



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5569B

Die Kooperation von Transkriptionsfaktoren bei der Regulation des menschlichen Kollagenase I-Gens

H.-P. Auer
Institut für Genetik

März 1995

FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5569 B

**DIE KOOPERATION
VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN
BEI DER REGULATION
DES MENSCHLICHEN KOLLAGENASE I-
GENS**

Hans-Peter Auer

Institut für Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1995

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Die interstitielle Kollagenase I ist ein Mitglied einer Familie von Enzymen, den sog. Matrix-Metalloproteinasen, die Komponenten der extrazellulären Matrix hydrolysieren. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle beim Umbau von Bindegeweben, bei der Wundheilung, bei entzündlichen und degenerativen Krankheiten und bei der Tumorprogression. Die Expression der menschlichen Kollagenase I wird durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, Onkogenprodukte, Karzinogene und durch den Proteinkinase C-aktivierenden Tumorpromotor TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) sehr stark induziert. Das wichtigste auf TPA reagierende Element (TRE) im Promotor des menschlichen Kollagenasegens ist die DNA-Sequenz zwischen Position -73 und -67 (in Bezug auf die Startstelle der Transkription, +1); an dieses Motiv bindet der Transkriptionsfaktor AP-1 (c-Jun/c-Fos).

Während die Induktion vieler Gene von Proteinsynthese unabhängig ist und folglich auf der proteinsyntheseunabhängigen Modifikation von präformierten Transkriptionsfaktoren beruht, wird die Aktivierung der Kollagenase I nahezu vollständig durch Proteinsynthese-Inhibitoren, wie Anisomycin, verhindert. Um den zu Grunde liegenden Mechanismus aufzuklären, wurden 5'-Deletionsmutanten und Punktmutanten des Kollagenasepromotors hergestellt und vor ein Reporter gen kloniert. Die chimären Genkonstrukte wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert und ihre Expression in An- und Abwesenheit von TPA bzw. Anisomycin untersucht.

Diese Methode erlaubte die Identifizierung von drei DNA-Elementen, die die Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors erheblich steigern. Die Sequenzen wurden IMS (induktionsmaximierende Sequenzen) genannt und befinden sich bei Position -182/-176 (IMS4), bei Position -171/-163 (IMS3) und bei Position -139/-127 (IMS2). Außerdem wurde gezeigt, daß das Kollagenase-PEA3-Motiv (Position -91/-83), eine Sequenzhomologie zur PEA3-Bindestelle des Polyomavirus-Enhancers im Kontext des Kollagenasepromotors funktionell und für die TPA-Induktion des Promotors von großer Bedeutung ist. Die Kooperation der IMS-bindenden Faktoren (IMF) und des PEA3-bindenden Faktors (Ets) miteinander und mit AP-1 ist die Voraussetzung für die effiziente Transkription des Kollagenasegens.

Ebenso wie die Expression des endogenen Kollagenasegens, ist die Phorbol-ester-induzierte Transkription von transient in HeLa-Zellen transfizierten CAT-Konstrukten, die von ausreichend langen Kollagenasepromotor-Fragmenten kontrolliert werden (-1200/+63 bis -182/+63), von *de novo* Proteinsynthese abhängig. Die Deletion der Sequenzen zwischen Position -182 und -151 führt zum vollständigen Verlust der Proteinsyntheseabhängigkeit der TPA-Induktion. In diesem Bereich liegen die Erkennungssequenzen für Faktoren (IMS4 und IMF3), die für die maximale TPA-Induzierbarkeit des Promotors notwendig sind. IMF4 und IMF3 werden also proteinsyntheseabhängig aktiviert und sind die Ursache für die Proteinsynthese-Sensitivität der Kollagenaseexpression.

Überraschenderweise werden kurze Kollagenasepromotoren der Längen -151/+63 bis -74/+63 durch Anisomycin und TPA synergistisch induziert. Das auf Anisomycin reagierende Element des Kollagenasepromotors ist das TRE. Anisomycin modifiziert AP-1 posttranslational, so daß sich das transaktivierende Potential von AP-1 erhöht. Anisomycin aktiviert dazu c-Jun-spezifische Proteinkinasen (JNK1 und JNK2), die die Serine an den Positionen 73 und 63 der zweiten c-Jun-Transaktivierungsdomäne phosphorylieren.

The Cooperation of Transcription Factors in the Regulation of the Human Collagenase Type I Gene

Abstract. The interstitial collagenase type I is a member of the matrix metalloproteinase family. These enzymes degrade components of the extracellular matrix and play a major role in a variety of physiological and pathological processes, including the remodeling of connective tissues during growth, development and involution, inflammatory and degenerative diseases and tumor invasion and metastasis. Collagenase expression is induced by growth factors, cytokines, oncogene products, carcinogens and the PKC activating tumor promoter TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate). The major TPA responsive element (TRE) of the collagenase gene is the DNA sequence between positions -73 and -67 (with respect to the start site for transcription, +1) which binds the transcription factor AP-1 (c-Jun/c-Fos).

The activation of many genes by TPA occurs in the absence of ongoing protein synthesis. This type of regulation is based on the protein synthesis-independent modification of preexisting transcription factors, e.g. AP-1. In contrast, the TPA induced transcription of the collagenase gene is severely reduced by the protein synthesis inhibitors cycloheximide, puromycin or anisomycin, suggesting that TPA induces the synthesis of other regulatory proteins necessary for maximal transcriptional activation. In order to identify the promoter sequences which are involved (1st) in the TPA induced activation of collagenase gene transcription and (2nd) in the inhibition of TPA induced collagenase gene transcription by protein synthesis inhibitors, various 5'-deletion mutants and point mutants of the collagenase promoter were constructed and cloned in front of the CAT reporter gene. These chimeric gene constructs were transiently transfected into HeLa cells and their TPA-induced expression was monitored in the absence or presence of anisomycin.

These experiments allowed the identification of three DNA-elements, which considerably contribute to the inducibility of the collagenase promoter by TPA. The sequences were named IMS (induction maximizing sequences) and are located at positions -182/-176 (IMS4), -171/-163 (IMS3) and -139/-127 (IMS2). Moreover the collagenase PEA3-motif (position -91/-83) which has sequence homology to the PEA3 binding site of the polyoma enhancer, is functional in the context of the collagenase promoter and is of great importance for TPA induction. Thus the cooperation of the IMS-binding factors (IMF) and the PEA3-binding factor (Ets) with each other and with AP-1 is a prerequisite for the efficient transcriptional activation of the collagenase gene.

The TPA induced transcription of transiently transfected CAT gene constructs which are controlled by sufficiently long collagenase promoter fragments (-1200/+63 to -182/+63) is dependent on *de novo* protein synthesis. Hence these gene constructs are regulated like the endogenous collagenase gene. The deletion of the DNA sequences between positions -182 and -151 results in a complete loss of the protein synthesis dependency of TPA induction. The recognition sequences for factors required for maximal TPA inducibility (IMS4 and IMS3) are located in this region. Thus IMF4 (a factor with AP-1-like binding properties) and IMF3 (a factor of the C/EBP family of transcription activators) have to be newly synthesized or activated in a protein synthesis dependent way after TPA treatment.

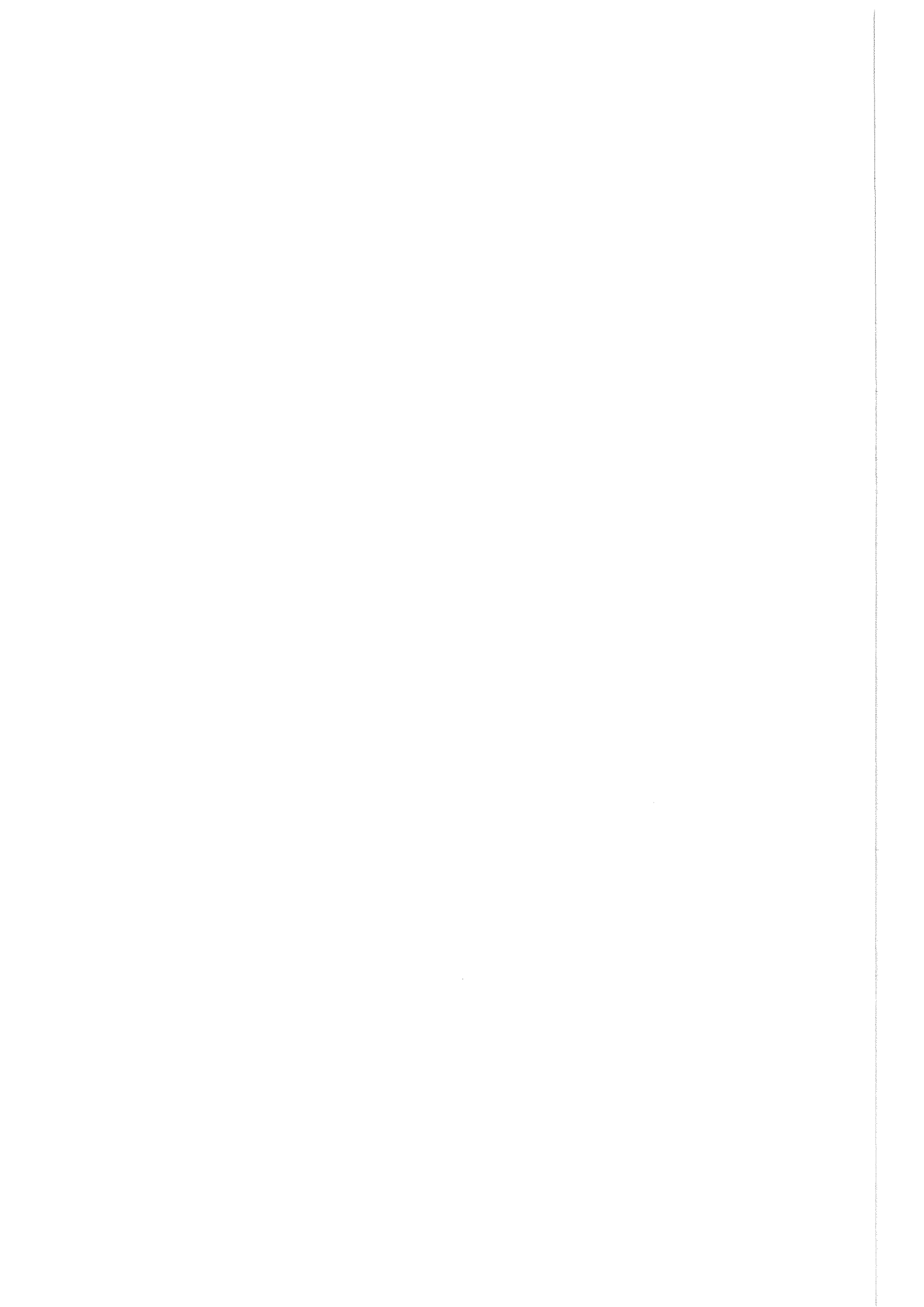
Surprisingly, short collagenase promoters (-151/+63 to -74/+63) are activated synergistically by anisomycin and TPA. The anisomycin responsive element of the collagenase promoter is the TRE. Anisomycin treatment increases the transactivating potential of AP-1 without altering its DNA binding affinity by phosphorylation of c-Jun at serines 63 and 73. This posttranslational modification of c-Jun is due to the activation of c-Jun-specific N-terminal protein kinases (JNK1, JNK2) by anisomycin.

Inhalt

1.	Einleitung	Seite 9
1.1	Bindegewebe ordnen und stabilisieren vielzellige Organismen	9
1.2	Das Kollagen ist das wichtigste Protein des Bindegewebes	10
1.3	Matrix-Metalloproteinasen	11
1.4	Die biologischen Funktionen von Matrix-Metalloproteinasen	13
1.5	Die Regulation der MMP-Aktivität erfolgt auf mehreren Ebenen	14
1.6	Grundlagen der Transkriptionsregulation	16
1.7	Die Transkriptionsregulation der Kollagenase Typ I durch den Transkriptionsfaktor AP-1	17
1.7.1	Phorbol ester aktivieren den PKC-abhängigen Signalweg	18
1.7.2	Die Steigerung der Aktivität des Transkriptionsfaktor AP-1	21
1.7.3	Die Hemmung der AP-1 Aktivität	23
1.7.4	Der zeitliche Ablauf der Anschaltung der Kollagenasetranskription	24
1.8.	Problemstellung und Zielsetzung der vorgelegten Arbeit	24
1.8.1	Welche Promotorsequenzen maximieren die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasegens?	24
1.8.2	Warum ist die Induktion des Kollagenasegens proteinsyntheseabhängig?	26
2.	Ergebnisse	29
Teil 1:	Charakterisierung der Promotorsequenzen, die für die maximale Expression des Kollagenasegens nach TPA-Stimulation notwendig sind	29
2.1	Homologien zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Kollagenasepromotor	29
2.2	Herstellung von 5'-Deletionen des Kollagenasepromotors mit der PCR-Technik	33
2.3	Die Deletion der Promotorabschnitte -182/-161 und -140/-127 reduziert die TPA-Induzierbarkeit von Kollagenase-CAT-Konstrukten	35
2.4	Mutation von internen Sequenzen im Kollagenasepromotor mit der PCR-Technik	39
2.5	Identifikation der Promotorsequenzen, die für die maximale TPA-Induktion der Kollagenase notwendig sind	41
2.6	Zusammenfassung	45
Teil 2:	Die Hemmbarkeit der TPA-Induktion langer Kollagenasepromotor-Konstrukte durch Anisomycin	47
2.7	Methodischer Prolog: Nachweis der mRNA mit der Ribonukleaseschutz-Methode	47
2.8	Lange Promotorkonstrukte werden wie das endogene Gen reguliert	51
2.9	Die Deletion der distalen Gruppe möglicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen ändert die Induzierbarkeit des Promotors nicht	53
2.10	Analyse der Deletionsmutanten auf ihre TPA-Induzierbarkeit in An- und Abwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomycin	55
2.11	Identifikation von Anisomycin-sensitiven Sequenzen im Kollagenasepromotor mit internen Mutationen	66
2.12	Zusammenfassung	69
Teil 3:	Die Induzierbarkeit kurzer Kollagenasepromotor-Konstrukte durch Anisomycin	73
2.13	Anisomycin verlängert nicht die Halbwertszeit von Kollagenase-CAT-mRNA	73
2.14	Ein kurzes Kollagenasepromotor-Konstrukt wird durch eine subinhibitorische Anisomycin-Konzentration schwach induziert	76
2.15	Der zeitliche Ablauf der Induktion von Kollagenase-CAT-Konstrukten durch TPA und Anisomycin	78
2.16	Anisomycin induziert die Transkription eines AP-1 abhängigen Promotorkonstrukts in	

	Hela-Zellen, aber nicht in undifferenzierten F9 Teratokarzinoma-Stammzellen	83
2.17	Anisomycin erhöht die AP-1-Bindeaktivität nicht	85
2.18	Anisomycin-Behandlung ändert die Mobilität von zellulärem c-Jun	86
2.19	Anisomycin phosphoryliert c-Jun in denselben Peptiden wie UV und EGF	88
2.20	Anisomycin induziert die Aktivierung von c-Jun-spezifischen Kinasen (JNK)	91
2.21	Zusammenfassung	93
3.	Diskussion	95
3.1	Mehrere Enhancerelemente regulieren kooperativ die Expression des Kollagenase I-Gens	95
3.1.1	Das PEA3-Motiv	96
3.1.2	Die Induzierbarkeit maximierende Sequenz 2 (IMS2)	97
3.1.3	Die Induzierbarkeit maximierenden Sequenzen 3 und 4 (IMS3 und IMS4)	98
3.1.4	Die Proteinbesetzung des Kollagenasepromotors <i>in vivo</i>	100
3.2	Die TPA-Induktion der Kollagenaseexpression setzt die Neusynthese oder die proteinsyntheseabhängige Aktivierung der IMS3- und IMS4-bindenden Proteine voraus	102
3.2.2	Die Repressorhypothese	104
3.2.3	Der Einfluß der Chromatinstruktur auf die Transkription	104
3.3	Anisomycin aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1	107
3.4	Ausblick	109
4.	Material	111
4.1	Geräte und Hersteller	111
4.2	Wasser	111
4.3	Chemikalien, Membranen und Bezugsquellen	111
4.4	Induktoren und Inhibitoren	113
4.5	Radiochemikalien	114
4.6	Gele	115
4.6.1	Präparative und analytische Agarose-Gele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	115
4.6.2	Analytisches Agarose-Gel für die Auftrennung von denaturierter RNA	115
4.6.3	Denaturierendes, 8%-iges Polyacrylamid-Gel	115
4.6.4	Aufreinigung von Oligonukleotiden über ein präparatives 17%-iges Polycrylamid-Gel	115
4.6.5	Denaturierendes, 10%-iges Protein-Gel (Laemmli, 1970)	116
4.6.6	4%-iges <i>Bandshift</i> -Gel	116
4.7	Oligonukleotide	116
4.7.1	Primer zur DNA-Sequenzierung und PCR-Klonierung	116
4.7.2	Kollagenaseprimer für die PCR-Klonierung von 5'-Promotordeletionsmutanten	117
4.7.3	Kollagenaseprimer zur Einführung von Punktmutationen in den Kollagenasepromotor	117
4.7.4	Kollagenaseprimer für genomische <i>in vivo</i> footprints	118
4.8	DNAs für die Transkription von Riboproben	118
4.9	Proben für die <i>Northern</i> -Hybridisierung	119
4.10	Plasmidkonstruktionen	119
4.11	Enzyme und Hersteller	120
4.12	Antikörper	120
4.13	Bakterien und Zellen	121
5.	Methoden	123
5.1	Präparation von Nucleinsäuren	123
5.1.1	Reinigung und Fällung von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen	123
5.1.2	Schnelle Präparation von Plasmid-DNA aus 1.5 ml-Bakterienkulturen	123
5.1.3	Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus E.coli durch Ionenaustauscher-Säulenchromatographie	124
5.1.4	Gesamt-RNA Präparation aus eukaryontischen Zellen über einen CsCl-Stufengradienten	124

5.1.5	Präparation von Restriktionsfragmenten aus einem Agarose-Gel	125
5.1.6	Abtrennung freier Radionukleotide von markierter DNA durch Gelfiltration	125
5.1.7	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	125
5.2	Präparation von Proteinen	125
5.2.1	Gesamtprotein-Präparation für CAT-Analysen	125
5.2.2	Präparation von Zellkernextrakten (Dignam et al., 1983; Andrews u. Faller, 1991)	126
5.2.3	Präparation von Proteinextrakten zum Nachweis der p42 ^{MAPK} (Leevers u. Marshall, 1992)	126
5.2.4	Präparation von metabolisch markierten Proteinen (RIPA-Zellysate)	126
5.3	Enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren	127
5.3.1	DNase-Behandlung von RNA	127
5.3.2	Fragmentierung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen	127
5.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	127
5.3.4	Kinasierung von Oligonukleotiden mit T4-PNK	127
5.3.5	Markierung von Oligonukleotiden mit <i>Klenow</i> -DNA-Polymerase I	127
5.3.6	<i>in vitro</i> Transkription der Probe für Ribonukleaseschutz Analysen (Melton et al., 1984)	128
5.3.7	Markierung von DNA-Proben für <i>Northern</i> -Analysen	128
5.4	PCR-Klonierungstechniken	128
5.4.1	5'-Deletion des Kollagenasepromotors	128
5.4.2	Einführung von Punktmutationen in den Kollagenasepromotor	129
5.5	Zellkultur und Transfektion	129
5.5.1	Zellkultur	129
5.5.2	Transiente Transfektion von HeLa tk ⁻ mit DEAE-Dextran (Kawai u. Nishizawa, 1987)	130
5.5.3	Calciumphosphat-Transfektion von HeLa tk ⁻ und F9 (Graham und van der Eb, 1973; mod. nach Chen u. Okayama, 1987)	130 131
5.5.4	Metabolische Markierung von Proteinen	131
5.5.5	Präparation und Transfektion kompetenter Bakterien (Hanahan, 1986)	131
5.6	Sequenzierung von Plasmid-DNA (Sanger et al., 1977; Chen u. Seeburg, 1985)	132
5.7	Analyse von mRNA	133
5.7.1	Ribonukleaseschutz-Nachweis (Melton et al., 1984; Gilman et al., 1987)	133
5.7.2	Übertragung von größengetrennter mRNA auf eine Membran (<i>Northern-blot</i>) u. Nachweis der spezifischen mRNA mit einer DNA-Probe (Denhardt, 1966; Alwine et al., 1977)	133
5.8	Protein-Nachweismethoden	134
5.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al. (1951)	134
5.8.2	Bestimmung der CAT-Aktivität (Gorman et al., 1982)	134
5.8.3	Nachweis von DNA-bindenden Proteinen durch Gelretardationsanalyse	135
5.8.4	Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose	135
5.8.5	Hybridisierung von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern gegen p42 ^{MAPK}	135
5.8.6	Immunpräzipitation von metabolisch markierten Proteinen	136
5.8.7	Peptidanalyse (Hunter u. Sefton, 1980; Scheidtmann et al., 1982; Boyle et al., 1991 b)	136
5.8.8	Nachweis von c-Jun N-terminalen Proteinkinasen (Hibi et al., 1993)	137
5.9	Statistische Auswertung	138
6.	Anhang	139
A.	Abkürzungen und fremdsprachige Begriffe	139
B.	Sequenzen	142
C.	Literatur	153



1. Einleitung

In der vorliegenden Doktorarbeit wird die Kooperation von Transkriptionsfaktoren bei der Regulation des menschlichen Kollagenase I-Gens beschrieben. Es wurden die Promotorsequenzen identifiziert, die (1.) zur maximalen Expression des Kollagenase I-Gens durch den Tumorpromotor TPA beitragen, die (2.) für die Proteinsynthesensitivität der Kollagenasetranskription verantwortlich sind und die (3.) die Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten durch Proteinsynthese-Hemmstoffe vermitteln. Bevor jedoch diese sehr spezielle Problematik behandelt wird, soll auf die Funktion des Kollagenase-Enzyms im Organismus eingegangen werden.

1.1 Bindegewebe ordnen und stabilisieren vielzellige Organismen

Der Körper der Wirbeltiere wird durch Wasser und Bindegewebe in seiner Form gehalten. Lockeres, *ungeformtes Bindegewebe* durchzieht kontinuierlich den ganzen Organismus und verbindet, unterteilt, durchsetzt und umhüllt Gewebe und Organe als Stütz- und Gerüstwerk. Knochen, Knorpel und Sehnen des Skeletts sind spezielle Typen von Bindegewebe und werden unter dem Namen *geformtes Stützgewebe* zusammengefaßt. Weitere hochspezialisierte Bindegewebsstrukturen findet man in der Haut, im Glaskörper des Auges, in den Blutgefäßen und als Basallamina um Gewebe und Organe. Die hauptsächliche Komponente des Bindegewebes ist die sog. *extrazelluläre Matrix* (ECM), ein dreidimensionales Netzwerk aus den Faserglycoproteinen Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin und der strukturlosen, durch Einlagerung von Wasser gelartigen Grundsubstanz aus Glycosaminoglycanen¹. Die ECM wird lokal von Bindegewebszellen, vor allem Fibroblasten sezerniert, die zusammen mit Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und Zellen des Immunsystems den zellulären Anteil des Bindegewebes ausmachen (Krstic, 1978; Buddecke, 1980; Romer und Parsons, 1983; Goldberg und Rabinovitch, 1989; Alberts et al., 1994).

