunicke, H.H., Ponta, H., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1990). Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 303-313.

Kronheim, S.R., March, C.J., Erb, S.K., Conlon, P.J., Mochizuki, D.Y., Hopp, T.: Human Interleukin1 (1985), *J. Exp. Med.*, **161**, 490-502.

Kurokawa, T., Sasada, R., Iwane, M. und Igarashi, K. (1987). Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. *FEBS LETTERS* **213**: 189-194.

Kurt-Jones, E.A., Beller, D.I., Mizel, S.B. und Unanue, E.R. (1985). Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 1204-1208.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lange-Wantzin, G., Rothlein, R., Kahn, J. und Faanes, R.B. (1987). Effect of UV irradiation on expression of membrane IL 1 by rat macrophages. *J. Immunology* **138**: 3803-3807.

Larrick, J.W. (1989). Native interleukin 1 inhibitors. *Imm. Today*. **10**: 61-66.

Lavi, S. (1981). Carcinogen-mediated amplification of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6144-6148.

Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.

Li, S. und Shipley, G.D. (1990). Expression of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells. In: "Abstracts of the Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Cell Biology". 9-13 December, San Diego. Nr.1234, S.221.

Little, J.W., Mount, D.W.: The SOS-regulatory system of E.coli (1982), *Cell*, **29**, 11-22.

Lobb, R.R., Harper, J.W. und Fett, J.W. (1986). Purification of heparin-binding growth factors. *Anal. Biochem.* **154**: 1-14.

Longstreth, J. (1988). Cutaneous malignant melanoma und ultraviolet radiation: a review. *Cancer Metastasis Rev.* **7**: 321-333.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Lücke-Huhle, C. und Herrlich, P. (1986). Gene amplification in mammalian cells after exposure to ionizing radiation and UV. In "Radiation carcinogenesis and DNA alterations". (F. J. Burns et al., Ed.) Plenum Publ. Corp., New York, 405-411.

Lücke-Huhle, C., Mai, S. und Herrlich, P. (1989). UV-induced early-domain binding factor as the limiting component of Simian Virus 40 DNA amplification in rodent cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4812-4818.

Maher, V.M., Sato, K., Kateley-Kohler, S., Thomas, H., Michaud, S., McCormick, J.J., Krämer, M., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1988). Evidence of inducible error-prone mechanism in diploid human fibroblasts. In: "DNA Replication and Mutagenesis". (Moses, R.E. und Summers, W.C., Ed.), American Society for Microbiology, Washington, 465-471.

Mai, S., Stein, B., van den Berg, S., Kaina, B., Lücke-Huhle, C., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Kraemer, M., Gebel, S. und Herrlich, P. (1989). Mechanisms of the ultraviolet light response in mammalian cells. *J. Cell Science* **94**: 609-615.

Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Yamamoto, N., Ponta, H., Wegner, R.-D. und Herrlich, P. (1982). 12-*O*-Tetra-decanoylphorbol-13-acetate-inducible proteins are synthesized at an increased rate in Bloom syndrome fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7886-7890.

Maltzman, W. und Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1689-1694.

Mansour, S.L. und Martin, G.L. (1988). Four classes of mRNA are expressed from the mouse int-2 gene, a member of the FGF gene family. *EMBO-J.* **7**: 2035-2041.

March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., Conlon, P.J., Hopp, T.P. und Cosman, D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human Interleukin1 complementary DNAs. *Nature* **315**: 641-646.

Mascarelli, F., Raulais, D. und Courtois, Y. (1989). Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J.* **8**: 2265-2273.

McClure, M.O. und Weiss, R.A. (1987). In: "Current topics in AIDS". (M.S.Gottlieb et al., Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, England, **1**: 95.

McKnight, S. und Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* **46**: 795-805.

Miller-Andersson, M., Borg, H. und Andersson, L.O. (1974). Purification of antithrombin III by affinity chromatography. *Thromb. Res.* **5**: 439-452.

Miskin, R. und Ben-Ishai, R. (1981). Induction of plasminogen activator by UV light in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 6236-6240.