Neben der formgebenden und ordnenden Funktion spielt das Bindegewebe eine Rolle bei der Konstanthaltung des Mineral- und Wasserhaushalts sowie bei der Reservestoffspeicherung und der Immunabwehr. Die ECM reguliert weiterhin viele zellbiologische Prozesse, teilweise durch Wechselwirkungen zwischen den Actinfilamenten des Zytoskeletts und den Fibronectinmolekülen der ECM (Bornstein et al., 1978). In diesem Zusammenhang wurden Einflüsse auf die Zellpolarität, auf das Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten von Zellen und auf die Zelladhäsion

¹ Glycosaminoglycane sind lange, unverzweigte, negativ geladene Polysaccharidketten, die nach ihren Disaccharid-Bausteinen in vier Gruppen unterteilt werden: (1) Hyaluronsäure, (2) Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, (3) Heparansulfat und Heparin, (4) Keratansulfat. Mit Ausnahme der Hyaluronsäure sind Glycosaminoglycane kovalent an die Serinreste eines Proteinkerns gebunden und bilden sog. Proteoglycane.

beschrieben (Greenberg et al., 1981; Übersicht bei Matrisian und Hogan, 1990; Juliano und Haskill, 1993).

1.2 Das Kollagen ist das wichtigste Protein des Bindegewebes

Das fibrilläre Strukturprotein Kollagen² ist das im menschlichen Körper am häufigsten vorkommende Protein; sein Anteil beträgt etwa 25 % der Gesamtproteinmenge. Bei der Kollagenbiosynthese in Bindegewebszellen werden zunächst sog. Pro- α -Ketten gebildet, deren Prolin- und Lysinreste zum Teil hydroxyliert werden. Solche Hydroxyproline und Hydroxylysine finden sich selten in anderen Proteinen und man vermutet, daß kovalente Bindungen zwischen den Hydroxyprolin- und Hydroxylysinresten das Kollagenmolekül stabilisieren. Verschiedene Kollagentypen (Tab. 1) unterscheiden sich geringfügig in der Aminosäurezusammensetzung ihrer Pro- α -Ketten. Durch Assoziation von zwei α_1 - und einer α_2 -Kette entsteht beispielsweise Typ I Kollagen³. Die drei Ketten sind in einer rechtsdrehenden Tripelhelix seilartig verdreht und werden als Prokollagen bezeichnet. Die starren, stäbchenförmigen Prokollagenmoleküle werden von der Zelle in den Extrazellulärraum sezerniert, durch Endopeptidasen und Desaminasen modifiziert und lagern sich Seite-an-Seite und Kopf-an-Kopf zu Fibrillen und Fasern zusammen (Alberts et al., 1994).

Kollagen ist unlöslich in Wasser und metabolisch auffallend inert. In den Säugetierorganen hat das Kollagen eine Halbwertszeit von 30 (Leber) bis zu 300 Tagen (Aorta). Bei bestimmten physiologischen und pathologischen Prozessen wird jedoch Kollagen in kurzer Zeit durch proteolytische Enzyme hoher Spezifität, den Kollagenasen, abgebaut. Man unterscheidet heute vier tierische Kollagenasen und ordnet sie zusammen mit fünf weiteren matrixdegradierenden Enzymen in die Familie der *Matrix-Metalloproteinasen* (MMP) ein.

Tab. 1: Quartärstruktur und Verteilungsmuster der Kollagentypen (Alberts et al., 1994)

Form	Typ	Struktur	Vorkommen in Geweben
Fibrillär	I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, innere Organe, Cornea
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	Knorpel, Bandscheiben, Notochord, Glaskörper des Auges
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	Haut, Blutgefäße, innere Organe
	V	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$	assoziiert mit Typ I
	XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	assoziiert mit Typ II
Fibrillen-assoziiert	IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Knorpel (laterale Assoziation mit Typ II Fibrillen)
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Sehnen und Bänder (laterale Assoziation mit Typ I Fibrillen)
Netzwerk	IV	$[\alpha 1(IV)]_3$	Basallaminae
	VI	$[\alpha 1(VI)]_3$	Ankerfibrillen (mehrschichtige Epithelien → Bindegewebe)

² Kollagen kann mit "leimerzeugend" übersetzt werden (griechisch $\kappa\omicron\lambda\lambda\alpha$ = Leim).

³ Vorherrschend sind die Kollagentypen I, II und III, wobei Typ I das meistverbreiteste Kollagen ist und 90% des Körperkollagens ausmacht. Typ I Kollagen kann nur durch Kollagenase I degradiert werden.

1.3 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen sind Zink- und Calciumbindende Endoproteinasen, die außerhalb der Zelle Komponenten der extrazellulären Matrix hydrolysieren. Als erstes Enzym der Matrix-Metalloproteinasen-Familie wurde die interstitielle Kollagenase I aus menschlichen Hautfibroblasten gereinigt (Stricklin et al., 1977). Kollagenase I wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, vor allem von Fibroblasten, aber auch von Keratinozyten, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Chondrozyten, Osteoblasten und invasiven Tumorzellen sezerniert. Fünf Mitglieder der MMP-Proteinfamilie können aufgrund homologer Primärstrukturen vergleichend geordnet werden (Abb. 1).

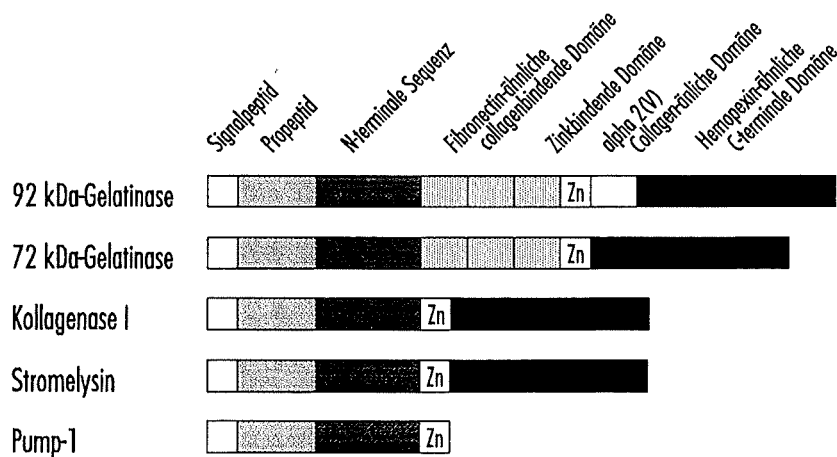


Abb. 1: Domänenstruktur der sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (verschiedene Autoren)

An das hydrophobe Signalpeptid, das die Ausschleusung des Proteins aus der Zelle steuert, und das Propeptid, das für die Latenz des Enzyms verantwortlich ist, schließen sich die NH₂-terminalen Sequenzen an, die mit der Zink-bindenden Region die katalytische Domäne des Enzyms bilden. Für die interstitielle Kollagenase wurde gezeigt, daß das charakteristische Zink-Atom an drei Aminosäurereste (Histidin-199, His-203 und His-209) gebunden ist. Eine möglicherweise existierende weitere Bindung zwischen Zn²⁺ und dem Cysteinrest-73 des Propeptids verschließt im Proenzym das aktive Zentrum. Nach der Aktivierung der Kollagenase ist der vierte Ligand des Zink-Atoms ein Wassermolekül, das bei der katalytischen Reaktion beteiligt ist (Vallee u. Auld, 1990 und 1992; Springman et al., 1990; Van Wart u. Birkedal-Hansen, 1990). Die Fibronectindomäne der Typ IV-Kollagenasen zeigt Ähnlichkeit zur kollagenbindenden Domäne des Fibronectins. Charakteristisch für die 92-kDa Gelatinase ist eine Proteinsequenz, die der α_2 -Kette des Typ V-Kollagens ähnlich ist. Das COOH-terminale Modul ist entfernt homolog zu Hemopexin- und Vitronectin-Sequenzen und scheint eine Rolle bei der Erkennung des Substrats, bei der Bindung der

MMP-spezifischen Inhibitorproteine (TIMP, siehe 1.5) und bei der Bindung an ECM-Makromoleküle zu spielen (Muller et al., 1988; Matrisian, 1992).

Tab. 2: Nomenklatur, Molekulargewicht (MG der latenten / aktiven Form) und Substrate einiger Matrix-Metalloproteinasen (nach verschiedenen Autoren)

	Subklassen, Nomenklatur	MG (Dalton)	Substratspezifität
Typ I Kollagenasen			
MMP-1	interstitielle Kollagenase, Fibroblasten-Typ Kollagenase	52 000 / 42 000	Kollagen Typ I, II und III (III >> I), Kollagen Typ VII, VIII, X, Proteoglycane, Gelatine
MMP-8	neutrophile Kollagenase polymorphnukleärer Leukozyten	75 000 / 58 000	Kollagen Typ I, II und III (I >> III)
Stromelysine			
MMP-3	Stromelysin-1, Transin-1,	60 000 / 55 000	Fibronectin, Elastin, Laminin, Kollagen Typ IV, V, IX und X, Proteoglycane, Gelatine, Casein
MMP-10	Stromelysin-2, Transin-2	60 000 / 55 000	wie Stromelysin-1
MMP-11	Stromelysin-3	unbekannt	unbekannt
Typ IV Kollagenasen			
MMP-2	72 kDA-Typ IV Kollagenase, Gelatinase A	72 000 / 62 000	Kollagen Typ IV, V, VII, X und XI, Fibronectin, Elastin, Gelatine
MMP-9	92 kDA-Typ IV Kollagenase, Gelatinase B	92 000 / 84 000	Kollagen Typ IV und V, Elastin, Proteoglycane, Gelatine
Andere MMPs			
MMP-6	Saure MPase des Knorpels	55 000 / 35 000	Proteoglycane
MMP-7	Pump-1, Uterus Metalloproteinase	28 000 / 19 000	Kollagen IV, Fibronectin, Elastin, Laminin, Proteoglycane, Gelatine,

Die Zusammenstellung in Tab. 2 gibt Auskunft über die Nomenklatur, das Molekulargewicht und die Substratspezifität einiger zur Zeit bekannten Matrix-Metalloproteinasen. Es ist auffallend, daß nur die Kollagenasen Typ I, die sowohl von Fibroblasten (interstitielle Kollagenase) als auch von polymorphkernigen Leukozyten (neutrophile Kollagenase) sezerniert werden, die Fähigkeit besitzen, interstitielles Kollagen (Kollagen Typ I, II und III) zu spalten, während praktisch alle Metalloproteinasen Gelatine und Fibronectin hydrolysieren und die meisten Kollagen Typ IV und Typ V abbauen können.

Über die Einordnung der Makrophagen-Elastase besteht noch Unklarheit. Die bakterielle Metalloproteinase Thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus*), mikrobielle Kollagenasen (*Clostridium histolyticum*, *Vibrio alginolyticus*) und Elastasen (*Pseudomonas aeruginosa*) sowie in Schlangengiften enthaltene Metalloproteinasen⁴ (*Viperidae*, *Crotalinae*) werden nicht zur MMP-Familie gezählt.

1.4 Die biologischen Funktionen von Matrix-Metalloproteinasen

Wegen der breitgefächerten und überlappenden Substratspezifität der Matrix-Metalloproteinasen (Tab. 1) ist die Identifikation der natürlichen Substrate und die Charakterisierung der biologischen Funktionen einer bestimmten MMP schwierig. Nur für die Kollagenase I besteht die Gewißheit, daß interstitielle Kollagenfibrillen (Typ I, II, III) in einer spezifischen katabolischen Reaktion⁵ gespalten werden. Sicher ist, daß Matrix-Metalloproteinasen eine wichtige Rolle beim Umbau von Bindegeweben, bei der Wundheilung, bei der Tumorprogression und bei entzündlichen und degenerativen Krankheiten spielen.

Komponenten der extrazellulären Matrix werden bei allen Prozessen abgebaut, umgebaut und neustrukturiert, die mit Wachstum, Entwicklung und Rückbildung (Involution) von Organen einhergehen (Übersicht bei Woessner, 1991 und Werb et al., 1992). Über die Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren (siehe 1.5) bei der Ovulation (Brännström et al., 1988), Embryonalentwicklung (Brenner et al., 1989 a), Skelettwachstum und -umbildung (Delaisse et al., 1988), Organentwicklung (Nomura et al., 1989), Rückbildung des Kaulquappen-Schwanzes (Gross und Bruschi, 1971) und anderen Vorgängen wurde berichtet.

Während der Morphogenese produzieren wandernde Zellen proteolytische Enzyme, um ihren ursprünglichen Zellverband zu verlassen und in andere Gewebe einzuwandern. Desselben Werkzeugs bedienen sich invasiv wachsende und metastasierende Tumorzellen (Mignatti et al., 1986 und 1989; Reich et al., 1988; Yagel et al., 1988 und 1989; Chengsi et al., 1989; Stetler-Stevenson et al., 1993). MMPs werden entweder vom Tumorgewebe selbst sezerniert oder die umliegenden Stromazellen werden durch noch nicht verstandene Zell-Zell-Interaktionen veranlaßt, die matrixdegradierenden Enzyme zu produzieren (Basset et al., 1990). Es hat den Anschein, daß Stromelysin-1 bevorzugt in malignen Tumoren und weniger in benignen Tumoren oder im normalen Gewebe exprimiert wird (Matrisian et al., 1986 a). Stromelysin-3 wurde mit der lokalen Invasivität von Kopf- und Nackenkrebs, Hautkrebs und Brustkrebs in Verbindung gebracht (Muller et al., 1993; Wolf et al., 1992 und 1993). Auch konnten erhöhte Mengen von Typ IV-Kollagenasen in invasiven und

⁴ In Schlangengiften werden zwei Hauptklassen proteolytischer Enzyme gefunden: Serinproteinasen und Metalloproteinasen, von denen einige die Fähigkeit besitzen, Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Basalmembranen) zu degradieren.

⁵ Die α -Ketten werden zwischen den Aminosäuren Glycin-775 / Leucin-776 oder Glycin-775 / Isoleucin-776 gespalten (Fields et al., 1987).

metastasierenden Tumoren nachgewiesen werden. Diese MMPs sind möglicherweise am Abbau der Basallamina beteiligt (Liotta et al., 1979; Garbisa et al., 1987; Nakajima et al., 1987; Stetler-Stevenson, 1990). In vielen transformierten Zelllinien und menschlichen Tumoren, z.B. bei Dickdarmkrebs, Lungenkrebs, Kopf- und Nackenkrebs und gelegentlich bei Brustkrebs, ist die Expression der interstitiellen Kollagenase gesteigert (Hewitt et al., 1991; Urbanski et al., 1992; Muller et al., 1991 und Wolf et al., 1993). Da die Expression verschiedener Proteasen mit dem erhöhten metastatischen Potential von Tumoren korreliert werden kann, werden zur Zeit erhebliche Anstrengungen gemacht, um den Nachweis von Proteasen als Marker für die Prognose von Krebserkrankungen zu nutzen.

Eine positive Korrelation wurde auch zwischen der Schwere der Krankheit und der MMP-Enzymaktivität bei manchen chronischen und akuten Entzündungsprozessen gefunden. Mehrere Studien konnten in der Synovia (Gelenkschmiere) und der Synovialis (Innenschicht der Gelenkkapsel) von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie bei Wurzelhautentzündungen des Zahns vermehrte Kollagenase I-, Stromelysin- und Kollagenase IV-Aktivität nachweisen (Case et al., 1989; Hayakawa et al., 1991; Sodek und Overall, 1992).

Das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System⁶ ist bei vielen der oben erwähnten Prozesse maßgeblich beteiligt (Saksela und Rifkin, 1988). Beispielsweise wurde beschrieben, daß eine erhöhte uPA-Aktivität in Brustkrebstumoren die symptomfreie Überlebensrate der Patientinnen verringert (Duffy et al., 1988; Jänicke et al., 1993). Ferner können strukturenbende Makromoleküle des interstitiellen Bindegewebes und der Basallamina durch Leukozyten (Janusz und Doherty, 1991), Phagozyten (Everts et al., 1990) und Osteoklasten (Vaes, 1988) unter der Benutzung von anderen katabolischen Enzymen (Elastase, Cathepsin L, Cathepsin B, Cathepsin D) degradiert werden (Übersicht bei Matrisian und Hogan, 1990). So ist bekannt, daß hohe Cathepsin D-Werte mit einer ungünstigen Prognose für das Überleben von Brustkrebspatientinnen korreliert sind (Thorpe et al., 1989).

1.5 Die Regulation der MMP-Aktivität erfolgt auf mehreren Ebenen

Regulationsmechanismen sind unerlässlich für eine zielgerichtete und den Erfordernissen entsprechende Reaktion. Je vielfältiger die Regulationsmechanismen sind, desto differenzierter können Prozesse ablaufen und aufeinander abgestimmt werden. Für die Integrität des Körpers ist es

⁶ Im Blutplasma in hohen Konzentrationen (100-200 µg/ml, 1-2 µM) zirkulierendes Plasminogen wird durch zwei Formen von Plasminogen-Aktivatoren (Urokinase-Typ, uPA und Gewebe-Typ, tPA) in das aktive Enzym Plasmin konvertiert. Plasmin ist eine Serinprotease mit einem breitgefächerten Wirkungsspektrum (Fibrin, Fibronectin, Laminin u.a. Proteine) und spielt eine Rolle bei koagulierenden Prozessen, im Komplementsystem und bei der Gewebedegradation. Ein spezifischer Zellmembranrezeptor (uPAR, uPA-Rezeptor) wurde beschrieben (Roldan et al., 1990).

lebenswichtig, daß so potente und zerstörerische Enzyme wie die Matrix-Metalloproteinasen nicht unkontrolliert wirken können.

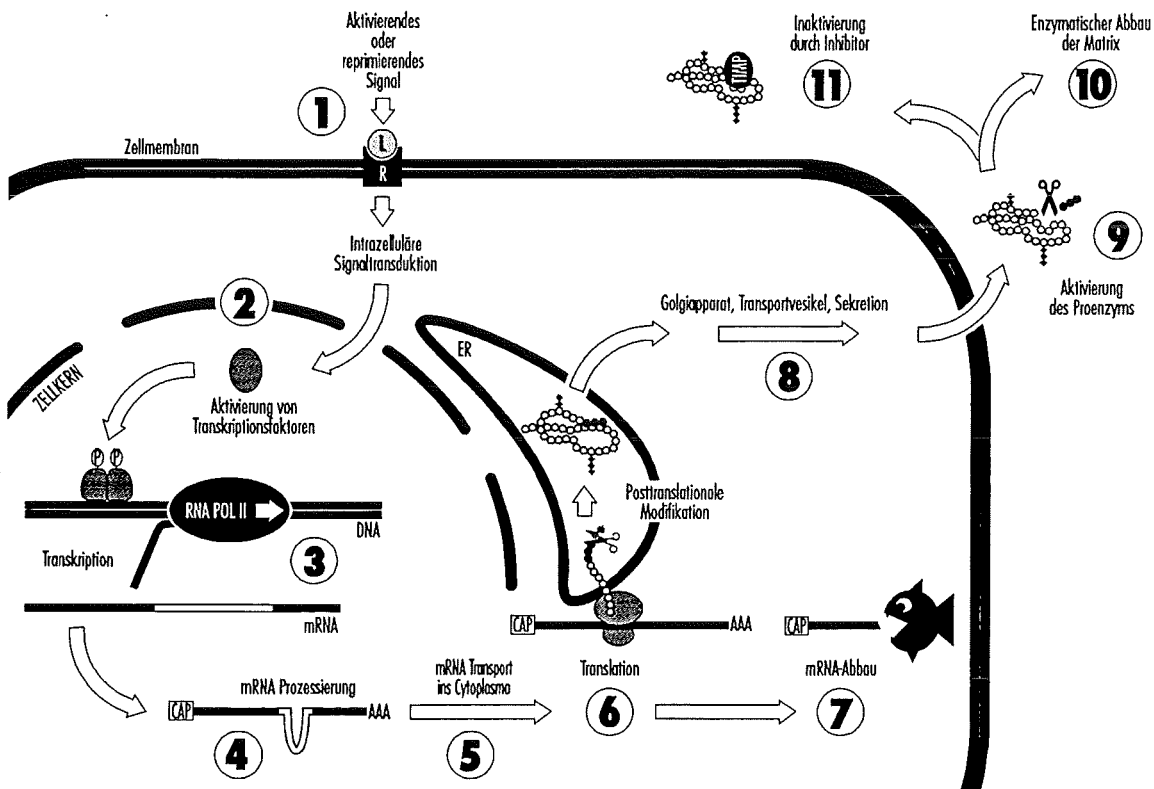


Abb. 2: Schematische Darstellung der Mechanismen, die die Expression und die Aktivität einer Matrix-Metalloproteinase regeln. Ein stimulierender Reiz kann z.B. ein Wachstumsfaktor (L, Ligand) sein, der an seinen spezifischen Rezeptor (R) in der Zellmembran bindet (1). Über eine Signalkette wird der Reiz durch das Cytoplasma in den Zellkern geleitet (2) und induziert oder verstärkt die Transkription des Metalloproteinase-Gens (3, Transkriptionskontrolle). Die mRNA wird modifiziert (4, Kontrolle der mRNA-Prozessierung) und ins Cytoplasma transportiert (5, Kontrolle des mRNA-Transports), wo sie translatiert wird (6, Translationskontrolle). Entscheidend für die Dauer der Proteinbiosynthese ist die Stabilität der mRNA (7, Kontrolle der mRNA-Degradation). Im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wird das Signalpeptid abgeschnitten und das neue Protein modifiziert (z.B. glykosyliert). Weitere Glykosylierungen erfolgen im Golgi-Apparat. Der Golgi-Apparat leitet das Protein durch den Intrazellulärraum (Vesikelknospung und Vesikelfusion). Die meisten Zellen sezernieren das Proenzym unmittelbar nach der Synthese in den Extrazellulärraum (8). Manche neutrophilen Zellen synthetisieren kollagenolytische Proteinase (MMP-8 und MMP-9) schon während ihrer Entwicklung im Knochenmark und speichern sie in Granula zur späteren Freisetzung (Hibbs und Bainton, 1989). Die Metalloproteinase wird außerhalb der Zelle durch Abspaltung des Propeptids aktiviert (9, Kontrolle der Proteinaktivität), bindet an ihr Substrat und spaltet es an spezifischer Stelle (10). Das Enzym wird durch die Bindung eines Inhibitorproteins (11, Kontrolle der Proteinaktivität) inaktiviert. Der MMP/TIMP-Komplex wird wahrscheinlich phagozytiert und intrazellulär abgebaut.

Die Regulation der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen erfolgt auf mehreren Ebenen (Abb. 2). Die erste Stufe der Regulation ist die Ebene der *Transkription* und findet im Zellkern statt. Initiiert

durch einen äußeren Reiz wird das für die Matrix-Metalloproteinase codierende Gen transkribiert (s.u.). Die mRNA wird sodann ins Cytoplasma ausgeschleust und dient als Matrize für die Biosynthese des Enzyms (*Translation*) an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums. Die Matrix-Metalloproteinase wird als inaktive Vorstufe (Proenzym, latente Form, Zymogen) sezerniert und außerhalb der Zelle durch Abspaltung des Propeptids aktiviert. Prokollagenase I kann weder an ihr Substrat binden, noch mit dem Inhibitorprotein TIMP (s.u.) interagieren (Welgus et al., 1985).

Die biologischen Mechanismen, die zur Aktivierung der MMP-Proenzyme führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Für die Prokollagenase I wurde gezeigt, daß Proteinase wie Plasmin (Werb et al., 1977; Mignatti et al., 1986; Chengsi et al., 1989) und Stromelysin (Murphy et al., 1987; He et al., 1989; Suzuki et al., 1990) einen Teil des Propeptids abspalten. Durch autolytische *intermolekulare* Abspaltung des restlichen Propeptids wird die Kollagenase I zum aktiven Enzym konvertiert. Aktive Matrix-Metalloproteinasen können im Gewebe durch stöchiometrische Bindung von spezifischen Inhibitorproteinen (TIMP, engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) komplexiert und inaktiviert werden (Docherty et al., 1986; Carmichael et al., 1986; Stetler-Stevenson et al., 1989; Boone et al., 1990; Übersicht in Matrisian, 1990). Im nächsten Abschnitt werden die Grundlagen der Transkriptionsregulation vorgestellt und im Folgenden die Transkriptionsregulation der Kollagenase I detailliert behandelt.

1.6 Grundlagen der Transkriptionsregulation

Die Transkription ist die Basis, auf der die Genexpression kontrolliert wird. Das die Transkriptionsreaktion ausführende Enzym ist die RNA-Polymerase⁷, die mit anderen Faktoren (vgl. Abb. 3) den basalen Transkriptionskomplex bildet. Der Transkriptionskomplex bildet sich an einer kurzen, Adenin- und Thymin-reichen Promotor-Sequenz (TATA-Box), die etwa 25 Basenpaare vor dem eigentlichen Startpunkt der Transkription liegt⁸. Der Promotor ist die Schaltregion des Gens und enthält neben dem TATA-Grundmodul noch andere charakteristische DNA-Sequenzen (*cis*-wirkende Elemente), an die Transkriptionsfaktoren (*trans*-wirkende zelluläre Proteine) binden und die für die spezifische Expression des Gens verantwortlich sind. Seit den frühen 80er Jahren wurden Bindestellen für positiv regulierende Transkriptionsfaktoren gefunden, von denen sich einige durch eine palindromische Konsensussequenz⁹ auszeichnen und in weiten Grenzen richtungs- und entfernungsunabhängig funktionieren (sog. "Enhancer"¹⁰; Serfling und Slaga, 1985). Negativ

⁷ Eukaryontische Zellen haben drei RNA-Polymerasen, die nach ihrer Funktion und ihrer α -Amanitin-Sensitivität unterschieden werden. Proteinkodierende Gene werden von der RNA-Polymerase II (α -Amanitin-sensitiv) transkribiert.

⁸ Die einzelnen Basenpaare eines Gens sind fortlaufend nummeriert. Die Numerierung bezieht sich auf den Startpunkt der Transkription (+1). Promotorsequenzen liegen meistens "stromaufwärts" (in der 5'-nichtkodierenden Region des Gens) und tragen negative Nummern. Positive Zahlen geben transkribierte, proteinkodierende Sequenzen und Intronsequenzen des Gens an.

⁹ Anna, Otto oder TGAGTCA/ACTGAGT sind palindromische Sequenzen.

¹⁰ Enhancersequenzen (engl. to enhance = verbessern) steigern die Aktivierbarkeit von Promotoren.

regulierende Elemente (sog. "Silencer") sind schwerer zu identifizieren und wurden bisher vergleichsweise selten charakterisiert (Renkawitz, 1990; Garzon u. Zehner, 1994). In einigen Fällen wird über dieselbe Sequenz eine positive sowie auch negative Expressionskontrolle ausgeübt (Jonat et al., 1990; Diamond et al., 1990).

Während die RNA-Polymerase grundsätzlich in der Lage ist, ein beliebiges Gen zu transkribieren, sind die Transkriptionsfaktoren die steuernden Glieder der differentiellen Genexpression, d.h. Transkriptionsfaktoren bestimmen, daß unter den gegebenen Bedingungen in der betreffenden Zelle ein konkretes Gen für eine definierte Zeitdauer exprimiert wird. Transkriptionsfaktoren regulieren die Häufigkeit, mit der sich der Transkriptionskomplex an der TATA-Box eines bestimmten Gens bildet und die Transkription initiiert. Wie das geschieht, ist im Einzelnen noch nicht verstanden. Einige Untersuchungen zeigen, daß Transkriptionsfaktoren einen strukturellen Einfluss auf die DNA-Histon-Organisation des Chromatins haben können (Wolffe, 1994 a und b; Loo und Rine, 1994). Andere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, daß Transkriptionsfaktoren mit den Faktoren des basalen Transkriptionskomplex in Wechselwirkung treten und die Affinität der RNA-Polymerase für das Gen erhöhen (Ptashne, 1988; Ptashne und Gann, 1990; Hori und Carey, 1994).

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird durch Signalstoffe, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone, chemische Mediatoren, Zell-Zell-Interaktionen oder elektromagnetische Strahlung reguliert. Das Signal wird über Signaltransduktionswege zum Zellkern geleitet. Als Resultat wird die Produktion spezieller Transkriptionsfaktoren gesteigert oder vermindert, oder es werden Transkriptionsfaktoren in einer Art und Weise modifiziert, daß ihre DNA- oder Proteinbindungseigenschaften verändert sind (Mitchell und Tjian, 1989; Hunter und Karin, 1992).

1.7 Die Transkriptionsregulation der Kollagenase Typ I durch den Transkriptionsfaktor AP-1

Während die 72 kDa-Kollagenase in den meisten Zelltypen konstitutiv exprimiert wird und die Transkription insensitiv gegenüber Wachstumsfaktoren ist (Overall et al., 1991), ist in unstimulierten normalen menschlichen Fibroblasten nur eine geringe basale Kollagenase-I-Transkriptionsaktivität meßbar (Angel et al., 1987 a). Durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone und andere Faktoren wird die Expression von Kollagenase I, Stromelysin, 92 kDa-Kollagenase und PUMP-1 sehr stark reguliert. Verschiedene Signalstoffe, die die Transkription der interstitiellen Kollagenase (im Weiteren nur noch Kollagenase genannt) induzieren¹¹ und reprimieren¹² sind in Tabelle 3 aufgeführt.

¹¹ induzieren = die Transkription anschalten, die Genexpression bewirken.

¹² reprimieren = die Transkription abschalten, die Genexpression hemmen.

Tab. 3: Induktion und Repression der Kollagenase I-Transkription

	Faktor	untersuchte Zelllinie	Referenz
Induktion	PDGF	normale menschl. Hautfibroblasten	Bauer et al., 1985
	bFGF, EGF	menschl. MRC-5 Fibroblasten	Edwards et al., 1987
	TPA	normale menschl. Fibroblasten	Whitham et al., 1986
	UVC	normale menschl. Fibroblasten	Angel et al., 1987 a
	<i>ras, mos, src, trk</i>	3T3, GM637, NFBM, HeLa, F9 tk ⁻	Schönthal et al., 1988
	TNF- α	primäre menschl. AF2-Fibroblasten	Brenner et al., 1989 b
	IL-1 α, β	menschl. Synovialfibroblasten	MacNaul et al., 1990
Repression	TGF- β	menschl. MRC-5 Fibroblasten	Edwards et al., 1987
	Glucocorticoide	HeLa tk ⁻	Jonat et al., 1990
	Retinoide	Synovialfibroblasten (Kaninchen)	Brinckerhoff, 1990
	IFN- γ	Chondrozyten	Andrews et al., 1990
	Adenovirus Ela	HeLa tk ⁻	Offringa et al., 1990
	cAMP	menschl. Zervikalfibroblasten	Takahashi et al., 1991
	Progesteron	Fibroblasten	Sato et al., 1991

1.7.1 Phorbolster aktivieren den PKC-abhängigen Signalweg

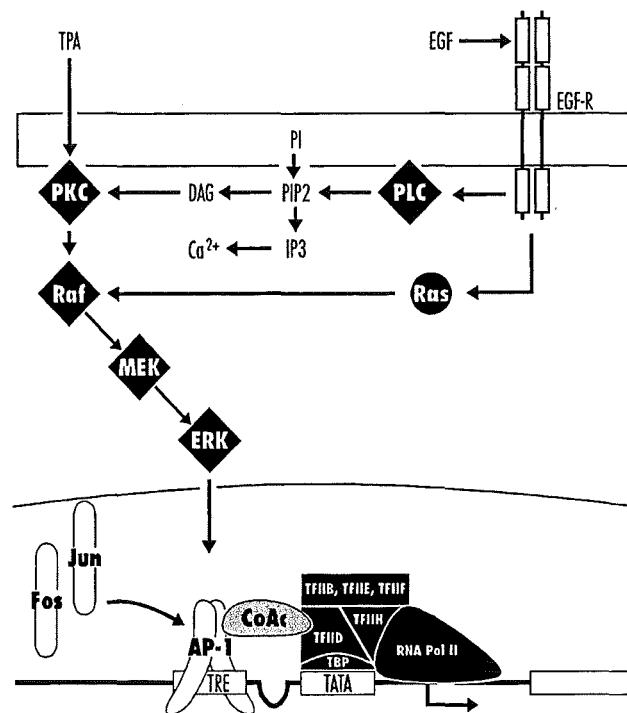
Eine der Substanzen, die am effizientesten die Transkription des Kollagenasegens induziert, ist der Phorboldiester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)¹³. Phorbolster wurden ursprünglich durch alkoholische Extraktion des Samenöls von *Croton tiglium* (Euphorbiaceae) gewonnen und schon in den 60er Jahren als Tumorpromotoren in der Forschung verwendet (Van Duuren und Oris, 1965; Hecker, 1968). TPA ist ein starkes Hautreizmittel und der potenteste der bekannten Tumorpromotoren. Im Mäusehaut-Promotionstest konnten multiple Hauttumoren dadurch verursacht werden, daß TPA fortlaufend Mäusen appliziert wurde, die mit einer einzigen, unterschwelligen Dosis eines Karzinogens initiiert wurden (Übersicht in Diamond et al., 1980; Diamond, 1987; Rahmsdorf u. Herrlich, 1990).

Die Wirkung von tumorpromovierenden Phorbolestern auf die Genexpression ist gut untersucht (Davis, 1993; Abb. 3). Phorbolster sind typischerweise bei nanomolaren Konzentrationen aktiv. Sie binden an die Proteinkinase C (PKC) und nehmen die Rolle der Diacylglycerole ein, jener endogenen Verbindungen in tierischen Zellen, die normalerweise die PKC aktivieren. TPA bewirkt so eine langanhaltende Stimulation der PKC (Nishizuka, 1984 und 1986). Im Verlauf der Signaltransduktion durch die Zelle in den Zellkern phosphoryliert die PKC die Serine-259 und -499 der Raf-1-Kinase (Sözeri et al., 1992; Kölch et al., 1993), die ihrerseits die MAP-Kinase-Kinase (MEK) aktiviert (Kyriakis et al., 1992; Crews et al., 1992). MEK aktiviert wiederum die MAP-Kinasen ERK1 (p42^{MAPK}) und ERK2 (p44^{MAPK}) durch Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosinreste im Sequenzmotiv Thr-Glu-Tyr (Haystead et al., 1992; Ahn et al., 1992). Einige der

¹³ Zur Nomenklatur: TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) ist auch als PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) bekannt. Bei der ersten Version steht "O" für "ein Sauerstoff" und nicht für "ortho". Die Abkürzung TPA wird ebenfalls für das Enzym Gewebe-Typ Plasminogen Aktivator (engl. tissue plasminogen activator) verwendet.

MAP-Kinasen wandern in den Nukleus (Lenormand et al., 1993) und aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter die Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun. Diese heterodimerisieren zum Aktivatorprotein 1 (Lee et al., 1987 b; Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988 a; Curran and Franza, 1988; Pulverer et al., 1991). AP-1 reguliert die Transkription der Kollagenase und einiger anderer Gene durch spezifische Bindung an die palindromische Enhancersequenz 5' _TGA G/C TCA_3' (TRE, auf TPA reagierendes Element; Lee et al., 1987 a; Angel et al., 1987 a und b; Übersicht in Rahmsdorf und Herrlich, 1990). Die Kristallstruktur von TRE-gebundenem AP-1 ist bekannt (Glover u. Harrison, 1995).

Abb. 3: Phorbolster aktivieren den Transkriptionsfaktor AP-1 über den PKC-abhängigen Signaltransduktionsweg: Darstellung des Signalfusses durch die Zellmembran und innerhalb der Zelle zum Zellkern. Durch die Bindung des spezifischen Liganden (z.B. EGF) stimulierte Rezeptoren (EGF-R) aktivieren die Phospholipase C (PLC), die das Membranphospholipid PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Klassische Proteinkinase C-Isoformen werden durch Diacylglycerol, Calcium (Ca²⁺) und Phosphatidylserin oder direkt durch Phorbolster aktiviert. Die Aktivierung der PKC wird durch *cis*-ungesättigte Fettsäuren und Lysophosphatidylcholin verstärkt und verlängert, die aus der Umwandlung von anderen Membranphospholipiden (besonders Cholinphospholipid) durch die Phospholipase D und Phospholipase A₂ stammen (hier nicht gezeigt; vgl. Nishizuka, 1992).



Die PKC aktiviert die Raf-1-Kinase (Raf), die die MAP-Kinase-Kinase (MEK) phosphoryliert. Das Signal wird zur MAP-Kinase (ERK) weitergeleitet, die in den Nukleus transloziert und AP-1 aktiviert. AP-1 bindet an spezifische Enhancersequenzen (TREs, auf TPA reagierende Elemente) in der Promotorregion von Genen und schaltet die Transkription dieser Gene durch Wechselwirkung mit dem basalen Transkriptionskomplex (TBP, TATA-bindendes Protein; TFII-Faktoren, basale Transkriptionsfaktoren; RNA Pol II, RNA-Polymerase II) an. Zwischen AP-1 und dem basalen Transkriptionskomplex vermittelt ein Brückenprotein (CoAc, Coaktivator), das als p52/p54 beschrieben ist (Oehler u. Angel, 1992). Andere Untersuchungen zeigen, daß AP-1 über CBP (phospho-CREB-bindendes Protein; Chrivia et al., 1993) mit TFIIB interagieren kann (Kwok et al., 1994; Arias et al., 1994). Ein alternativer Signaltransduktionsweg ist angedeutet: Rezeptor-Tyrosinkinasen wie der EGF-Rezeptor können Raf direkt über eine monomere GTPase (Ras) aktivieren (Vojtek et al., 1993; Avruch et al., 1994; McCormick, 1994).

Die strukturelle Organisation von c-Jun und c-Fos ist in Abbildung 4 schematisch wiedergegeben. Transkriptionsaktivatoren der Jun-, Fos-, CREB/ATF- und C/EBP-Proteinfamilien zeichnen sich durch eine in der Evolution konservierte Abfolge von Aminosäuren, der sog. "bZIP"-Region aus

(Landschulz et al., 1988). Die bZIP-Region, auch DNA-Bindedomäne genannt, kann weiterhin nach den charakteristischen Aminosäuren in eine "basische Domäne" und eine an Leucinen reiche Domäne (engl. *leucine zipper*) unterteilt werden. Die Funktion der bZIP-Region ist, die DNA-Bindung und Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren zu vermitteln, wobei die DNA-Bindung Dimerisierung voraussetzt. Alle bislang gefundenen Proteine der Jun-Familie¹⁴ können untereinander Homodimere bilden (z.B. c-Jun/c-Jun, c-Jun/JunB). Jun-Homodimere binden *in vitro*¹⁵ an TRE-ähnliche Sequenzen, wenn auch mit beträchtlich unterschiedlichen Affinitäten. Dagegen assoziieren Fos-Proteine nicht mit sich selbst oder untereinander und binden deshalb auch nicht an DNA. Mit Jun-Proteinen jedoch bilden Fos-Proteine sehr stabile Heterodimere, die eine größere DNA-Bindungsaffinität aufweisen, als Jun-Homodimere (Übersicht mit Literaturangaben in Angel u. Karin, 1991; Angel u. Herrlich, 1994).

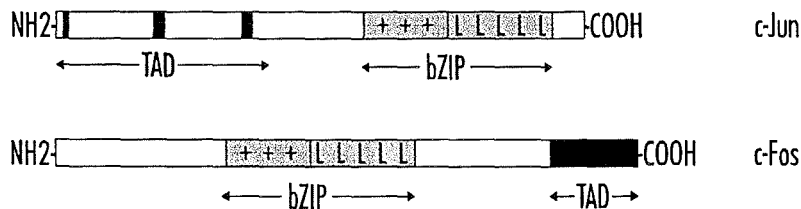


Abb. 4: Strukturelle Organisation der c-Jun und c-Fos Proteine. Drei Cluster negativ geladener Aminosäuren (schwarze Abschnitte) in der aminoterminalen Hälfte des c-Jun Proteins markieren wichtige Regionen der Transaktivierungsdomäne (TAD). Beide Proteine interagieren miteinander und mit DNA über die bZIP-Region, bestehend aus der "basic region" (+) und dem "leucine zipper" (L). Diese Aminosäuren sind zwischen den Proteinen der Jun- und Fos-Proteinfamilie hoch konserviert. Transkriptionsaktivatoren der CREB/ATF-Familie (Gonzalez und Montminy, 1989; Hai et al., 1989), die an Sequenzen binden, die dem TRE sehr ähnlich sind (CRE), enthalten ebenfalls bZIP-Regionen dieser Art.

Für die Induktion der Kollagenasetranskription spielt AP-1 eine zentrale Rolle. Darum wird im nächsten Abschnitt die Regulation von AP-1 ausführlicher behandelt. Es soll an dieser Stelle nur erwähnt werden, daß Phorbolster noch etliche andere Transkriptionsfaktoren und Gene aktivieren (Übersicht bei Rahmsdorf und Herrlich, 1990). Weitere Enhancerelemente des PKC-abhängigen Signalnetzes sind zum Beispiel das SRE (auf Serum reagierendes Element) des *c-fos* Gens (Treisman, 1985; Büscher et al., 1988; Abb. 5) und die NF κ B-bindende Sequenz (Lenardo und Baltimore, 1989), die in vielen Promotoren gefunden wird.

¹⁴ Zur *jun*-Genfamilie gehören *v-jun*, *c-jun*, *junB* und *junD*, zur *fos*-Genfamilie zählt man *v-fos*, *c-fos*, *fosB*, *fra-1* und *fra-2*. Gene und Proteine des gleichen Namens werden durch die Schreibweise unterschieden: c-Jun ist das Genprodukt (Protein) des zellulären *c-jun*-Gens.

¹⁵ *in vitro* = im zellfreien System studiert; *in vivo* = in der lebenden Zelle untersucht.

1.7.2 Die Steigerung der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1

Die Aktivität von AP-1 (c-Jun/c-Fos) wird durch eine Vielfalt von externen Stimuli beeinflusst (Übersicht in Angel und Karin, 1991). Man unterscheidet zwei Mechanismen, durch die die Menge an aktivem AP-1 positiv reguliert wird:

(1.) Die *Induktion der Transkription* von *c-fos* und *c-jun* führt zur erhöhten Produktion von Fos- und Jun-Proteinen.

(2.) Die *posttranslationale Modifikation* von präexistierenden und neu synthetisierten Fos- und Jun-Proteinen steigert die DNA-Bindungsaffinität und Transaktivierungskapazität von AP-1. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen¹⁶ sind die bekanntesten posttranslationalen Modifikationen zur Aktivitätsregulation von Proteinen (Jackson, 1992; Hunter u. Karin, 1992; Hagiwara et al., 1992). Transkriptionsfaktoren werden im allgemeinen durch Serin-/Threonin-Phosphorylierungen aktiviert.

Zwei Transkriptionsfaktoren sind in letzter Zeit in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, die die Transkription von *c-fos* positiv regulieren: TCF (engl. *ternary complex factor*; Shaw et al., 1989) und CREB (CRE-bindendes Protein; CRE, auf cAMP reagierendes Element; Übersicht in Lee u. Masson, 1993). Wachstumsfaktoren und Phorbolster aktivieren intrazelluläre Signalwege, die letztendlich zur Phosphorylierung von p62 TCF (Elk-1) durch die MAP-Kinase-Isoformen ERK1 oder ERK2 führen (Gille et al., 1992, Janknecht et al., 1993). Die Modifikation erhöht die Affinität von TCF für den p67 SRF/SRE-Komplex (SRF, auf Serum reagierender Faktor; Treisman, 1992) und verstärkt die Transaktivierungsfähigkeit von bereits gebundenem TCF (Herrera et al., 1989; Marais et al., 1993). Die Aktivierung von CREB erfolgt durch Polypeptidhormone oder Neurotransmitter, die an Transmembranrezeptoren (engl. *serpentine receptors*) binden und trimere GTPasen aktivieren, die die Adenylatcyclase phosphorylieren. Dieses Enzym synthetisiert den intrazellulären Botenstoff cAMP, der die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die katalytische Untereinheit der PKA wandert in den Zellkern und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB am Serinrest-133, wodurch das Transaktivierungspotential von CREB erhöht wird. (Gonzalez und Montminy, 1989; Chrivia et al., 1993).

Das c-Jun-Protein bindet schon in unstimulierten Zellen als c-Jun/ATF-2-Heterodimer an TRE-ähnliche Sequenzen (Jun1, Jun2) im *c-jun* Promotor. Die Induktion der *c-jun* Transkription wird durch die posttranslationale Modifikation des promotorgebundenen c-Jun (und möglicherweise ATF-2) vermittelt (Hagmeyer et al., 1993; van Dam et al., 1993; Rozek u. Pfeifer, 1993; Herr et al., 1994). Phorbolster, wie auch Wachstumsfaktoren und Cytokine, aktivieren Proteinkinasen der MAPK-Familie (ERK1, ERK2), die die Serine-63 und -73 der Jun-Transaktivierungsdomäne phosphorylieren (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991, 1992; Chen et al., 1992; Blenis, 1993).

¹⁶ Phosphorylierungen ausführende Enzyme werden Kinasen, dephosphorylierende Enzyme werden Phosphatasen genannt. Proteinkinasen werden nach den phosphatakzeptierenden Aminosäuren des Substrats in Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen eingeteilt, obwohl einige (z.B. die MAP Kinase Kinase) überlappende Spezifitäten aufweisen.

Zelluläre Stressfaktoren (z.B. UV-Bestrahlung, osmotisches Ungleichgewicht) aktivieren c-Jun über neu gefundene Mitglieder der MAPK-Familie, die Jun-spezifische NH₂-terminale Kinasen (JNK1, JNK2) oder SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinasen) genannt werden und ebenfalls die genannten Serine der Transaktivierungsdomäne phosphorylieren (Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994). Abbildung 5 zeigt schematisch die hier beschriebenen Signalkaskaden.