Mizel, S.B., Kilian, P.L., Lewis, J.C., Paganelli, K.A. und Chizzonite, R.A. (1987). The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *J. Immunology* **138**: 2906-2912.

Moscatelli, D. (1988). Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **107**: 753-759.

Müller, R., Bravo, R., Müller, D., Kurz, C. und Renz, M. (1987). Different types of modification in *c-fos* and its associated protein p39: Modulation of DNA binding by phosphorylation. *Oncogene Res.* **2**: 19-32.

Muesch, A., Hartmann, E., Rohde, K., Rubartelli, A., Sitia, R. und Rapoport, T.A. (1990). A novel pathway for secretory proteins? *TIBS* **15**: 86-88.

Nabel, G. und Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**: 711-713.

Nagelkerken, L.M. und van Breda Vriesman, P.J.C. (1986) Membrane-associated IL 1-like activity on rat dendritic cells. *J. Immunology* **136**: 2164-2170.

Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-698.

Okada, C.Y. und Rechsteiner, M. (1982). Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles. *Cell* **29**: 33-41.

Osborn, L., Kunkel, S. und Nabel, G. J. (1989). Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2336-2340.

Pays, E., Coquelet, H., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Steinert, M., König, E., Williams, R.O. und Roditi, I. (1990). Trypanosoma brucei: constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters. *EMBO J.* **9**: 3145-3151.

Picard, D. und Schaffner, W. (1984). A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin kappa gene. *Nature* 307: 80-82.

Postlewaite, A.E., Lachman, L.B., Mainardi, C.L., Kang, A.H. (1983). Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J. Exp. Med.* 157, 801-806.

Priestle, J.P., Schar, H.P. und Grutter, M.G. (1988). Crystal structure of the cytokine interleukin-1 $\beta$ . *EMBO J.* 7: 339-343.

Protic-Sabljić, M., Tuteja, N., Munson, P.J., Hauser, J., Kraemer, K.H. und Dixon, K. (1986). UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3349-3356.

Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335: 683-689.

Rahmsdorf, H. J., Mallick, U., Ponta, H. und Herrlich, P. (1982). A B-lymphocyte specific high-turnover protein: constitutive expression in resting B cells and induction of synthesis in proliferating cells. *Cell* 29: 459-468.

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.

Rao, C. N. R. (1961). Ultraviolet und visible spectroscopy. *Butterworth (London)*

Rigby, P. W. J., Diekmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.

Robbins, J.H., Kraemer, K.H., Lutzner, M.A., Festoff, B.W. und Coon, H.G. (1974). Xeroderma Pigmentosum. An inherited disease with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms and abnormal DNA repair. *Ann. Int. Med.* 80: 221-247.

Rogelj, S., Weinberg, R.A., Fanning, P. und Klagsbrun, M. (1989). Characterisation of tumors produced by signal-peptide-bFGF transformed cells. *J. Cell. Biochem.* 39: 13-23.

Rosen, C. A., Sodroski, J. G. und Haseltine, W. (1985). The location of *cis*-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41: 813-823.



Rotem, N., Axelrod, J. H. und Miskin, R. (1987). Induction of urokinase-type plasminogen activator by UV light in human fetal fibroblasts is mediated through a UV-induced secreted protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 622-631.

Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. und Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 $\beta$ , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**: 1503-1510.

Ruddon, R.W. (1987). The epidemiology of human cancer. In: "Cancer Biology". Oxford University Press, 51-54.

Sancar, A., Rupp, W.D.: A new repair enzyme; uvrABC excision nuclease of E.coli cuts a DNA strand on both sides of the damaged region (1983), *Cell*, **33**, 249-268.

Schimke, R. T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* **37**: 705-713.

Schmidt, J.A., Mizel, S.B., Cohen, D. und Green, I. (1982). Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J.Immunology.* **128**: 2177-2182.

Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1984). UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* **37**: 861-868.

Schröter, H., Mueller, C.G.F., Meese, K. und Nordheim, A. (1990). Synergism in ternary complex formation between the dimeric glycoprotein p67<sup>TCF</sup> and the c-fos serum response element. *EMBO-J.* **9**: 1123-1130.