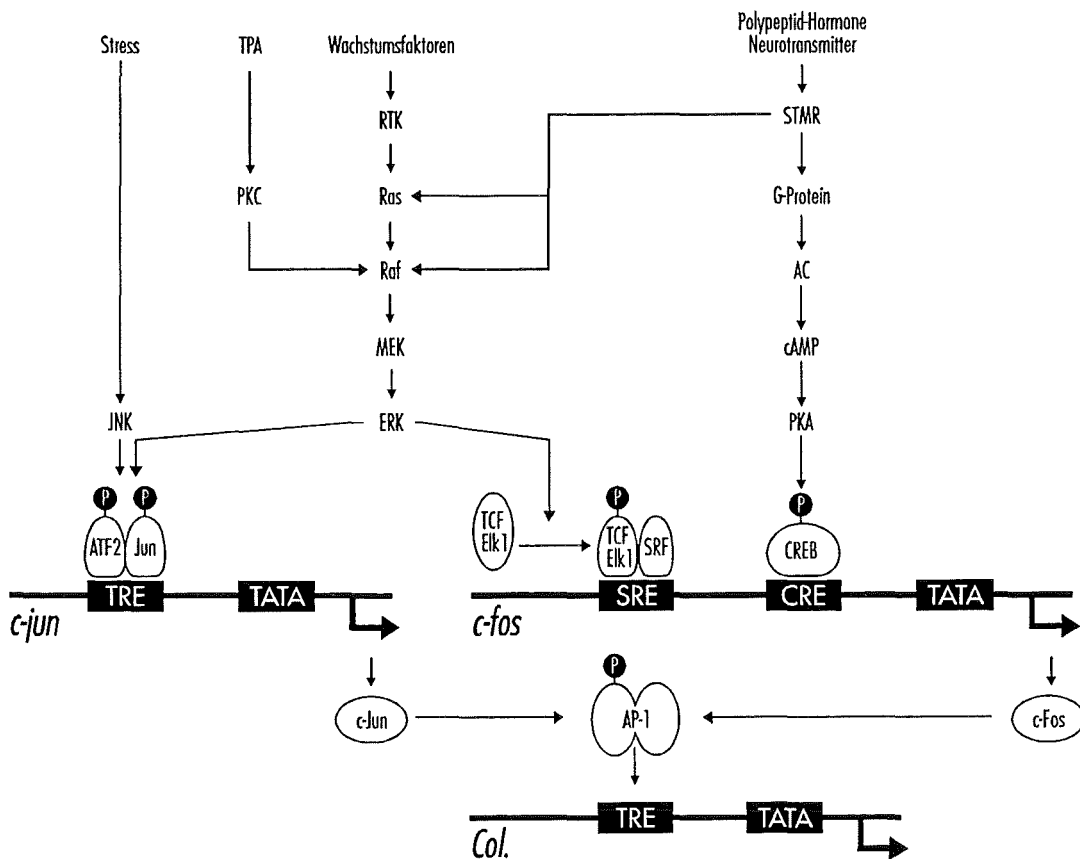


Abb. 5: Externe Stimuli induzieren die Transkription von c-fos und c-jun durch posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren. Erklärung im Text. Zeichnung nach Karin, 1994; Dérijard et al., 1994; Blumer u. Johnson, 1994; ergänzt. Die Abkürzungen bedeuten: Stress, zelluläre Stressfaktoren (z.B. ultraviolette Strahlung, osmotisches Ungleichgewicht); JNK, Jun NH₂-terminale Proteinkinase (Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994); ATF-2, Aktivierender Transkriptionsfaktor-2 (Abdel-Hafiz et al., 1992; Gupta et al. 1995); TRE, auf TPA reagierendes Element; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat; PKC, Proteinkinase C; RTK, Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität; Ras, Ras-GTPase; Raf, Raf-1-Proteinkinase; MEK, MAP-Kinase-Kinase; ERK, MAP-Kinase; TCF, Ternärer Komplex Faktor (Elk-1); SRF, auf Serum reagierender Faktor; SRE, auf Serum reagierendes Element; STMR, Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen; G-Protein, trimere GTPase; AC, Adenylatcyclase; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA, Proteinkinase A; CRE, auf cAMP reagierendes Element; CREB, CRE-bindender Transkriptionsfaktor; TATA, TATA-Box; Col., Kollagenase-Gen.

1.7.3 Die Hemmung der AP-1 Aktivität

Es ist evident, daß Gene und Genprodukte, die in Zellproliferationsprozesse eingreifen, sehr präzise reguliert werden müssen. Proto-Onkogene reagieren im allgemeinen sehr schnell auf einen externen Reiz¹⁷. So kann *c-fos* mRNA schon innerhalb von 15 Minuten nach Aktivierung des PKC-Signalwegs durch TPA nachgewiesen werden und die *c-jun* mRNA-Synthese setzt nur wenig später ein. Die Genexpression ist transient, d.h. *c-fos* und *c-jun* werden nur für kurze Zeit transkribiert. (Greenberg u. Ziff, 1984; Greenberg et al., 1986; Rahmsdorf et al., 1987; Angel et al. 1988 b; König et al., 1989; Auer et al., 1994; diese Arbeit). *De novo* Proteinsynthese ist für die Induktion der Transkription von *c-fos* und *c-jun* nicht notwendig, wohl aber für deren Abschaltung. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Transkriptionsabschaltung sind für beide Gene nicht zufriedenstellend geklärt. Bekannt ist, daß *c-fos* in Gegenwart von Fos- und Jun-Protein vermindert transkribiert wird, was einen autoregulativen Mechanismus impliziert (Wilson u. Treisman, 1988; Schönthal et al., 1989; König et al., 1989), und daß JunB unter Umständen als negativer Regulator der *c-jun* Expression agieren kann (Angel u. Karin, 1992; Deng u. Karin, 1993). Allerdings ändert sich die *in vivo* Proteinbesetzung der *c-fos*- und *c-jun*-Promotorregionen während der Transkriptionsabschaltung nicht, was gegen die zusätzliche Bindung eines hypothetischen Repressors oder eine Dissoziation von aktivierenden Faktoren spricht und den Austausch oder die Modifikation der DNA-bindenden Proteine voraussetzt (Herrera et al., 1989; Herr et al., 1994). Die Synthese von AP-1 wird auch dadurch beschränkt, daß Transkripte der beiden Proto-Onkogene nicht stabil sind, sondern rasch degradiert werden. Angriffspunkt der RNA-abbauenden Enzyme ist u.a. eine AU-reiche Sequenz in der 3'-nichtkodierenden Region der *fos*- und *jun*-Gene (Übersicht in Chen u. Shyu, 1994).

Die Menge an aktivem AP-1 kann im übrigen posttranslational reprimiert werden. Für mehrere Proteine wurde gezeigt, daß sie mit dem AP-1-Komplex interagieren und infolgedessen die Aktivität von AP-1 hemmen. So ist die heilungsfördernde Wirkung von synthetischen Glucocorticoiden (z.B. Dexamethason) bei der Behandlung von entzündlichen Prozessen unter anderem der Inaktivierung von AP-1 durch den aktivierten *Glucocorticoidrezeptor* und der damit einhergehenden Repression der Kollagenasetranskription zuzuschreiben. Der Glucocorticoidrezeptor (GR) scheint die Transaktivierungsfähigkeit von AP-1 über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zu beeinträchtigen, ohne jedoch die DNA-Bindung des AP-1-Komplexes bzw. AP-1/GR-Komplexes aufzuheben. (Diamond et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Jonat et al., 1990; Touray et al., 1991; H. König, 1992 und König et al., 1992). Die Kollagenaseexpression wird gleichermaßen durch Adenovirus (Ad5) *E1A-Proteine* unterdrückt, die in diesem Fall die DNA-Bindung von AP-1 (Jun/Fos) an das Kollagenase-TRE *in vivo* verhindern (H. König, 1992;

¹⁷ Gene, die schnell, transient und proteinsyntheseunabhängig induziert werden, nennt man "Sofortantwortgene" (engl. immediate-response genes; Bravo, 1990). Sofortantwortgene codieren häufig Transkriptionsfaktoren sowie zytoplasmatische und sezernierte Onkoproteine (Übersicht in Rahmsdorf und Herrlich, 1990).

Hagmeyer et al., 1993). Ein spezifisches Inhibitorprotein, *IP-1*, wird von Auwerx und Sassone-Corsi beschrieben (1991, 1992). Auch IP-1 reprimiert die DNA-Bindung von AP-1. Die IP-1 Aktivität wird durch AP-1 Aktivatoren (Serum, Phorbolster, Calcium-Ionophoren) und Dibutyryl-cAMP negativ reguliert.

1.7.4 Der zeitliche Ablauf der Anschaltung der Kollagenasetranskription

Die Induktion der Kollagenasetranskription durch Phorbolster und Wachstumsfaktoren erfolgt nicht unmittelbar. Mißt man den zeitlichen Verlauf (Kinetik) der induzierten Änderung der Menge an kollagenasespezifischer mRNA, so ist innerhalb von 30 Minuten nach der Behandlung von Zellen mit dem Induktor keine Transkriptionsaktivität festzustellen. Man nennt den Zeitabschnitt, in dem noch kein Effekt nachweisbar ist, *lag-Phase*. Eine geringe Zunahme der Transkriptmenge ist erst nach 1 Stunde meßbar. Zwischen 2 und 10 Stunden wächst die mRNA-Menge maximal an, erreicht dann ein Plateau und kehrt nach 16 h langsam auf den Wert von unbehandelten Zellen zurück (Pötting, 1985; Angel, 1987; Angel et al., 1987 a; diese Arbeit). Die direkte Bestimmung der Transkriptionsrate (sog. *nuclear run-on* Analyse) bestätigt die verzögerte Induktion der Transkription, die Phase intensiver Transkriptionsaktivität von 2 bis 6 Stunden und die Abnahme der Transkriptionsleistung nach 10 Stunden (H. König, 1992). Die Unterschiede zwischen der Transkriptionsrate und der Menge an akkumulierter mRNA sind auf die relativ große Stabilität der Kollagenase-mRNA zurückzuführen, für die eine Halbwertszeit von etwa 30 Stunden gemessen wurde (Otani et al., 1990; diese Arbeit). Im Gegensatz zur oben beschriebenen Induktionskinetik ist die UV-induzierte Akkumulation von Kollagenase-mRNA in HeLa-Zellen frühestens 20 Stunden nach UVC-Bestrahlung (256 nm, 40 J/m²) nachweisbar (Rahmsdorf et al., 1992).

1.8 Problemstellung und Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

1.8.1 Welche Promotorsequenzen maximieren die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasegens?

Die Gene von Stromelysin-2, Kollagenase und Stromelysin-1 liegen als Gruppe (sog. *cluster*) auf dem langen Arm des Chromosom 11 (11q22-q23; Formstone et al., 1993). Etwa 28 kb der 5'-flankierenden Region des Kollagenasegens sind kloniert (genomischer Kollagenase-Cosmidklon *pCllase2*; Baumann, 1986). Die Sequenz des Kollagenasepromotors ist von der Startstelle der Transkription (Position +1) bis zur *KpnI*-Schnittstelle (Pos. -527) bekannt. In diesem Abschnitt wurde ein 7 bp langes Sequenzmotiv gefunden, das für die Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors durch Phorbolster und Serumfaktoren, aber auch durch UVC-Strahlung, absolut notwendig ist. Das *TRE* genannte Enhancerelement (TRE, auf TPA reagierendes Element; Pos. -73 *TGAGTCA* -67)

befindet sich nahe der TATA-Box des Promotors. Wie oben beschrieben, bindet unter induzierenden Bedingungen der Transkriptionsfaktor AP-1 (c-Jun/c-Fos) an das Kollagenase-TRE. Unterbleibt die AP-1 Bindung, etwa weil die TRE-Sequenz durch Punktmutation zerstört ist, ist der Kollagenasepromotor nicht funktionsfähig. Als isoliertes Element vor einen heterologen Promotor kloniert, ist das TRE in der Lage, TPA-Induzierbarkeit zu vermitteln (Angel et al., 1987 a und b; Risse et al., 1989; Stein et al., 1989; Jonat et al., 1990). Andere Promotoren TPA-induzierbarer Gene enthalten ebenfalls TREs. Einige, jedoch nicht alle, entsprechen in der Kernsequenz dem Kollagenase-TRE (Übersicht in Rahmsdorf u. Herrlich, 1990).

Durch einen computerunterstützten Sequenzvergleich wurde, neun Basenpaare 5' des Kollagenase-TREs, eine Abfolge von Nukleotiden gefunden, die Ähnlichkeit mit der Bindestelle für den Faktor PEA3 im Polyomavirus-Enhancer aufweist (Pos. -91_AGAGGATGT_-83; Wasylyk et al., 1989). An die PEA3-Sequenz bindet in einigen Genen ein aktivierender Transkriptionsfaktor der Ets-Familie (Übersicht in Wasylyk et al., 1993). Mit multimeren PEA3/TRE-Bindestellen, die vor ein β -Globin-Promotor/Reporter gen kloniert wurden, konnte eine Straßburger Arbeitsgruppe zeigen, daß oncogeninduziertes Ets und AP-1 synergistisch die Transkription dieser Konstrukte aktivieren (Gutman und Wasylyk, 1990; Wasylyk et al., 1990). Ob die Ets-Bindestelle auch im natürlichen Kollagenasepromotor funktionell ist, wurde bisher nicht untersucht.

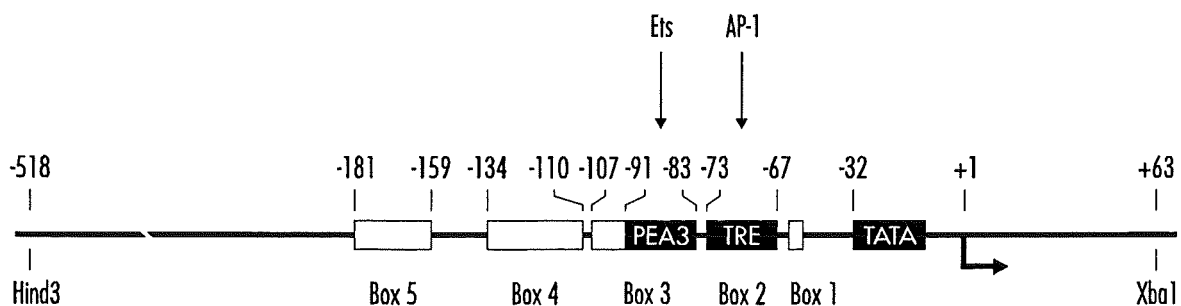


Abb. 6: Schema des Kollagenase-Promotors. Zwei Sequenzelemente, das TRE und das PEA3-Motiv sind bisher beschrieben. Die Grenzen der Proteinbindestellen (Box 1 bis Box 5) wurden nach *in vitro footprint*-Analysen (Angel et al., 1987 b) festgelegt.

Andere, die Genexpression regulierende Sequenzen im Kollagenasepromotor sind noch nicht beschrieben. Durch *in vitro* Proteinbindungsstudien (sog. *DNase I-footprints*) wurde aber schon vor acht Jahren gezeigt, daß der distale¹⁸ Kollagenasepromotor dicht mit Proteinen besetzt ist (Angel et al., 1987 b; Abb. 6). Es ist evident, daß hier ein oder mehrere Faktoren binden, die zur Aktivierbarkeit des Promotors beitragen, denn die Deletion der 5'-flankierenden Sequenzen von -517

¹⁸ *distal* = weiter von der Mitte (in diesem Fall dem Startpunkt der Transkription) entfernt liegend;
proximal = dem zentralen Teil zu gelegen.

bis zur Position -73 verringert die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors um 80% (vgl. -517/+63 CAT3 mit -73/+63 CAT3 in Angel et al., 1987 a)¹⁹.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Promotorelemente zu charakterisieren, die für die maximal mögliche Kollagenaseexpression nach TPA-Stimulation notwendig sind. Es wurden Deletionsmutanten und interne Mutationen²⁰ des Kollagenasepromotors hergestellt und vor das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) kloniert. Die chimären Genkonstrukte wurden in eukaryontische Zellen eingeschleust (transfiziert) und dort zur Expression gebracht. Das Produkt des Indikatorgens kann durch einen Enzymtest nachgewiesen werden (Gorman et al., 1982), wobei die Menge des umgesetzten Substrats ein Indikator für die Aktivität des Promotors ist.

Auf diese Weise konnte sowohl mit den Deletionsmutanten als auch mit den Punktmutanten gezeigt werden, daß die PEA3-Bindestelle im Kontext des Gesamtpromotors funktionell und für die maximale TPA-Induzierbarkeit des Gens absolut erforderlich ist. Ferner wurden drei weitere Promotorabschnitte charakterisiert, deren Deletion bzw. Punktmutation die Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors drastisch verringert. Die Sequenzen wurden IMS4 (-182/-175), IMS3 (-167/-162) und IMS2 (-137/-128) genannt, für "die Induktion maximierende Sequenzen" (engl. *induction maximizing sequences*).

1.8.2 Warum ist die Induktion des Kollagenasegens proteinsyntheseabhängig?

Bei dem Großteil der bislang untersuchten Gene verhindern Hemmstoffe der Proteinsynthese²¹ nicht die TPA-induzierte Akkumulation der spezifischen mRNA (Übersicht bei Rahmsdorf u. Herrlich, 1990). Man nimmt in diesen Fällen an, daß alle für die Signaltransduktion und Genexpression nötigen Faktoren bereits in der unstimulierten Zelle vorliegen und durch proteinsyntheseunabhängige Modifikationen aktiviert werden. Darüber hinaus sind eine Vielzahl von Genen bekannt, die durch Cycloheximid oder andere Proteinsynthese-Inhibitoren transkriptionell aktiviert werden oder deren Wachstumsfaktor- oder TPA-induzierte Transkription bei blockierter Proteinsynthese gesteigert ist. Diese Eigenschaften wurden für die meisten Onkogene (z.B. *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*; Greenberg et al., 1986; Mahadevan und Edwards, 1991; Edwards und Mahadevan, 1992; diese Arbeit), aber auch für Interferon- β (Maroteaux et al., 1983), Actin (Elder et al., 1984), Immunglobulin (Ishihara et al., 1984), Klasse II-MHC Gen (invariante Kette; Rahmsdorf et al.,

¹⁹ Die Numerierung der Kollagenasesequenzen unterscheidet sich in dieser Arbeit aufgrund eines zusätzlichen Guanins an der Position -62 von derjenigen in Angel et al. (1987 a) um ein Nukleotid (H.P. Auer, 1990). Dieses Guanin ist auch in endogenen Kollagenasegen vorhanden (H. König, 1992).

²⁰ Den Deletionsmutanten fehlen Stücke des Gens (in diesem Fall 5'-flankierende Sequenzen). Als interne Mutationen werden in dieser Arbeit Punktmutationen (Austausch einzelner Nukleotide unter Beibehaltung des ursprünglichen Abstands der umliegenden Sequenzen) bezeichnet.

²¹ Zur Hemmung der Proteinsynthese in Eukaryonten werden u.a. die Antibiotika Cycloheximid, Anisomycin, Puromycin, Pactamycin und Emetin verwendet.

1986), Metallothionein IIA (Angel, 1987) und Stromelysin²² (Otani et al., 1990; Yang und Kurkinen, 1994) beschrieben, um nur einige Gene zu nennen.

Dagegen wird das Kollagenase I-Gen, sowie die Gene von Cathepsin (Rabin et al., 1986; Troen et al., 1988), *t*-Plasminogenaktivator (Fisher et al., 1985) und Proliferin (Mordaq u. Linzer, 1989) proteinsyntheseabhängig reguliert: In Gegenwart von Cycloheximid²³ ist die TPA-induzierte Akkumulation von Kollagenase-mRNA in menschlichen Hautfibroblasten (NF München) um etwa 80 % reduziert (Angel et al., 1987 a). Die Hemmung der Kollagenaseexpression ist nicht gewebespezifisch und nicht an die individuelle Wirkungsweise eines bestimmten Proteinsynthese-Inhibitors gebunden, da auch Anisomycin und Puromycin²⁴ die TPA-Induktion des Kollagenasegens in Zellen einer menschlichen Zervixkarzinomlinie (HeLa) sehr effizient hemmen (diese Arbeit).

Tab. 4: Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen verschiedener, die Proteinsynthese hemmender, Antibiotika (Pestka, 1971; Vazquez, 1979; Lewin, 1990; Edwards und Mahadevan, 1992; Alberts et al., 1994)

Inhibitor	Wirkungsmechanismus
Anisomycin	Blockiert die Bildung der Peptidbindung (Peptidyltransferase-Reaktion) durch Interaktion mit der 60S-Untereinheit des Ribosoms; dadurch Translationsstop und Polysom-Stabilisierung. Wirkt nur auf eukaryontische Proteinsynthese.
Cycloheximid	Inhibiert die Translokation der Peptidyl-mRNA von der ribosomalen A-Stelle zur P-Stelle. Cycloheximid und Anisomycin binden an verschiedene Stellen der 60S-Untereinheit. Stabilisiert Polysomen. Für Eukaryonten spezifisch.
Puromycin	Analogon zum Aminoacyl-Adenyl-Terminus der AA-tRNA. Interagiert mit der A-Stelle der großen ribosomalen Untereinheit. Akzeptiert entstehende Peptide, blockiert die Elongation, verursacht den frühzeitigen Abbruch der Translation und Zusammenbruch der Polysomen. Wirkt auf pro- und eukaryontische Proteinsynthese.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß ein transient in HeLa-Zellen transfiziertes Kollagenasepromotor-Konstrukt, das als Enhancerelement nur die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 vor dem CAT-Gen enthält (-74/+63 CAT5), durch Proteinsynthese-Inhibitoren aktivierbar ist, und daß Phorbolster und Proteinsynthese-Inhibitoren synergistisch die Transkription eines solchen Genkonstrukts induzieren (diese Arbeit). Man muß also folgern, daß die Signaltransduktion zu präexistierendem AP-1 keine Proteinneusynthese erfordert. Die Konsequenz aus dieser Beobachtung ist, daß für die maximale Induktion der Kollagenase ein oder mehrere

²² Über die Wirkung des Proteinsynthese-Hemmstoffs Cycloheximid auf die Transkription des Stromelysin/Transin-Gens wird in der Literatur Widersprüchliches berichtet: In menschlichen Fibroblasten induziert Cycloheximid die Transkription des Stromelysin I-Gens (Otani et al., 1990; Yang u. Kurkinen, 1994). Im Gegensatz dazu ist die Wachstumsfaktor-induzierte Expression des Transin-Gens in Ratten-Fibroblasten von Proteinneusynthese abhängig (Matrisian et al., 1986).

²³ 10 µg/ml Cycloheximid hemmen in eukaryontischen Zellen den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in TCA-präzipitierbares Material zu mehr als 95% (Angel et al., 1987 a und P. Angel, persönliche Mitteilung).

²⁴ Anisomycin und Puromycin inhibieren in einer Konzentration von 10 µg/ml vollständig den Einbau von ³⁵S-Methionin in Protein (Edwards und Mahadevan, 1992).

weitere, aktivierende Transkriptionsfaktoren notwendig sind, die nach Phorbolster-Behandlung neu synthetisiert werden müssen und/oder deren posttranslationale Aktivierung Proteinsynthese voraussetzt. In diesem Sinn könnte auch die verzögert einsetzende Transkription der Kollagenase durch die zunächst notwendige Neusynthese aktivierender Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Eine zweite Möglichkeit wäre ein präexistierendes Aktivator-Protein mit einer kurzen Halbwertszeit, das durch TPA aktiviert wird und dessen Nachsynthese durch Hemmstoffe der Proteinsynthese unmöglich gemacht wird. Schließlich könnte noch ein Repressor-Protein eine Rolle spielen, das den Promotor verschließt und auf den aktivierenden Reiz hin durch einen proteinsyntheseabhängigen Mechanismus inaktiviert wird. Die Bindestellen dieser akzessorischen Faktoren sollten distal vom Kollagenase-TRE zu finden sein.

Die zu prüfende Arbeitshypothese lautete: Wenn für die TPA-Aktivierbarkeit eines Kollagenaseminimalkonstrukts (-74/+63 CAT5) keine Proteinsynthese notwendig ist und die Aktivierung eines Konstrukts mit zusätzlichen 5'-Sequenzen (-1200/+63 CAT3) durch Proteinsynthese-Inhibitoren hemmbar sein sollte, so kann man durch stückweise Deletion des Promotors diejenigen Sequenzen eingrenzen, an die proteinsynthesesensitive Faktoren binden. Das ist gelungen. Die für die Anisomycin-Sensitivität der Kollagenaseexpression verantwortlichen Sequenzen sind identisch mit den DNA-Motiven IMS4 (-182/-175) und IMS3 (-167/-162), also mit Bindestellen für Proteine, die für die volle Aktivierbarkeit des Kollagenasepromotors erforderlich sind.

2. Ergebnisse

Teil 1:

Charakterisierung der Promotorsequenzen, die für die maximale Expression des Kollagenasegens nach TPA-Stimulation notwendig sind

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil werden die Sequenzelemente charakterisiert, die zur Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors durch den Phorbolster TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat), einen Aktivator des Proteinkinase C-abhängigen, intrazellulären Signalwegs, beitragen. Der zweite Teil der Arbeit definiert die Sequenzabschnitte, die für die negative und positive Interferenz zwischen Phorbolestern und Proteinsynthese-Inhibitoren verantwortlich sind. Im letzten Abschnitt wird untersucht, warum AP-1-abhängige Kollagenasepromotor-Konstrukte durch Hemmstoffe der Proteinsynthese induziert werden.

2.1 Homologien zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Kollagenasepromotor

So verschiedene extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren und ultraviolette Strahlung aktivieren das menschliche Kollagenase I-Gen in eukaryontischen Zellen über intrazelluläre Signalketten, die letztendlich konvergieren und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen. AP-1, ein dimeres, aus den beiden zellulären Onkogenprodukten c-Fos und c-Jun zusammengesetztes Protein, bindet an die TRE-Sequenz (TRE, auf TPA reagierendes Element) des Kollagenasepromotors, die sich zwischen den Nukleotiden -73 und -67 (bezüglich der Startstelle der Transkription, +1) befindet. Wird diese Sequenz in Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten durch Deletion entfernt oder durch Basensubstitutionen verändert, so ist eine Induktion der chimären Genkonstrukte nicht mehr möglich (Jonat et al., 1990; Radler-Pohl et al., 1993). Gleichwohl verstärkt die Anwesenheit des 5'-flankierenden Promotorbereichs die Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors erheblich: Ein Konstrukt, das als Enhancersequenz nur das TRE enthält (-74/+63 CAT3), ist in der menschlichen Zervixkarzinomzelllinie¹ HeLa durch den Phorbolster TPA 45-fach induzierbar, während ein

¹ Ein Karzinom ist eine bösartige Geschwulst epithelialen Ursprungs. Etwa 90% der Zervixkarzinome (Gebärmutterhalskrebs) sind Plattenepithelkarzinome, ungefähr 5% sind Adenokarzinome (Pschyrembel, 1986). Die hier verwendete HeLa tk⁻-Zelllinie ist ein Subklon der ursprünglich isolierten Adenokarzinom-Zellen und zeichnet sich durch eine Defizienz im Thymidinkinase-Gen aus.

-518/+63 CAT3-Konstrukt 224-fach induzierbar ist (Angel et al., 1987 a). Darüber hinaus zeigten Proteinbindungsstudien, daß der Kollagenasepromotor zwischen den Endpunkten -220 und -42 mit Proteinen dicht besetzt ist (Angel et al., 1987 b).

```

-520      -510      -500      -490      -480      -470
ACCAGGCAGC TTAACAAAGG CAGAAGGGAA CCTCAGAGAA CCCCGAAGAG CCACCGTAAA
                                     NFκB-CS4

-460      -450      -440      -430      -420      -410
GTGAGTGCTG GGGGAGCTGA ACTTCAGTCA GTACAGGAGC CGAACAGCCA TCAGGTGCGC
GCN4 (II) _ILV1      AP-1 (III), GCN4_His4      LVa      MBF-I

-400      -390      -380      -370      -360      -350
AGTGTTAGTA ATTCCACCCCT CTGCCCTGGG AGCAAGGTGT GTGGAGAAAC CTGTAGCACT
                                     NIP (II) _IL3

-340      -330      -320      -310      -300      -290
TTATGACCAT CAGAACCAGC CTTTTTCAAA AAGACCATGG AGTACTCTTT GACCTGTGTA

-280      -270      -260      -250      -240      -230
TATAACAAGA ACCTTTCTCA AATAGGAAAG AAATGAATG GAGAAAACCA CTGTTTACAT
                                     HINF-A, TIE

-220      -210      -200      -190      -180      -170
GGCAGAGTGT GTCTCCTTCG CACACATCTT GTTTGAAGTT AATCATGACA TTGCAACACC
NIP (I) _IL3      AP-1 (II)      C/EBP, DTF-1

-160      -150      -140      -130      -120      -110
AAGTGATTCC AAATAATCTG CTAGGAGTCA CCATTTCTAA TGATTGCCTA GTCTATTTCAT
UEF2_uPA      GCN4 (I) HINF-A

-100      -90      -80      -70      -60      -50
AGCTAATCAA GAGGATGTTA TAAAGCATGA GTCAGACAGC CTCTGGCTTT CTGGAAGGGC
Ets_TCR-α      AP-1 (TRE)

-40      -30      -20      -10      10      20
AAGGACTCTA TATATACAGA GGGAGCTTCC TAGCTGGGAT ATTGGAGCAG CAAGAGGCTG
TATA-Box      *

          30      40      50      60      69
GGAAGCCATC ACTTACCTTG CACTGAGAAA GAAGACAAAG GCCAGTATGCACAGCTTTCCT
                                     M H S F P

```

Abb. 7: Potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Kollagenase-Promotor. Die DNA-Sequenz der 5'-flankierenden Region des Kollagenase I-Promotors (Genbank-Name Humcn2A.Gb_Pr, Accession-Nr. M16567) wurde mit dem Sequenzanalyse-Programm MAP (GCG Software Package; Madison, Wisconsin, U.S.A.) und der *tf sites.dat*-Datenbank (NAR 18, 1749-1756, 1990; GCG, Release 7.3, September 1993) nach möglichen Transkriptionsfaktor-Erkennungssequenzen durchsucht. Gefunden wurden Homologien zu den Bindestellen der Transkriptionsfaktoren *NFκB* (Haematol. Bluttransfus. 32, 411-415, 1989; Lenardo und Baltimore, 1989), *GCN4* (PNAS 83, 8516-8520, 1986), *LVa* (Mol. Cell. Biol. 7, 1101-1110, 1987), *MBF-I* (Mol. Cell. Biol. 9, 5315-5323, 1989), *HINF-A* (NAR 15, 1679-1698, 1987), *TIE*-bindendes Protein (Cell 61, 267-278), *NIP* (PNAS 87, 5046-5050, 1990 und NAR 19, 335-341, 1991), *AP-1* (Cell 49, 729-739 und 741-752, 1987), *C/EBP* (Genes Dev. 1, 133-146, 1987), *DTF-1* (Trends Genet. 5, 377-383, 1989), *UEF2*, *UEF3* (EMBO 11, 4573-4582, 1992) und *Ets* (Science 250, 814-818, 1990). Die TATA-Box, der Transkriptionsstart (Stern) und der Translationsstart (ATG) sind gekennzeichnet. Die Abkürzungen bedeuten: CS, Konsensussequenz; ILV, Isoleucin/Valin-Biosynthese-Enzym (*S. cerevisiae*); His, Histidin-Biosynthese-Enzym (*S. cerevisiae*); IL3, Interleukin 3; uPA, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator; TCR-α, T-Zell Rezeptor; Col, Kollagenase; M, Methionin; H, Histidin; S, Serin; F, Phenylalanin; P, Prolin.

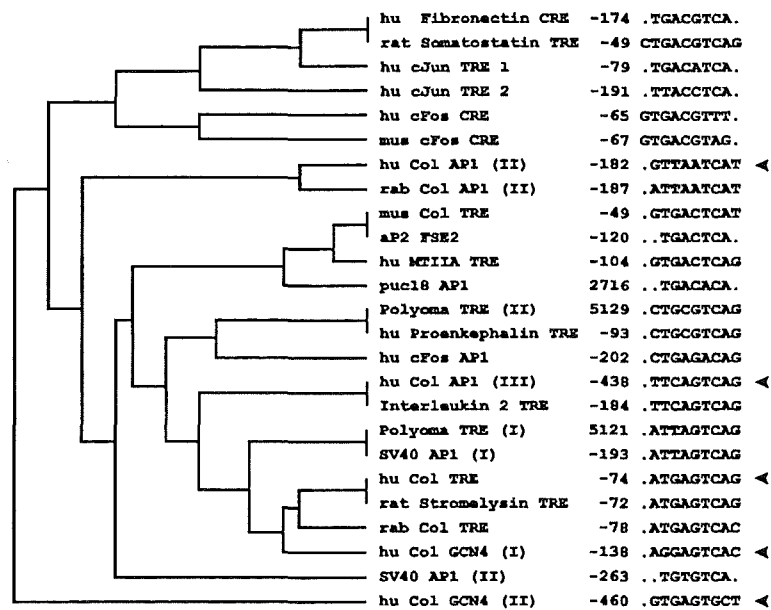


Abb. 8: Sequenzvergleich möglicher Bindestellen für AP-1-ähnliche Faktoren im Kollagenasepromotor (<) mit funktionellen TREs aus den Kontrollregionen TPA-regulierter Gene. Die Sequenzen wurden durch das Computerprogramm *pileup* (GCG Software Package; Madison, USA) nach ihrem Verwandtschaftsgrad geordnet. Die zur Überprüfung der Güte des Computerprogramms mitgeführte CRE-Sequenzen wurden richtig geordnet und den TRE-ähnlichen Sequenzen gegenübergestellt. Die Zahlen vor den TREs und CREs geben die Lokalisation der Sequenzen im Promotor an. Abkürzungen: hu, Mensch; rat, Ratte; rab, Kaninchen; mus, Maus; aP2, Adipozyten P2-Gen; MTHIA, Metallothionein; Col, Kollagenase I. Quellenangabe: hu Fibronectin (Dean et al., J. Biol. Chem. 265, 3522-3527, 1990); rat Somatostatin (Montminy et al., PNAS 83, 6682-6686, 1986); hu cJun (Angel et al., Cell 55, 875-885, 1988); hu cFos (van Straaten et al., PNAS 80, 3183-3187, 1983); mus cFos (Berkowitz et al., Mol. Cell. Biol. 9, 4272-4281, 1989); hu Col (Angel et al., Cell 49, 729-739, 1987); rab Col (Chamberlain et al., J. Cell. Biochem. 52, 337-351, 1993); mus Col (J. Schaper, Diplomarbeit am IGEN, Karlsruhe); aP2 (Rauscher et al., Cell 52, 471-480, 1988); hu MTHIA (Karin u. Richards, Nature 229, 797-802, 1982); puc18 (Yanish-Perron et al., Gene 33, 103-119,); Polyoma (Zenke et al., EMBO J. 5, 387-397, 1986); hu Proenkephalin (Comb et al., Nature 323, 353-356, 1986); hu Interleukin 2 (Fujita et al., Cell 46, 401-407, 1986); SV40 (Gruss et al., PNAS 78, 943-947, 1981); rat Stromelysin (Matrisian et al., EMBO J. 4, 1435-1440, 1985).

Durch die schrittweise Verkürzung (Deletion) des Kollagenasepromotors sollten die Zielsequenzen der Faktoren einzugrenzen sein, die an den distalen Kollagenasepromotor binden und die TPA-Induzierbarkeit fördern. Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, wo die Deletionsendpunkte gesetzt werden müssen, wurde der Kollagenasepromotor mit Hilfe eines Computerprogramms und einer Datenbank für eukaryontische Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf homologe Sequenzen durchsucht. Das Ergebnis der Sequenzanalyse ist in Abbildung 7 zusammengefaßt.

Neben den schon bekannten Bindestellen für AP-1 (-73/-67) und Ets (-91/-83) wurden vier weitere Sequenzen gefunden, die den Bindestellen der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GCN4 ähneln. GCN4 ist ein AP-1-homologer Faktor in *Saccharomyces cerevisiae*. GCN4 erkennt die identische Bindesequenz wie AP-1 und die DNA-Bindedomänen von GCN4 und v-Jun sind funktionell austauschbar (Struhl, 1987 und Struhl, 1988). Möglicherweise haben diese Regionen als TREs Bedeutung und unterstützen die TPA-Induzierbarkeit des Promotors. Um die Funktionalität der

TRE-ähnlichen Sequenzen abschätzen zu können, wurden diese in einen Stammbaum (Dendrogramm) eingeordnet, der mit den TREs aus den Kontrollregionen TPA-regulierter Gene aufgestellt wurde (Abb. 8). Ein Dendrogramm veranschaulicht die Verwandtschaft von Nukleotidsequenzen. Ähnliche Sequenzen werden einander dichter zugeordnet, als weniger verwandte Sequenzen. Man nimmt an, daß funktionelle Promotorelemente und die daran bindenden Faktoren während der Evolution nur wenig verändert werden. Aus dem Stammbaum TRE-ähnlicher Sequenzen erkennt man:

(1.) Die im Sequenzvergleich als *Col AP1 (II)* bezeichnete Sequenz (-182/-176) entspricht einer Sequenz in dem Abschnitt des Kaninchen-Kollagenasepromotors (-187/-141), der zur TPA-Induzierbarkeit beiträgt (Auble u. Brinckerhoff, 1991; Chamberlain et al., 1993).

(2.) Die im distalen Bereich des Kollagenasepromotors gelegene *Col AP1 (III)*-Sequenz (-438/-430) ist identisch mit dem TRE des Interleukin 2-Promotors (Fujita et al., 1986).

(3.) Die *Col GCN4 (I)*-Sequenz (-137_GGAGTCA_-131) unterscheidet sich nur in einem Basenpaar von der klassischen TRE-Sequenz (5'_TGAGTCA_3'). Im Gegenstrang ist das Thymidin an der richtigen Position vorhanden. Dieses Thymidin scheint kritisch für die Bindung von AP-1 (c-Jun/c-Fos) zu sein (Angel et al., 1987 b; Risse et al., 1989).

(4.) Die *Col GCN4 (II)*-Sequenz (-459/-452) weist keine offensichtliche TRE-Ähnlichkeit auf.

Außerdem wurden Homologien zu den Bindestellen anderer Transkriptionsfaktoren gefunden, von denen TIE (-246_GAATTGGAGA_-237), NIP (-386/-373 und -223/-209, s.u.), UEF2 (-151_CAAATAATATG_-141) und C/EBP (-163/-171, s.u.) hier erwähnt werden sollen. Die TIE-Sequenz (TIE, TGF- β inhibitorisches Element) vermittelt die Hemmung der Wachstumsfaktor- und Onkogen-induzierten Stromelysinexpression durch TGF- β 1 (TGF, transformierender Wachstumsfaktor). Der an das TIE bindende Proteinkomplex enthält c-Fos (Kerr et al., 1990). Das NIP-Element wurde im Interleukin 3-Promotor charakterisiert und bindet in aktivierten T-Zellen ein negativ regulierendes Protein, das die Transkription des Promotors reprimieren kann (NIP, nukleäres Inhibitorprotein; Mathey-Prevot et al., 1990). Dagegen scheint das NIP-Motiv bei der Phorbolster- und Interleukin 1-Induktion von Stromelysin in menschlichen Normalfibroblasten eine unterstützende Funktion zu haben (Sirum-Connolly und Brinckerhoff, 1991). In beiden Fällen kooperiert das NIP-Element mit AP-1-Bindestellen. Der Kollagenasepromotor enthält zwei entgegengesetzt orientierte Bindestellen für NIP-ähnliche Proteine, die mit den publizierten NIP-Bindestellen im Interleukin 3- und Stromelysin I-Promotor vergleichbar sind:

Kollagenase I, NIP(II)	-386_CACCCTCTGCCCTG_-373	diese Arbeit
Kollagenase I, NIP(I)	-209_CACACTCTGCCATG_-223	diese Arbeit
Interleukin 3, NIP	-269_CACCTGCTGCCATG_-254	Mathey-Prevot et al., 1990
Stromelysin I, NIP	-100_GTCCTGCTGCCATT_-87	Sirum-Connolly u. Brinckerhoff, 1991

UEF-Sequenzen (uPA-Enhancer bindende Faktoren) vermitteln im Promotor des uPA-Gens (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) die Kooperation zwischen einem AP-1/PEA3-Element (Position -1956) und einer zweiten AP-1-Bindestelle (Position -1870) bei der TPA-Induktion des Gens in HepG2-Zellen (Nerlov et al., 1992). C/EBP (CAAT-Enhancer bindendes Protein) ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor, der vor allem in Hepatozyten (Leberzellen) und Adipozyten (Fett-Speicherzellen) die gewebespezifische Expression verschiedener Gene reguliert (Johnson et al., 1987; Übersicht in Xanthopoulos u. Mirkovitch, 1993). Proteine der C/EBP-Familie enthalten eine basische DNA-Bindedomäne und eine Dimerisierungsdomäne (bZIP-Motiv), wie sie auch in anderen Transkriptionsfaktoren (Fos, Fra, Jun, CREB, ATF-2 und GCN4) gefunden werden (Landschulz et al., 1988; Busch u. Sassone-Corsi, 1990). Die Konsensus-Erkennungssequenz für C/EBP wurde von Ryden u. Beemon (1989) aus dem Vergleich mehrerer C/EBP-bindender, viraler Enhancer abgeleitet und lautet: 5'-T^T/G^NN^GC/TAA^T/G-3'. Diese Sequenz ist im Kollagenasepromotor an der Position -163_TGTTGCAAT_-171 in direkter Nachbarschaft zu einem TRE-ähnlichen Element enthalten.

Anhand der gefundenen Sequenzhomologien und der Grenzen der *in vitro*-Proteinbindestellen (siehe Einleitung, Abb. 6), wurden gezielt Deletionsmutanten des Kollagenasepromotors hergestellt.

2.2 Herstellung von 5'-Deletionen des Kollagenasepromotors mit der PCR-Technik²

Zur zielgerichteten Verkürzung des Kollagenasepromotors wurden 23 bp lange, einzelsträngige Oligonukleotide synthetisiert, die mit 15 bp der gewünschten Kollagenase-Schnittstelle homolog sind und an ihrem 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Hind3* tragen (Material 4.7.2). Als Matrize wurde -518/+63 CAT5-Plasmid-DNA eingesetzt. Der zweite Primer entsprach der Gegenstrang-Sequenz des CAT-Gens in der ATG-Region. Die PCR-Reaktion wurde nach Valette et al. (1989) und Ehrlich (1989) durchgeführt (siehe Methoden, 5.4.1). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind3* und *BamH1* geschnitten und mit dem ebenfalls *Hind3/BamH1*-verdauten Vektorfragment des Ausgangsplasmids (-518/+63 CAT5) ligiert (Abb. 9).

Die Kollagenasegenregion der neuen Konstrukte wurde von beiden Richtungen vollständig sequenziert. Jeweils 0.5 µg Plasmidpräparation von drei unabhängigen Klonen mit der richtigen Sequenz wurden zur optischen Qualitätskontrolle in einem 0.8%-igen Agarosegel aufgetrennt. Sodann wurde die TPA-Induzierbarkeit von drei Klonen im CAT-Test verglichen. Für die weiteren Experimente wurde der Klon verwendet, der sich durch einen hohen Anteil an unbeschädigter Plasmid-DNA und eine mittlere Induzierbarkeit auszeichnete. Auf diese Weise wurden dreizehn Deletionsmutanten des Kollagenasepromotors kloniert (Abb. 10).

² Die PCR-Technik (engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode, um DNA mit Hilfe eines Primerpaars und einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* (Hoffmann-La Roche) durch zyklische Denaturierung, Hybridisierung und Synthese zu vervielfältigen.

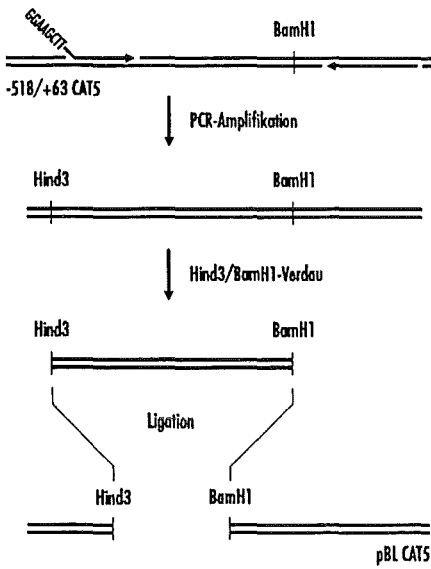


Abb. 9:
5'-Deletion des Kollagenasepromotors durch zielgerichtete Einführung einer *Hind3*-Restriktionsschnittstelle mit der PCR-Technik.

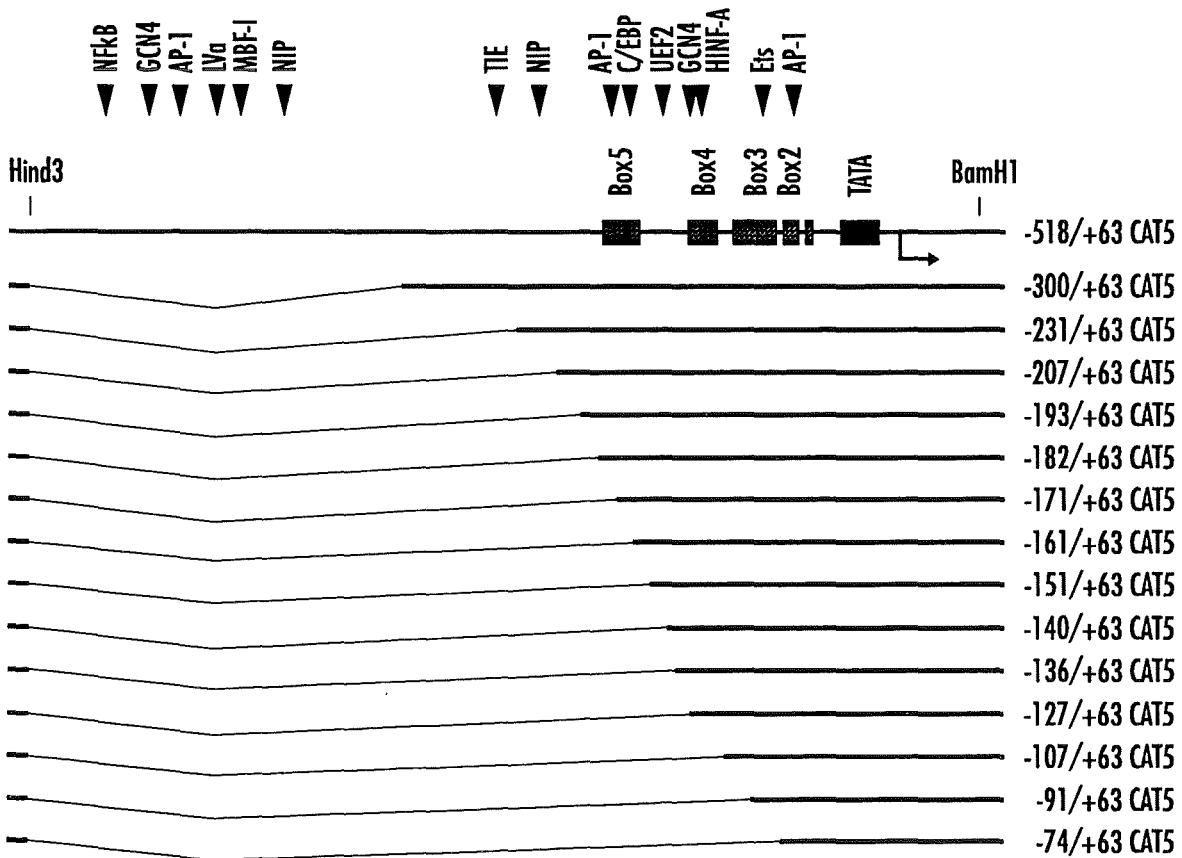


Abb. 10: Kollagenase-gene-CAT-Konstrukte, die durch ortsspezifische Deletion des 5'-flankierenden Bereichs des Kollagenasepromotors hergestellt wurden. Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen (▼) und die *in vitro* Proteinbesetzung des Promotors (Box 2 - 5) sind angezeigt.