Scott, E.L. und Straf, M.L. (1977). Ultraviolet radiation as a cause of cancer. In: "Origins of Human Cancer". (Hiatt et al., Ed), Cold Spring Harbor, New York, 529-546.

Sen, R. und Baltimore, D. (1986). Inducibility of k immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-928.

Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *TIG* **1**: 224-230.

Shirakawa, F., Chedid, M., Suttles, J., Pollok, B. A. und Mizel, S. B. (1989). Interleukin 1 and cyclic AMP induce k immunoglobulin light-chain expression via activation of an NF-kB-like DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 959-964.

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, Ed.) Alan R. Liss Inc., New York, 557-570.

Stein, B., Krämer, M., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1989a). UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J. Virol.* **63**: 4540-4544.

Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989b). UV-induced DNA damage is an intermediate in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5169-5181.

Stein, B., Gebel, S., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. und Ponta H. (1989c). Different proteins bind to the phorbol ester responsive sequences in collagenase and *c-jun* promoters. In: "Gene regulation and AIDS; transcriptional activation, retroviruses, and pathogenesis". (Papas, T.S., Ed.), Advances in Applied Biotechnology Series,7, Portofolio, The Woodlands, Texas, 37-43.

Steinborn, G.: Uvm mutants of E.coli K12 deficient in UV-mutagenesis (1978), *Mol. Gen. Genet.*, **165**, 87-93.

Tong-Starksen, S. E., Luciw, P. A. und Peterlin, B. M. (1987). Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 6845-6849.

Tschachler, E., Groh, V., Popovic, M., Mann, D. L., Konrad, K., Safai, B., Eron, L., Veronese, F. D., Wolff, K. und Stingl, G. (1987). Epidermal Langerhans cells - a target for HTLV-III/LAV infection. *J. Invest. Dermatol.* **88**: 233-237.

Valerie, K., Delers, A., Bruck, C., Thiriart, C., Rosenberg, H., Debouck, C. und Rosenberg, M. (1988). Activation of human immunodeficiency virus type 1 by DNA damage in human cells. *Nature* **333**: 78-81.

Walker, G.C.: Inducible DNA-repair systems (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 425-457.

Wessel, D. und Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**: 141-143.

Wingfield, P., Payton, M., Tavernier, J., Barnes, M., Shaw, A., Rose, K., Simona, M.G., Demczuk, S., Williamson, K. und Dayer, J.M. (1986). Purification and characterisation of human interleukin-1 $\beta$  expressed in recombinant *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **160**:491-497.

Wingfield, P., Payton, M., Graber, P., Rose, K., Dayer, J.M., Shaw, A.R. and Schmeissner, U. (1987). Purification and characterisation of human interleukin-1 $\alpha$  produced in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **165**: 537-541.

Witkin, E.M.: Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA-repair in *E.coli* (1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 869-901.

Witkin, E.M., Kogama, T.: Involvement of the activated form of recA protein in SOS-mutagenesis and stable DNA-replication in *E.coli* (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 7539-7543.

Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. und Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **18**: 197-203.

Wu, F., Garcia, J., Mitsuyasu, R. und Gaynor, R. (1988). Alterations in binding characteristics of the human immunodeficiency virus enhancer factor. *J. Virol.* **62**: 218-225.

Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H. und Montminy, M. R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* **334**: 494-498.

Yayon, A. und Klagsbrun, M. (1990a). Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: Reversal by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 5346-5350.

Yayon, A. und Klagsbrun, M. (1990b). Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer and Metastasis Rev.* **9**: 191-202.

Yeung, A.T., Mattes, W.V., Oh, E.Y., Grossmann, L.: Enzymatic properties of purified *E.coli* UvrABC proteins (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 6157-6161.

Zhan, X., Bates, B., Hu, X. und Goldfarb, M. (1988). The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3487-3495.

Zölzer, F. und Kiefer, J. (1984). Wavelength dependence of inactivation and mutation induction to 6-thioguanine-resistance in V79 chinese hamster fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **40**: 49-53.

Zucali, J.R., Dinarello, C.A., Oblon, D.J., Gross, M.A., Anderson, L. und Weiner, R.S. (1986). Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Clin. Invest.* 77: 1857-1863.