2.3 Die Deletion der Promotorabschnitte -182/-161 und -140/-127 reduziert die TPA-Induzierbarkeit von Kollagenasegen-CAT-Konstrukten

Die Kollagenasepromotor-CAT-Deletionskonstrukte wurden transient in HeLa tk⁻ Zellen transfiziert³ und durch die Behandlung der Zellen mit 60 ng/ml TPA zur Expression gebracht. Das Produkt des bakteriellen CAT-Indikatorgens (CAT, Chloramphenicol-Acetyltransferase) konnte durch einen Enzymtest nachgewiesen werden (Gorman et al., 1982 a). Die Menge des umgesetzten Substrats ist proportional zur Menge des exprimierten CAT-Proteins und der Aktivität des Promotorkonstrukts. Eukaryontische Zellen haben keine endogene CAT-Aktivität, so daß die CAT-Expression für die Zellen spezifisch ist, die mit dem rekombinanten CAT-Konstrukt transfiziert wurden.

Eine typische CAT-Bestimmung zeigt Abbildung 11. In Tabelle 5 und Abbildung 12 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 18 individuellen Experimenten angegeben. Jedes Konstrukt wurde in mindestens vier unabhängigen Versuchen getestet. Um experimentelle Varianzen so weit wie möglich auszuschließen, wurde in jedem einzelnen Versuch das Konstrukt mit dem längsten Kollagenasepromotor-Insert (-518/+63 CAT5) als Standard mitgeführt. Die TPA-Induzierbarkeit (d.h. der Induktionsfaktor) dieses "Wildtyp"-Promotors wurde für das jeweilige Experiment willkürlich 100 % gesetzt und die TPA-Induzierbarkeiten der kürzeren Konstrukte auf diese 100 % berechnet.

Nach ihrer relativen Induzierbarkeit können die Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten in vier Gruppen geordnet werden:

(1.) Die *langen Kollagenasepromotoren* (-518 bis -182) sind sehr gut durch TPA induzierbar und unterscheiden sich voneinander nicht signifikant. Die distale Gruppe von Sequenzhomologien (d.h. die möglichen Bindestellen NFκB-, GCN4-, AP-1-, LVa-, MBF-I- und NIP(II)-ähnliche Faktoren) trägt folglich nicht zur TPA-Induzierbarkeit bei. Ebenso wenig läßt sich ein Einfluß der TIE-Sequenz (-246/-237) und der NIP(I)-Sequenz (-223/-209) feststellen. Das -171/+63-Fragment ist im Mittel ebenfalls gut induzierbar, aber deutlich schwächer, als das nächstlängere -182/+63-Promotorfragment. Tendentiell verursacht also die Entfernung der TRE-ähnlichen Sequenz zwischen den Endpunkten -182 und -171 einen Verlust an Aktivierbarkeit. Die Deletion von weiteren 10 bp (von -171 auf -161) senkt die Induzierbarkeit um mehr als 50 %. Zwischen den Endpunkten -182 und -161 befinden sich demnach Sequenzen, die zur TPA-Induzierbarkeit beitragen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, dieses Ergebnis zu interpretieren: Entweder binden zwei verschiedene Faktoren an die -182/-161-Region, von denen der eine Faktor eine Affinität zu TRE-ähnlichen Sequenzen (-182/-176) besitzt und der andere Faktor an die C/EBP-Konsensussequenz (-171/-163) binden kann,

³ Bei der transienten Transfektion wird das rekombinante Gen nicht in das Genom der Zellen integriert. Die Methode eignet sich für den zügigen Test der Eigenschaften neu klonierter Genkonstrukte. Vorteilhaft ist, daß die Expression der Konstrukte nicht durch die Umgebung der Integrationsstelle beeinflusst wird, wie es bei stabil transfizierten Zellen der Fall sein kann. Der Nachteil der transienten Transfektion liegt darin, daß nur wenige Zellen das Genkonstrukt exprimieren und der Nachweis von schwachen Promotoraktivitäten schwierig ist.

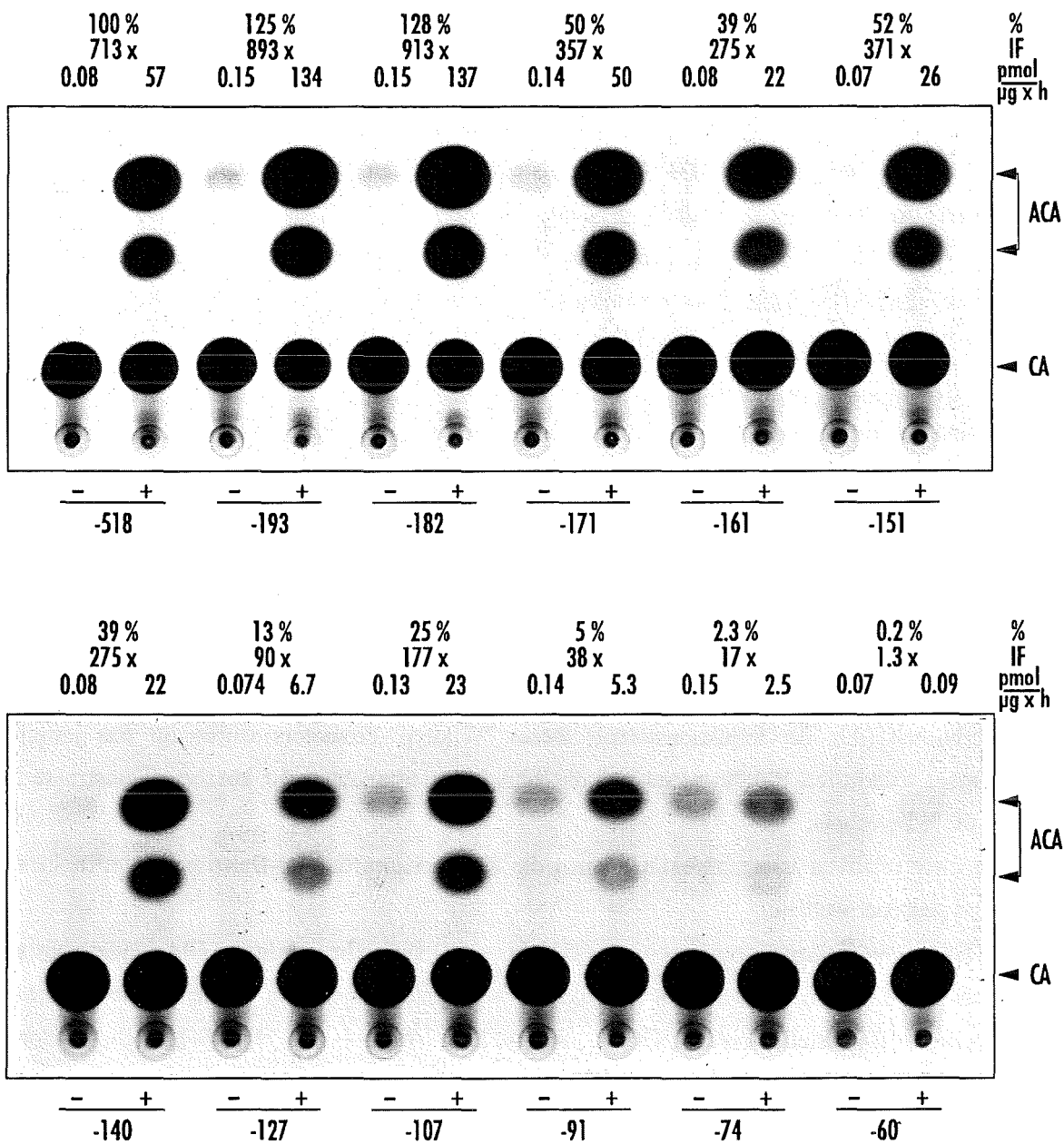


Abb. 11: Die TPA-Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden mit 5 µg Kollagenase-CAT-Plasmid in 1 ml 1 x TBS / 0.5 mg DEAE-Dextran 30 min lang bei Raumtemperatur transfiziert und nach entfernen des Transfektionsgemisches 22 h im Brutschrank mit DMEM, 8% FCS, 1% PS inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Ansätze mit 60 ng/ml TPA behandelt (+). Nach 24 h wurden die Zellen aufgebrochen und die Gesamtprotein-Fraktion präpariert. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) gemessen. 200 µg Proteinextrakt aus unbehandelten Zellen (-) bzw. 20 µg aus TPA-behandelten Zellen wurden 2 h lang mit 7400 pmol ¹⁴C-Chloramphenicol und 70 µg Lithium-Acetyl-CoA bei 37 °C inkubiert. Das nicht umgesetzte Substrat (CA) und die acetylierten Produkte (ACA) wurden durch Extraktion des Reaktionsgemisches mit Ethylacetat gewonnen, auf eine Dünnschicht-Chromatographieplatte aufgetragen und in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (9:1) aufgetrennt. Mit den DC-Platten wurde ein Röntgenfilm 3 Tage lang exponiert. Die Auswertung des CAT-Tests erfolgte mit dem PhosphoImager. Über der Reproduktion des Autoradiogramms sind die spezifischen Aktivitäten in Picomol umgesetztem Substrat pro Mikrogramm eingesetztem Protein und Stunde Reaktionsdauer angegeben, aus denen die Induktionsfaktoren und die Induzierbarkeit (in %, bezogen auf die Expression des -518/+63-Konstrukts) der Genkonstrukte berechnet wurden.

Tab. 5: Expression von deletierten Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten in TPA-behandelten HeLa-Zellen. Die mittlere relative TPA-Induzierbarkeit und die Standardabweichung (s) wurden aus n Werten berechnet. Der minimale und maximale Meßwert ist angegeben. Abb. 12 zeigt die grafische Darstellung der Daten.

	Konstrukt	Induzierbarkeit (%)	s (%)	max. Wert (%)	min Wert (%)	Anzahl Werte (n)
I	-518/+63 CAT5	100	-	-	-	18
	-300/+63 CAT5	138	±27	156	86	6
	-231/+63 CAT5	98	±13	111	82	4
	-207/+63 CAT5	137	±23	159	114	4
	-193/+63 CAT5	103	±19	127	87	4
	-182/+63 CAT5	128	±19	156	109	5
	-171/+63 CAT5	90	±44	164	39	10
II	-161/+63 CAT5	41	±8	55	34	8
	-151/+63 CAT5	46	±8	59	38	6
	-140/+63 CAT5	37	±12	53	26	4
III	-127/+63 CAT5	11	±3	15	7	5
	-107/+63 CAT5	23	±4	30	21	8
	-91/+63 CAT5	5	±1	6	3	8
	-74/+63 CAT5	3	±1	4	2	9
IV	-66/+63 CAT5	0.4	±0.2	0.6	0.2	4

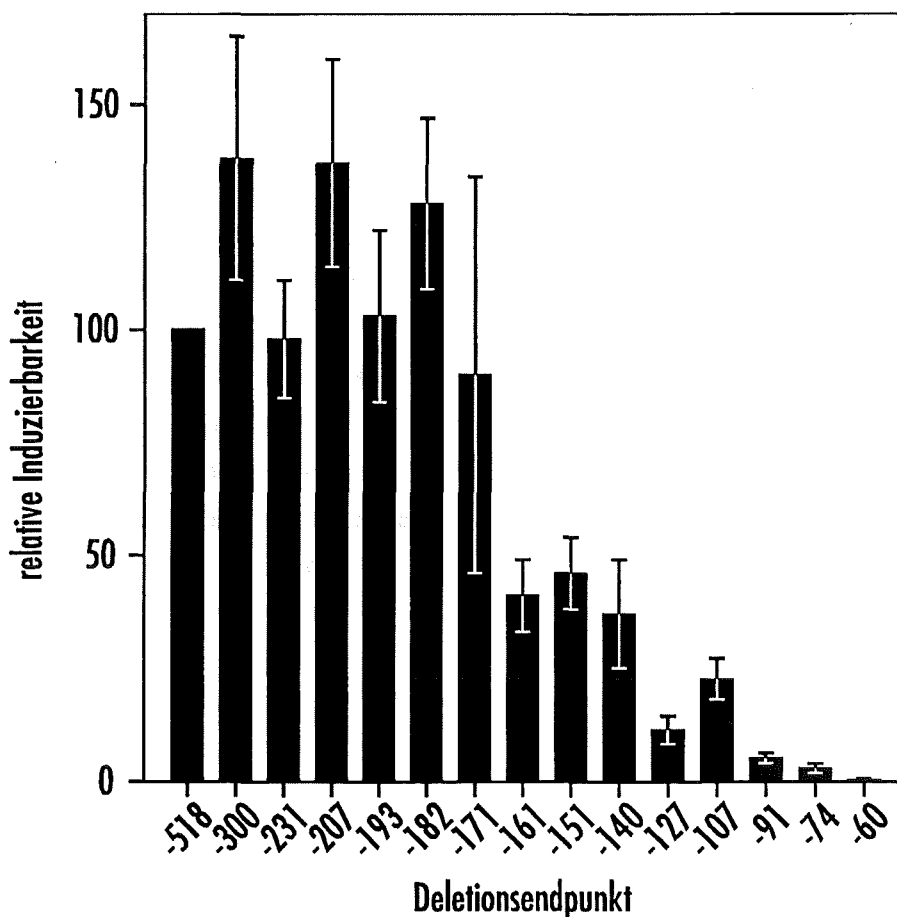


Abb. 12: Mittlere relative TPA-Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten in Prozent der TPA-Induzierbarkeit von -518/+63 CAT5.

wobei der letztgenannte Faktor einen größeren Beitrag zur TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors leistet. Denkbar ist auch, daß der -182/-171-bindende Faktor selbst keine transaktivierende Funktion hat, sondern die Bindung oder Funktion des -171/-161-bindenden Faktors unterstützt. Schließlich könnte beim -171/+63 CAT5-Konstrukt die Bindestelle eines zur TPA-Induktion beitragenden Proteins durch die Deletion einiger weniger 5'-flankierenden Sequenzen etwas beschädigt sein, so daß der aktivierende Faktor mit einer reduzierten Affinität an dieses Konstrukt bindet.

(2.) *Promotoren mittlerer Länge* (-161 bis -140) sind nur halb so gut induzierbar, wie die langen Kollagenasepromotoren. In diesem Abschnitt liegen keine für die TPA-Induktion relevanten Sequenzen, d.h. die UEF2-Homologie (-151_CAAATAATATG_-141) trägt im Kollagenasepromotor nicht zur TPA-Induzierbarkeit bei. Dagegen sind die Basenpaare zwischen den Deletionsendpunkten -140 und -127 für die TPA-Induktion wichtig. Die Deletion dieser Region, die Ähnlichkeit mit der Erkennungssequenz für den Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4 (Arndt u. Fink, 1986) aufweist, verringert die TPA-Induzierbarkeit um nahezu 30 %.

(3.) Die *kurzen Promotorkonstrukte* (-127 bis -74) zeigen nur noch 11% bis 3% der TPA-Reaktivität des längsten Konstrukts. Eine Ausnahme ist die etwas höhere TPA-Induzierbarkeit des -107/+63 CAT5-Konstrukts. Möglicherweise benötigt der an die PEA3-Stelle (-91/-83) bindende Faktor, ein Protein der Ets-Familie von Transkriptionsaktivatoren, neben der Kernsequenz zusätzliche flankierende Basenpaare, um effektiv mit der DNA interagieren zu können. Das würde auch die nur geringfügig höhere Induzierbarkeit von -91/+63 CAT5 gegenüber -74/+63 CAT5 erklären. Sollte das der Fall sein, dann müßte in der -127/-107-Region ein negativ regulierendes Element vorkommen, für das es zur Zeit keine weiteren Hinweise gibt.

(4.) Nach der Deletion der TRE-Sequenz reagiert der Restpromotor nicht mehr auf TPA.

Mit Hilfe der Deletionen wurden also zwei Bereiche gefunden, die die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors in konkreten Schritten beträchtlich steigern: Es sind die Regionen zwischen den Deletionsendpunkten -182 und -161 und zwischen -140 und -127. Um die funktionellen Sequenzen genau bestimmen zu können, wurden diese Regionen in den längsten Kollagenasepromotor-Fragmenten (-518/+63, -300/+63 und -517/-42) gezielt punktmutiert. Die interne Mutation von wenigen Basenpaaren hat den Vorteil, daß die Konformation des Promotors weniger gestört wird, als bei Deletionsmutanten. Flankierende Sequenzen, sowie der richtige Abstand der funktionellen Stellen zueinander, bleiben erhalten, was bei der Deletion eines mehr oder weniger großen Promotorabschnitts nicht der Fall ist. Beeinflußt die vorgenommene Basensubstitution die Promotoraktivität, so kann man davon ausgehen, daß die Störung der Promotoraktivität auf den Verlust der DNA-Bindung eines aktivierenden, reprimierenden oder stabilisierenden Proteins zurückzuführen ist.

2.4 Mutation von internen Sequenzen im Kollagenasepromotor mit der PCR-Technik

Um die charakterisierten Regionen im Kontext des Gesamtpromotors zu mutieren, wurden doppelsträngige, 30 bp lange Oligonukleotide synthetisiert, deren äußere Bereiche zu den Kollagenasepromotor-Sequenzen homolog sind und deren zentrale Region der neuen Sequenz entspricht (Material 4.7.3). Das TRE (m74) wurde nach Risse et al. (1989), die PEA3-Bindestelle (m88) nach Gutman und Wasyluk (1990) verändert. In das NIP(I)-Motiv (m223) wurde die Mutation in diejenige Region eingeführt, die zwischen dem Interleukin 3-, dem Stromelysin- und dem Kollagenasepromotor am besten konserviert ist und die im IL 3-Promotor durch Proteine besetzt ist (Mathey-Prevot et al., 1990). Die Basenaustausche in der UEF2-homologen Sequenz (m148) wurden nach Nerlov et al. (1992) vorgenommen. Die übrigen Stellen wurden nach den *in vivo footprint*-Daten von Harald König mutiert (Abb. 47). Damit die mutierten Klone leicht vom Wildtyp zu unterscheiden sind, wurden die betreffenden Regionen in Restriktionsschnittstellen, meist *Afl*3, umgewandelt. Für diese Klonierung sind zwei PCR-Syntheseschritte notwendig (Methoden 5.4.2 und Abb. 13).

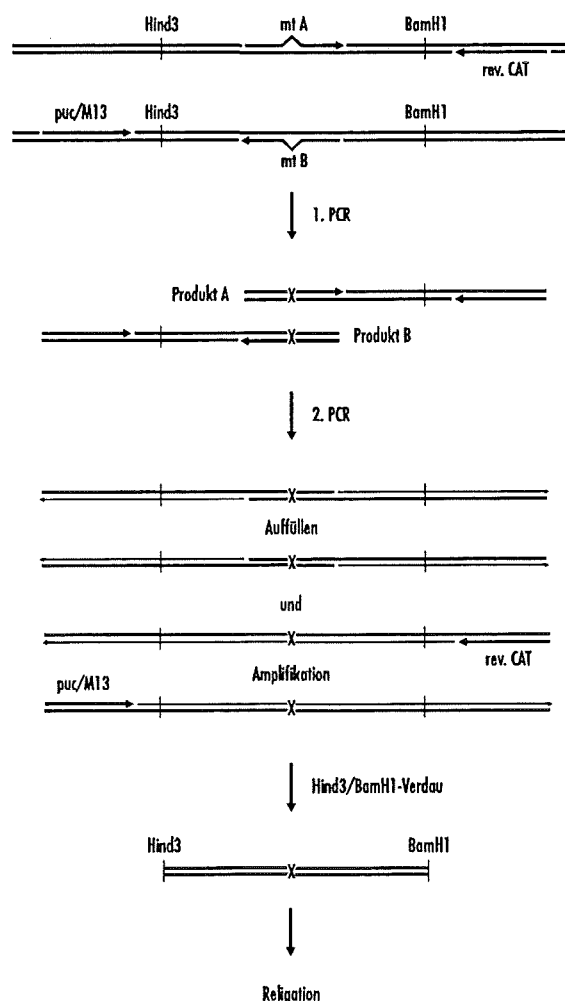


Abb. 13:
Einführung einer spezifischen Punktmutation in den Kollagenasepromotor mit der PCR-Technik. Das innere Primerpaar mt A und mt B entspricht, bis auf die auszutauschenden, zentralen Nukleotide, der Kollagenasepromotor-Sequenz. Die äußeren Primer hybridisieren mit Vektor- oder Reportergensequenzen. Als Matrize dient -518/+63 CAT5, -300/+63 CAT5 oder -518/-42 tk CAT4 Plasmid-DNA. Die erste PCR wird mit dem inneren Primer mt A und dem rev.CAT-Primer durchgeführt (ergibt das Produkt A) und in einem anderen Reaktionsansatz mit dem inneren Primer mt B und dem puc/M13-Primer, wobei das Produkt B synthetisiert wird. Wenige Nanogramm der Produkte A und B werden in einer zweiten PCR mit den äußeren Primern puc/M13 und rev.CAT zu dem kompletten Kollagenasefragment hybridisiert, polymerisiert und amplifiziert.

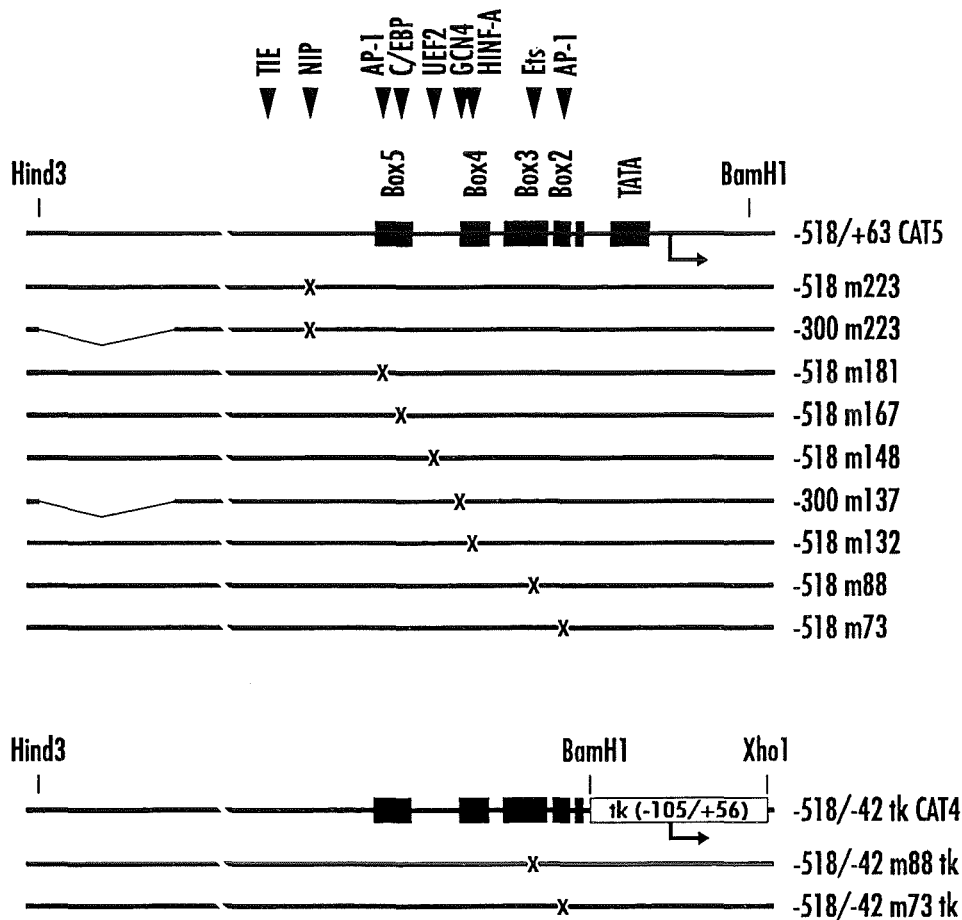


Abb. 14: Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukte mit internen Mutationen spezifischer Sequenzen (x). Homologien zu Transkriptionsfaktor-Bindestellen (▼) und *in vitro* durch Proteine besetzte Bereiche (Box 2 - 5) sind gekennzeichnet.

In der ersten PCR wurde die Mutation in den oberen bzw. in den unteren Strang des Kollagenasepromotor-Fragments -518/+63, -300/+63 oder -517/-42 eingeführt. In der zweiten PCR wurden beide Stränge miteinander hybridisiert, die überhängenden Enden aufgefüllt und das punktmutierte Fragment amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die *Hind3*- und *BamH1*-Schnittstellen in die Ausgangsvektoren (pBL CAT5 oder pBL CAT4) kloniert. Die Kollagenasesequenzen der neuen Konstrukte wurden durch Sequenzierung mit dem puc/M13-Primer und dem reversen CAT-Primer überprüft. Abgesehen von den eingeführten Mutationen waren die Promotorregionen unverändert. In Abbildung 14 sind die internen Mutanten des Kollagenasepromotors schematisch dargestellt. Abbildung 15 gibt die genaue Sequenz der internen Mutationen wieder. Die Bezeichnung der Konstrukte erfolgte nach der Position des ersten veränderten 5'-Basenpaars. So bedeutet zum Beispiel die Kurzbezeichnung "-518 m223", daß im Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt -518/+63 CAT5 die Basenpaare -223 bis -218 substituiert wurden. Für jedes neue Konstrukt wurde die Plasmid-DNA zweier unabhängiger Klone präpariert, sequenziert und im CAT-Test analysiert.

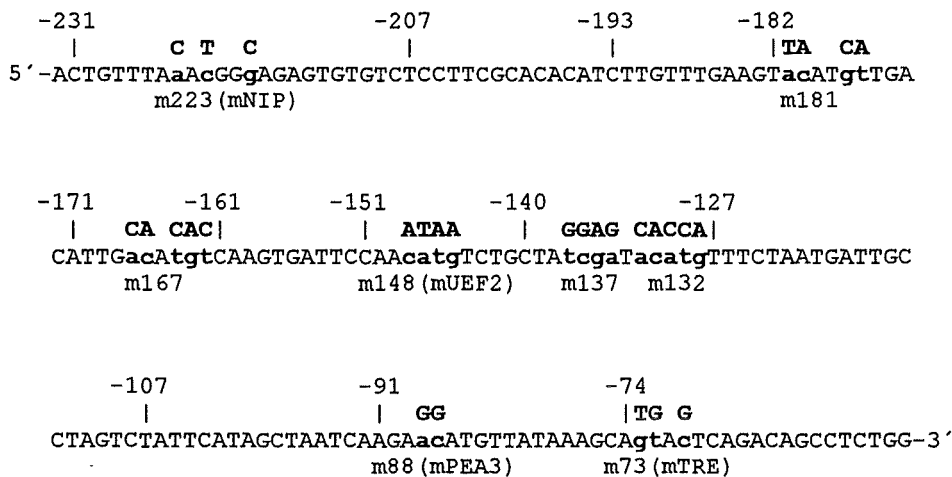


Abb. 15: Interne Mutationen im Kollagenasepromotor. Die Wildtyp-Sequenz ist in großen Buchstaben, die Basensubstitutionen sind in kleinen Buchstaben gedruckt.

2.5 Identifikation der Promotorsequenzen, die für die maximale TPA-Induktion der Kollagenase notwendig sind

HeLa tk⁻ Zellen wurden mit den intern mutierten Genkonstrukten transfiziert und mit 60 ng/ml TPA behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen aufgebrochen, das Gesamtprotein präpariert und die Proteinkonzentration bestimmt. 200 µg Protein aus transfizierten, aber nicht TPA-behandelten Kontrollzellen und 20 µg Protein aus TPA-induzierten Zellen wurden im CAT-Enzymtest analysiert. Die Menge an umgesetztem Substrat entspricht der spezifischen CAT-Aktivität und ist ein Maß für die Aktivität des punktmutierten Kollagenasepromotors. Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung 16 gezeigt.

In Tabelle 6 und Abbildung 17 wurden für jedes punktmutierte Konstrukt die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei bis sieben unabhängigen Experimenten zusammengestellt. Danach kann man erkennen:

(1.) Die selektive Mutation der *NIP-ähnlichen Sequenz* (Mathey-Prevot et al., 1990) beeinträchtigt die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors nicht. Es ist dabei unerheblich, ob die Punktmutation in das -518/+63-Promotorfragment (-518 m223) oder in das kürzere Fragment -300/+63 (-300 m223) eingeführt wurde, dem auch das weiter 5' liegende NIP(II)-Motiv fehlt. Ebenso wenig ist die Integrität des *UEF2-Motivs* für die TPA-Induktion kritisch (-518 m148). Diese Resultate bestätigen die mit den Deletionsmutanten gewonnenen Daten, die ebenfalls nach der Deletion der entsprechenden DNA-Sequenzen keine Reduktion der TPA-Induzierbarkeit zeigten. Im Unterschied zum Kollagenasepromotor trägt die NIP-ähnliche Sequenz zur TPA- bzw. Interleukin 1β-Induktion des Stromelysinpromotors in Fibroblasten (Sirum-Connolly u. Brinckerhoff,

1991) und die UEF2-Sequenz zur Phorbolster-Induktion des uPA-Promotors in HepG2-Zellen bei (Nerlov et al., 1992).

(2.) Punktmutationen in der *-182/-176-Sequenz* (-518 m181), die Ähnlichkeit mit einer AP-1-Bindestelle hat und homolog im Kaninchen-Kollagenase I-Promotor vorhanden ist (-186_TTAATCA_-180; Auble u. Brinckerhoff, 1991), reduzieren die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors um 40 % gegenüber dem intakten Promotor. Das ist konsistent mit der Beobachtung, daß die 5'-Deletion dieser Sequenz ebenfalls die TPA-induzierte Promotoraktivität verringert. Für den Kaninchen-Kollagenasepromotor⁴ wurde durch DNase I-*footprint* Analysen gezeigt, daß c-Jun-Homodimere ebenso wie c-Jun/c-Fos-Heterodimere *in vitro* an dieses distale AP-1-ähnliche Motiv binden können. Allerdings hatten Punktmutationen in diesem Element keinen Einfluß auf die TPA-Induzierbarkeit des Kaninchen-Kollagenasepromotors (Chamberlain et al., 1993).

(3.) Durch die selektive Mutation der *-167/-162-Region* (-518 m167) oder der *-137/-128-Sequenz* (-300 m137 und -518 m132) verliert der Kollagenasepromotor jeweils etwa 90 % seiner TPA-Reaktivität. Das ist mehr, als bei der 5'-Deletion der betreffenden Abschnitte beobachtet wurde. Der Befund bestätigt jedoch prinzipiell die mit den Deletionsmutanten gewonnenen Ergebnisse und unterstreicht die Wichtigkeit dieser Sequenzen für die volle TPA-Induzierbarkeit des Promotors.

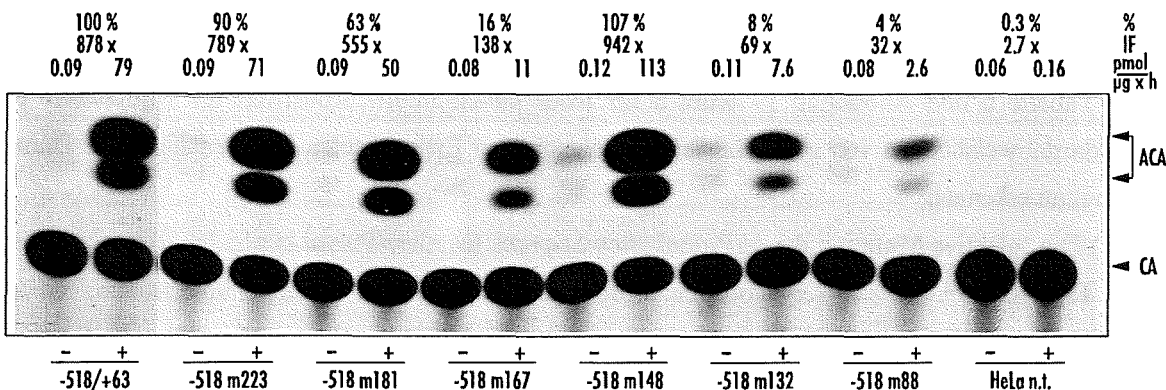


Abb. 16: Die TPA-Induzierbarkeit von internen Kollagenasepromotormutanten. HeLa tk⁻ Zellen wurden wie in Abb. 11 beschrieben mit 5 µg Kollagenase-CAT-Plasmid transient transfiziert. Die CAT-Aktivität wurde wie im Text und in Abb. 11 ausgeführt bestimmt. Das Autoradiogramm (Expositionszeit: 4 Tage) zeigt die chromatografische Auftrennung des nicht umgesetzten Substrats (CA) und der acetylierten Produkte (ACA). (-), unbehandelte Zellen; (+), 24 h mit 60 ng/ml TPA induzierte Zellen; HeLa n.t., Proteinextrakt aus nicht transfizierten Zellen

⁴ Die Promotorregionen des menschlichen Kollagenase I-Gens (Pos. -182 bis -1) und die des Kaninchen-Kollagenase I-Gens (Pos. -186 bis -1) sind zu 79 % identisch (Chamberlain et al., 1993; diese Arbeit Abb. 46).

Tab. 6: Expression von internen Kollagenasepromotor-Mutanten in TPA-behandelten HeLa-Zellen. Der Mittelwert der relativen TPA-Induzierbarkeit und die Standardabweichung (s) wurden aus n Werten berechnet, wobei die TPA-Induzierbarkeit der Punktmutanten und des -300/+63 CAT5-Konstrukts auf die Induzierbarkeit des längsten unversehrten Genkonstrukts (TPA-Induktion von -518/+63 CAT5 = 100 %) bezogen wurde. Der minimale und maximale Meßwert ist angegeben. Abb. 17 zeigt die grafische Darstellung der Daten.

Konstrukt	Induzierbarkeit (%)	s (%)	max. Wert (%)	min Wert (%)	Werte (n)
-518/+63 CAT5	100	-	-	-	14
-300/+63 CAT5	138	± 27	156	86	6
-518 m223	99	± 9	114	90	6
-300 m223	95	± 28	135	71	4
-518 m181	61	± 2	62	59	3
-518 m167	11	± 3	15	9	3
-518 m148	98	± 17	110	87	2
-300 m137	12	± 3	14	10	2
-518 m132	9	± 4	17	5	7
-518 m88	3	± 1	5	2	7
-518 m73	0.6	± 0.4	0.8	0.3	5
HeLa n.t.	0.4	± 0.3	0.8	0.3	4

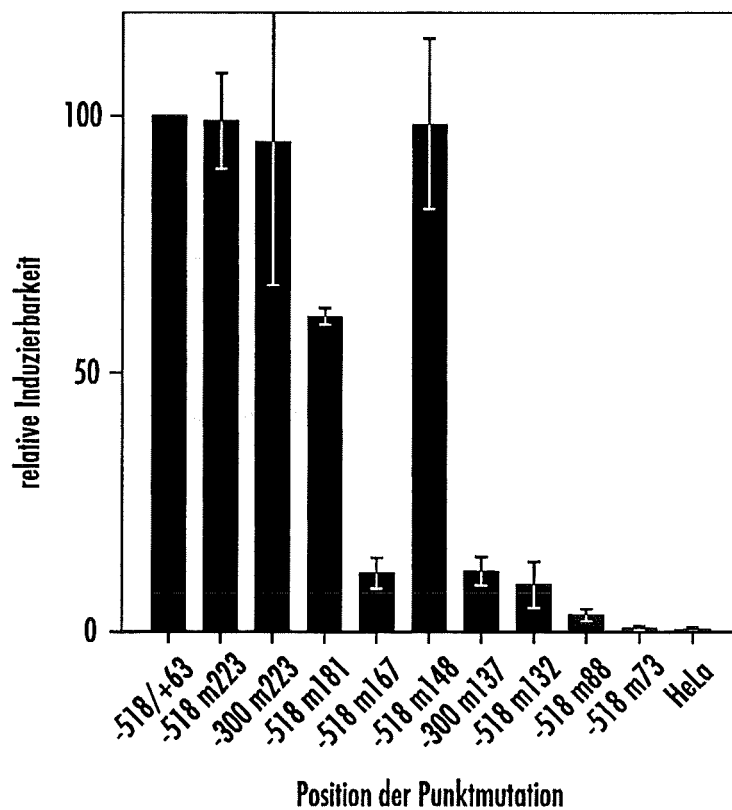


Abb. 17: Mittlere relative TPA-Induzierbarkeit von langen Kollagenasepromotor-Fragmenten mit internen Mutationen im Vergleich zur Induzierbarkeit des intakten Promotors -517/+63.

Mit den internen Mutanten konnten somit die für die Aktivierbarkeit funktionellen Sequenzen auf 10 Basenpaare genau lokalisiert werden. Aufgrund der beschreibenden Sequenzhomologien, könnten an das -171/-163-Motiv ein C/EBP-ähnlicher Faktor und an das -137/-128-Element ein mit GCN4 oder AP-1 verwandter Faktor binden. In guter Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten berichtet Chamberlain et al. (1993), daß die interne Deletion der -182/-162-Region im Kaninchen-Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt "pCCAT380" die TPA-Induzierbarkeit um 75 % reduziert, während die interne Deletion der -161/-141-Region ohne Effekt ist⁵.

(4.) Die interne Mutation der PEA3-Sequenz im Kontext des Gesamtpromotors (-518 m88) hat einen drastischen Verlust der TPA-Induzierbarkeit zur Folge. Die Restaktivität des Konstrukts -518/+63 m88 CAT5 beträgt nur noch 3 % der Induzierbarkeit des nicht mutierten Promotors. Also ist die Ets Bindestelle in ihrer natürlichen Umgebung im Kollagenasepromotor funktionell und für die TPA-Induktion absolut erforderlich.

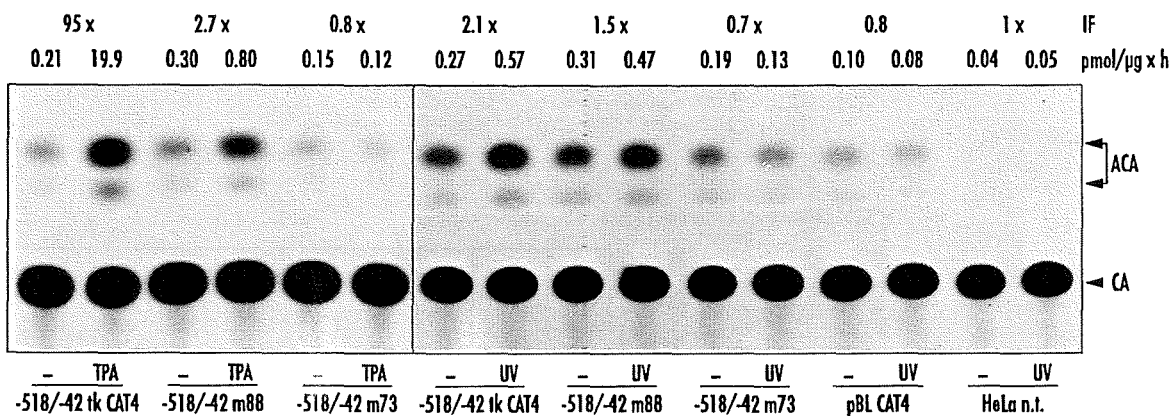


Abb. 18: Die selektive Mutation der Ets Bindestelle hat einen größeren Einfluß auf die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors als auf die UV-Induzierbarkeit. HeLa tk⁻ Zellen wurden mit jeweils 5 µg -518/-42 tk CAT4 (intakter Kollagenasepromotor), -518/-42 m88 (Mutation der PEA3-Sequenz), -518/-42 m73 (Mutation der TRE-Sequenz) und pBL CAT4 (Vektor ohne Kollagenasesequenzen) nach der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert. Nach einer 18-stündigen Erholungsphase wurden die Zellen mit Phorboläster behandelt (TPA, 60 ng/ml) oder mit ultravioletter Strahlung (UVC, 256 nm, 40 J/m²) bestrahlt. 20 h (TPA) bzw. 30 h (UV) später wurden die Zellen aufgebrochen, die Gesamtproteinfraktion präpariert und auf die CAT-Expression analysiert. Im TPA-Experiment wurden 100 µg Proteinextrakt (bzw. 10 µg Proteinextrakt aus den -518/-42 tk CAT4-transfizierten, TPA-induzierten Zellen) 2 h lang mit 2 µl ¹⁴C-Chloramphenicol (3700 pmol/µl) inkubiert. Die Abbildung zeigt ein 48 h lang exponiertes Autoradiogramm. Die Bedingungen für das UV-Experiment waren: 200 µg Proteinextrakt, 3 h-Reaktion, 2 µl ¹⁴C-Chloramphenicol. Das Autoradiogramm wurde 24 h lang exponiert. Das Ergebnis konnte in einem zweiten Experiment bestätigt werden. IF, Induktionsfaktor; n.t., nicht transfizierte Zellen.

⁵ Die Kaninchen-Kollagenasepromotor-Regionen -182/-162 bzw. -161/-141 entsprechen den Regionen -178/-158 bzw. -158/-137 im menschlichen Kollagenasepromotor. Die Sequenzen stimmen auffallend gut überein. Das -137/-128-Element der menschlichen Kollagenase ist im homologen Kaninchengen ebenfalls konserviert erhalten (vgl. Diskussion, Abb. 46).

Ultraviolette Strahlung (UVC, 40 J/m²) induziert in HeLa tk⁻ Zellen die Expression des Kollagenasegens und transient transfizierter Kollagenasegen-CAT-Konstrukte, wie dem -518/+63 CAT5 oder -518/-42 tk CAT4, mit deutlich geringerer Potenz, als Phorbol ester. Mediatoren der UVC-Induktion sind das Kollagenase-TRE und die daran bindenden, AP-1-ähnlichen Faktoren (Stein et al., 1989; Abb. 39). Die geringere Induktionskapazität von UV-Strahlung könnte daran liegen, daß Faktoren, die die TPA-Induktion unterstützen, durch UVC nicht aktiviert werden. Um festzustellen, welchen Einfluß die interne Mutation der PEA3-Bindestelle (die am effektivsten die TPA-Induzierbarkeit reduziert) auf die UV-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors hat, wurde die oben beschriebene Mutation in ein -518/-42 tk CAT-Konstrukt eingeführt. Der *Herpes simplex* Thymidinkinase (tk)-Promotor (-105/+56) erhöht die basale Aktivität dieses Genkonstrukts, was sinnvoll für die Untersuchung schwacher Induktionswirkungen ist, wird aber nicht durch TPA oder UVC stimuliert (McKnight et al., 1981; Angel et al., 1987; diese Arbeit). Wie in Abb. 18 gezeigt wird, scheint der Transkriptionsfaktor Ets für die *UV-Induktion* eines -518/-42 tk CAT4-Konstrukts weniger wichtig zu sein. Ein Konstrukt mit einer selektiv mutierten PEA3-Sequenz (-518/-42 m88) ist, verglichen mit dem Wildtyp-Konstrukt, immer noch zu 70 % induzierbar. Die TPA-Induzierbarkeit dieses Genkonstrukts ist, in Übereinstimmung mit den oben gezeigten Ergebnissen, um 97 % beeinträchtigt.

(5.) Nach der selektiven Mutation des TRE (-518/+63 m73; -518/-42 tk m73 CAT4) ist der Kollagenasepromotor durch Phorbol ester oder UV nicht mehr aktivierbar. Die TRE-ähnlichen Sequenzen in der distalen Region des Kollagenasepromotors (IMS4, IMS2) können also nicht das TRE ersetzen. Die Funktion von AP-1 kann ebenso wenig durch die SP1- und CTF-Transkriptionsfaktoren (McKnight et al., 1984; McKnight u. Tjian, 1986) übernommen werden, die konstitutiv die Expression des tk-Promotors erlauben (-518/-42 m73 tk CAT4, Abb. 18).

2.6 Zusammenfassung

Wie gezeigt werden konnte, sind für die maximale TPA-Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten, neben dem TRE (-73/-67), das PEA3-Motiv (-91/-83), die -137/-128-Region (IMS2, die Induzierbarkeit maximierende Sequenz 2), die -171/-163-Sequenz (IMS3) und die -182/-176-Basenpaare (IMS4) notwendig (Tab. 5, 6). Die an diese Sequenzen bindenden Faktoren (IMF, die Induzierbarkeit maximierende Faktoren; Abb. 19) haben keinen signifikanten Einfluss auf die sehr geringe, basale Aktivität des Kollagenasepromotors (Abb. 11, 16). Es ist anzunehmen, daß durch die TPA-Behandlung der HeLa-Zellen aktivierende Transkriptionsfaktoren neu synthetisiert oder posttranslational modifiziert werden, die an IM-Sequenzen des Kollagenasepromotors binden.

Der Ets-Transkriptionsfaktor und die IMF sind für die volle TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors absolut erforderlich, da ein Promotor, der ausschließlich das TRE als Enhancerelement enthält, nur geringfügig durch Phorbol ester aktivierbar ist. Ets und die IMF

scheinen kooperativ miteinander und mit AP-1 zu agieren, da die selektive Zerstörung der Bindestelle eines Faktors beim vollständigen Erhalt der Integrität der anderen Motive die TPA-Induzierbarkeit sehr viel mehr beeinträchtigt, als bei einer additiven Wirkung zu erwarten wäre. Weiterhin sind die IMF ohne TRE-gebundenes AP-1 nicht in der Lage, die Transkription zu initiieren. Ob die IMF ebenfalls für die Proteinsynthese-Abhängigkeit der Kollagenase-Induktion verantwortlich sind, wird im nächsten Kapitel untersucht.

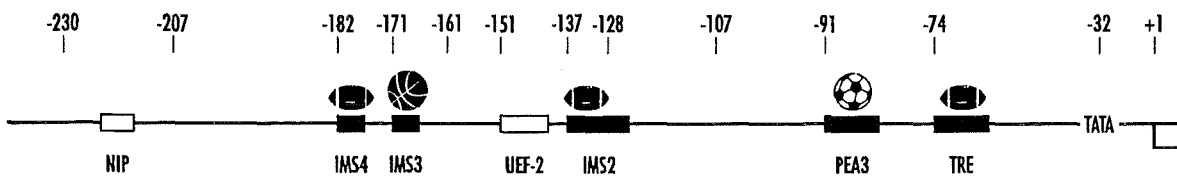


Abb. 19: Die TPA-Induzierbarkeit maximierenden Sequenzen (IMS) im Kollagenasepromotor. IMS4 (-182/-176) und IMS2 (-137/-128) sind möglicherweise Erkennungssequenzen für AP-1-ähnliche Transkriptionsfaktoren (●). An die IMS3-Sequenz (-171/-163) könnte ein Transkriptionsfaktor der C/EBP-Familie binden (●). Der Transkriptionsfaktor Ets (⊕) bindet an das PEA3-Motiv (-91/-83). AP-1 (c-Jun/c-Fos) bindet an das TRE-Motiv (-73/-67). Die Homologien zur NIP- (-223/-209) und UEF-2-Bindestelle (-151/-141) tragen nicht zur TPA-Induzierbarkeit bei.

Teil 2:
Die Hemmbarkeit der TPA-induzierten Transkription
langer Kollagenasepromotor-Konstrukte durch Anisomycin

2.7 Methodischer Prolog: Nachweis der mRNA mit der Ribonukleaseschutz-Methode

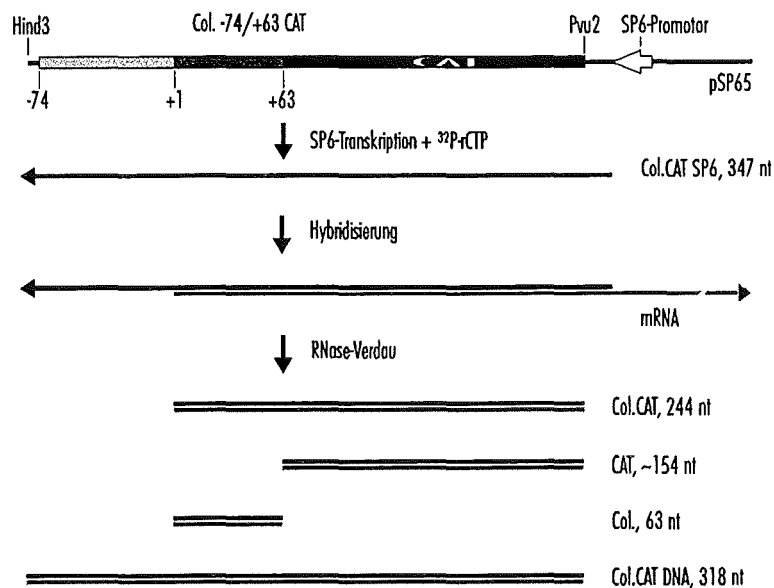
In der Einleitung wurde dargelegt, daß das Kollagenase I-Gen eines der wenigen bisher untersuchten Gene ist, dessen Phorbol-ester-induzierte Expression nahezu vollständig von Proteinneusynthese abhängt. Um den Mechanismus zu identifizieren, der für die Hemmbarkeit der TPA-Induktion des Kollagenasegens durch Proteinsynthese-Inhibitoren verantwortlich ist, wurden HeLa tk⁻ Zellen mit Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten transient transfiziert und mit dem Induktor in Gegenwart oder Abwesenheit eines Proteinsynthese-Inhibitors behandelt. Da die Bestimmung der CAT-Aktivität bei gehemmter Proteinsynthese nicht möglich ist, wurde die RNA aus den transfizierten Zellen isoliert und mit einer einzelsträngigen, in Gegenrichtung komplementären RNA-Probe (Riboprobe, *antisense* RNA) nach Art und Menge analysiert.

In dieser Arbeit wurde zum Nachweis der spezifischen mRNA die Ribonukleaseschutz-Analyse (*RNase protection assay*; Melton et al., 1984; Gilman, 1987) benutzt. Hierzu wurde das linearisierte Plasmid Col.CAT SP6⁶ als Matrize verwendet, durch eine *in vitro* Transkriptionsreaktion Kollagenase-CAT-spezifische, radioaktiv markierte *antisense* RNA (Riboprobe) hergestellt und mit 30 bis 50 µg zellulärer RNA hybridisiert. Im anschließenden Ribonuklease-Verdau wurde die einzelsträngige RNA abgebaut. Spezifische, doppelsträngige Hybridmoleküle sind gegenüber RNasen resistent und konnten auf einem Sequenziergel der Größe nach aufgetrennt werden: Die Riboprobe hat eine Größe von 347 nt, korrekt initiierte Kollagenase-CAT-mRNA hybridisiert mit der Riboprobe über eine Länge von 244 nt und vom Transkript des endogenen Kollagenase-Gens werden 63 nt vor dem RNase-Abbau geschützt. (Abb. 20; Auer et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit werden die fototechnischen Reproduktionen von Autoradiogrammen gezeigt, die durch Kontaktbelichtung von Röntgenfilmen mit dem getrockneten Sequenziergel entstanden sind. Die Lage der gelgetrennten, radioaktiven Banden gibt die Spezifität (die Art bzw. die Herkunft) der mRNA an. Die Schwärzung der diskreten Banden ist direkt proportional zu der Menge spezifischer mRNA zum Zeitpunkt der RNA-Präparation. Mit der verwendeten Nachweismethode werden also akkumulierte mRNA-Mengen und keine Transkriptionsaktivitäten gemessen.

⁶ Col.CAT SP6 enthält ein 330 bp großes Hind3/Pvu2-Fragment von -73/+63 CAT3 (Angel et al., 1987 a) in umgekehrter Orientierung, das von einem SP6-Bakteriophagen-Promotor aus transkribiert wird (Auer et al., 1994).

Abb. 20:**Nachweis von mRNA mit der Ribonukleaseschutz-Methode.**

Die Riboprobe Col.CAT SP6 schützt 244 Nukleotide (nt) der Kollagenase-CAT-mRNA (Col. CAT) und 63 nt der mRNA des endogenen Kollagenasegens. CAT-mRNA ist, abhängig vom Transkriptionsstart, mit der SP6-Probe über eine Länge von etwa 154 Nukleotiden homolog (CAT) und Kollagenase-CAT-Plasmid-DNA (Col. CAT DNA) hybridisiert mit 318 nt der Probe. Weitere Erklärung im Text.



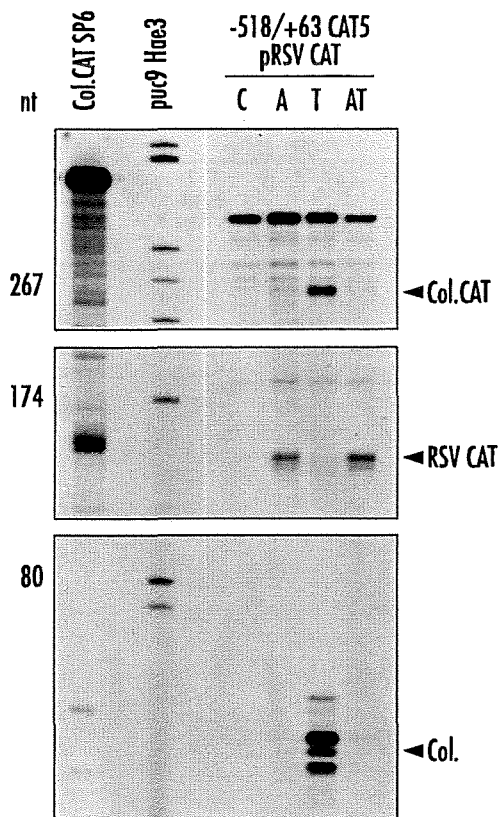
Verglichen mit dem RNase-Schutz-Nachweis ist die gebräuchlichere *Northern blot*-Methode nicht empfindlich genug, um die teilweise sehr geringen Mengen konstruktsspezifischer mRNA nachzuweisen, da viele der hier verwendeten Konstrukte schwach exprimiert werden und bei der transienten Transfektion nur 0.5 - 5 % der HeLa-Zellen das Plasmid aufnehmen und exprimieren (A. Kolbus, 1993). Die Ribonukleaseschutz-Methode hat zudem weitere Vorteile: Die erhaltenen Signale sind anhand der berechneten Hybridgrößen eindeutig zuzuordnen und das Verhalten des endogenen Gens kann mit dem des rekombinanten Gens im gleichen Experiment verglichen werden.

Wenn die spezifischen mRNA-Mengen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ analysiert werden sollen, muß man die spezifischen Signale auf eine im Experiment konstante Größe beziehen. Bei der *Northern blot*-Methode weist man gewöhnlich die mRNA-Menge eines Gens nach, das konstant aktiv ist und dessen Transkriptionsrate durch die verschiedenen Behandlungen nicht verändert wird (z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase oder Actin). So können Meßungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung der RNA und Verluste bei der Nachweisprozedur rechnerisch ausgeglichen werden. Bei der Analyse transient transfizierter Konstrukte tritt ein weiteres Problem auf: Wie sich zeigte, ist aus ungeklärten Gründen die Transfektionseffizienz, oftmals sogar innerhalb des gleichen Experiments, nicht konstant, auch wenn z.B. vier Zellkulturschalen mit der gleichen Transfektionsmischung transfiziert wurden. Um ein konstantes Referenzsignal zu erhalten, wurden das Plasmid pRSV CAT (Gorman et al., 1982) und ein α -Globin-Gen exprimierendes Plasmid (Gilman, 1988), von denen bekannt ist, daß sie nicht TPA-induzierbar sind, mit den Kollagenasepromotor-Konstrukten cotransfiziert. Es stellte sich jedoch heraus, daß der RSV-Promotor (Abb. 21) und der α -Globinpromotor (Abb. 36) durch Anisomycin aktiviert wurden und damit als interne Kontrollen unbrauchbar waren. Da außerdem die Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA sehr stark von der Qualität der Plasmidpräparation abhängt, kann auch bei Cotransfektionsexperimenten das eine Plasmid selektiv besser von den Zellen

aufgenommen werden, als das andere. Darum sollten idealerweise das konstant exprimierte Gen und der zu untersuchende Promotor auf dem gleichen Plasmid lokalisiert sein. Ein in dieser Hinsicht geeignetes Reporter-gen stand nicht zur Verfügung und hätte zudem den Nachteil, daß hierbei die Möglichkeit einer gegenseitigen Beeinflussung der die beiden Gene kontrollierenden Promotoren nicht auszuschließen ist.

Abb. 21:

Das cotransfizierte Plasmid pRSV CAT ist durch Anisomycin induzierbar und daher als interne Kontrolle für gleiche Transfektionseffizienzen unbrauchbar. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden mit 25 µg -518/+63 CAT5 und 2.5 µg pRSV CAT nach der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert und 22 h in DMEM, supplementiert mit 0.5% FCS gehungert. Danach wurden die Zellen für 6 h mit 60 ng/ml TPA (T), 10 µg/ml Anisomycin (A) und mit Anisomycin + TPA (AT) behandelt. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA präpariert und 40 µg mit 500.000 cpm Col.CAT SP6-Probe hybridisiert. Die Hybride wurden mit 1.75 µg RNaseA und 220 Enzymeinheiten RNaseT1 verdaut und die geschützten Fragmente auf einem 8%-igen Sequenziergel aufgetrennt. Von der Riboprobe wurden 2.500 cpm, von dem puc9 Hae3-Größenmarker 5.000 cpm aufgetragen. Die Zahlen links bezeichnen die Fragmentgrößen des Markers (nt, Nukleotide). Col.CAT, Transkripte des Kollagenasepromotor-Konstrukts (244 nt); CAT, RSV CAT-Transkripte (154 nt); Col., Transkripte des endogenen Kollagenasegens (63 nt). Auf das Induktionsverhalten des Kollagenasepromotor-Konstrukts wird in den nächsten Kapiteln eingegangen.



Abhilfe schuf die Methode, die Gesamt-RNA aus den transient transfizierten Zellen durch Ultrazentrifugation über einen Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten zu präparieren (siehe Methoden, 5.1.4). Die Salzeinwaage wurde so gewählt, daß die RNA sedimentierte, wogegen die genomische DNA im Überstand verblieb und verworfen wurde. Es zeigte sich, daß die transfizierte Plasmid-DNA zusammen mit der RNA sedimentiert und in der gleichen Präparation mit aufgereinigt wird. Abbildung 22 beweist, daß die transfizierte Plasmid-DNA mit der Col.CAT-Riboprobe hybridisiert und ein Fragment von 318 nt Länge vor dem RNase-Abbau schützt (Spur 3). Zwei weitere Aliquots der RNA-Präparation aus TPA-behandelten Zellen wurden vor der Hybridisierung mit RQ1-DNase behandelt (Spur 5), wodurch das Plasmidsignal verschwindet bzw. mit RQ1-DNase und RNaseA verdaut (Spur 6). Das Plasmid-DNA/Riboprobe-Hybrid kann direkt nachgewiesen

werden, indem anstelle von RNA eine geringe Menge Kollagenase-CAT-Plasmid (25 ng -74/+63 CAT5) mit der Riboprobe hybridisiert wird (Spur 7).

Der Nachweis der copräparierten Plasmid-DNA ist der bestmögliche *interne Standard für gleiche Transfektionseffizienzen*, um quantitative Aussagen über die Aktivität eines Kollagenasepromotor-Konstrukts machen zu können. Darüber hinaus dient die Plasmid-DNA-Bande, wie auch das Signal des endogenen Gens, als *Kontrolle für gleiche eingesetzte RNA-Mengen*. Mit der Expression der endogenen Kollagenase kann außerdem die Wirksamkeit der zur Induktion (TPA) und zur Proteinsynthese-Hemmung (Anisomycin, Puromycin) eingesetzten Substanzen kontrolliert werden.

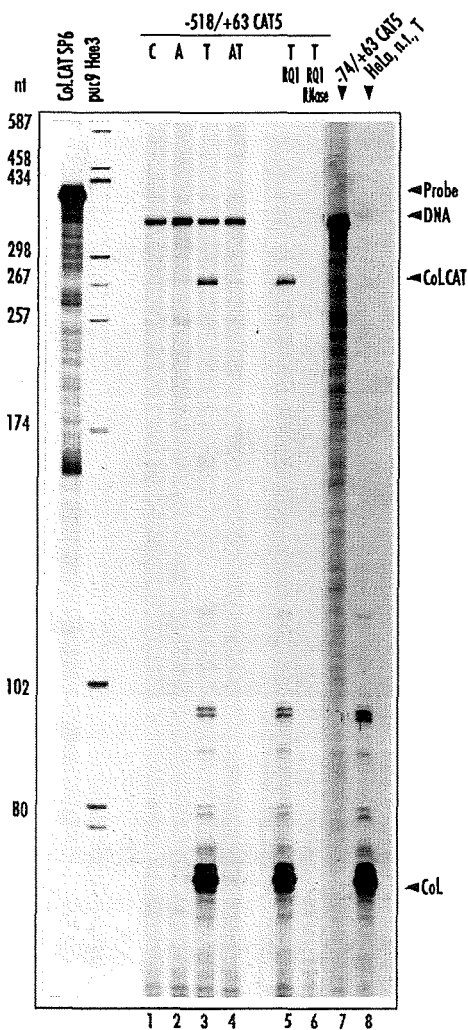


Abb. 22:

Transient transfizierte Kollagenase-CAT-DNA wird zusammen mit der zellulären Gesamt-RNA präpariert und hybridisiert mit der Col.CAT SP6-Probe über eine Länge von 318 nt. HeLa tk⁻ Zellen wurden mit 15 µg -518/+63 CAT5 transient transfiziert (DEAE-Dextran-Methode) und 18 h später mit 60 ng/ml TPA (T) in Gegenwart oder Abwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomycin (A, 10 µg/ml) induziert. Ein Kontrollansatz (C) wurde unbehandelt belassen. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA über einen CsCl-Stufengradienten präpariert. 20 µg RNA wurden mit 250.000 cpm Col.CAT SP6-Probe über Nacht bei 45 °C hybridisiert, mit 220 Enzymeinheiten RNaseT1 verdaut und auf einem 8%-igen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Von der in Spur 3 analysierten RNA wurden zwei weitere Aliquots vor der Hybridisierung mit 1 Einheit RQ1-DNase behandelt (15 min, 37 °C) und in Spur 5 aufgetragen, bzw. mit RQ1 und 10 µg RNaseA verdaut (15 min, 37 °C) und in Spur 6 aufgetrennt. In Spur 7 wurden 25 ng -73/+63 CAT5-DNA mit der Riboprobe hybridisiert. Spur 8 ist RNA aus nicht transfizierten (n.t.), für 6 h mit TPA behandelten HeLa tk⁻ Zellen. Weitere Abkürzungen siehe Abb. 23.

2.8 Lange Promotorkonstrukte werden wie das endogene Gen reguliert

Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden mit den Kollagenasepromotor-Konstrukten -1200/+63 CAT3, -518/+63 CAT5 und -74/+63 CAT5 transient transfiziert (siehe Methoden, 5.5.2) und anschließend 18 Stunden lang mit DMEM, 0.5% FCS, 1% PS im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 60 ng/ml TPA in Abwesenheit oder in Gegenwart von 10 µg/ml Anisomycin bzw. mit Anisomycin alleine behandelt. Anisomycin wurde 15 Minuten vor dem Phorbolster zugegeben und hemmt in der eingesetzten Konzentration die eukaryontische zelluläre Proteinsynthese vollständig (Edwards u. Mahadevan, 1992). Nach sechs Stunden bzw. 6 Stunden und 15 Minuten wurden die Zellen lysiert und die RNA mit der Cäsiumchlorid-Methode präpariert. 40 µg Gesamt-RNA wurden 14 Stunden lang bei 45 °C mit einem Überschuß radioaktiv markierter Col.CAT-*antisense*-RNA (250.000 cpm) hybridisiert, 45 Minuten lang bei 30 °C mit 230 Enzymeinheiten RNase T1 verdaut und dann in einem 8%-igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (siehe Methoden, 5.7.1). Mit dem Sequenziergel wurde ein Röntgenfilm 14 Stunden lang bei -80 °C belichtet. Abbildung 23 zeigt die fototechnische Reproduktion des Autoradiogramms. Aus dem Experiment kann man die folgenden Schlüsse ziehen:

(1.) In HeLa-Zellen werden die Konstrukte -1200/+63 CAT3 und -518/+63 CAT5 wie das endogene Gen reguliert: Das Kollagenasegen und die langen Kollagenasepromotor-Konstrukte sind durch TPA stark aktivierbar. Die TPA-induzierte Akkumulation von Kollagenase-CAT-spezifischem Transkript bzw. Kollagenase-mRNA ist nicht oder nur sehr geringfügig möglich, wenn die zelluläre Proteinsynthese durch Anisomycin blockiert wurde. Anisomycin selbst aktiviert weder das Kollagenasegen, noch die langen Kollagenasepromotor-Konstrukte. Die Deletion der distalen 700 bp (von -1200 auf -518) ändert das Verhalten des Promotors nicht. Es gibt also Kollagenasepromotor-Konstrukte, die in HeLa-Zellen wie das endogene Kollagenasegen proteinsyntheseabhängig induziert werden. Damit steht ein System zur Verfügung, um die Proteinsyntheseabhängigkeit der Kollagenaseexpression mit molekularbiologischen Methoden zu untersuchen.

(2.) Gänzlich anders ist die Situation bei dem -74/+63 CAT5-Konstrukt, das als Enhancer nur die AP-1-Bindestelle enthält. Die Verkürzung des Promotors von -518 auf -74 verringert drastisch die TPA-Induzierbarkeit (siehe Tab. 7, Induktionsfaktoren). Der -74/+63-Promotor ist im Gegensatz zu den langen Kollagenasepromotoren durch den Proteinsynthese-Hemmstoff Anisomycin sehr gut induzierbar und zwar erheblich stärker, als durch den Tumorpromotor selbst. Werden die Zellen mit TPA und Anisomycin zusammen behandelt, so wird über die Summe der Einzeleffekte hinaus CAT-mRNA akkumuliert, wie die densitometrische Messung der relativen Signalstärken zeigt (Tab. 7). *De novo* Proteinsynthese ist für die TPA-Aktivierbarkeit des Kollagenaseminimalpromotors also nicht notwendig und die Wirkung von TPA und Anisomycin zusammen ist mehr als additiv. In diesem Fall spricht man von einem "synergistischen Effekt" beider Induktoren oder von einer "Superinduktion".

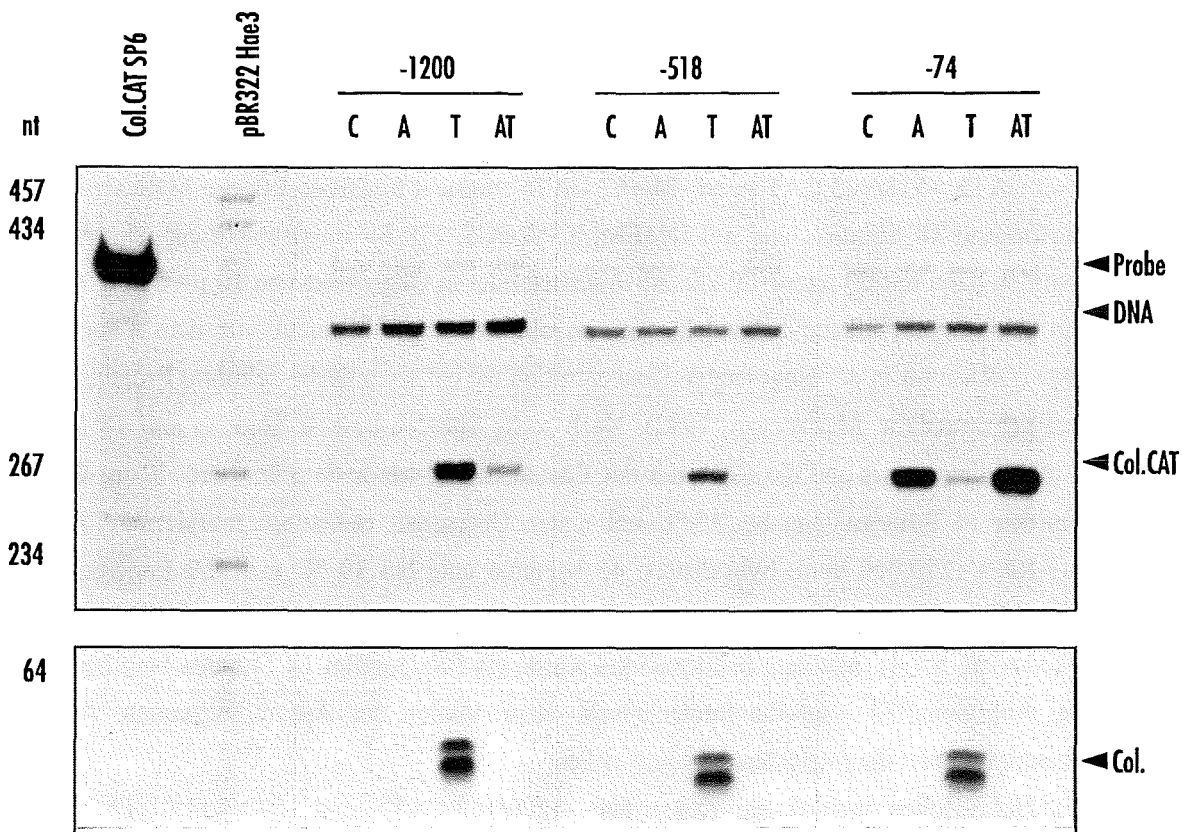


Abb. 23: Die Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukte -1200/+63 CAT3 und -518/+63 CAT5 werden in HeLa-Zellen wie das endogene Kollagenasegen reguliert, d.h. die TPA-induzierte Akkumulation des Transkripts ist bei inhibierter Proteinsynthese stark gehemmt. Dagegen wird ein TRE-abhängiger Minimalpromotor (-73/+63 CAT5) durch den Proteinsynthesehemmer selbst aktiviert und die TPA-induzierte Akkumulation -73/+63 CAT5-spezifischen Transkripts ist proteinsynthese-unabhängig. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden mit 15 µg Plasmid-DNA (in 0.5 µg/ml DEAE-Dextran, 1 x TBS) transient transfiziert und 18 Stunden lang mit DMEM, 0.5% FCS, 1% PS gehungert. Danach wurden die Zellen für 6 h und 15 min mit 10 µg/ml Anisomycin behandelt (A), 6 h lang mit 60 ng/ml TPA behandelt (T), mit Anisomycin und TPA (AT) behandelt oder nicht behandelt (C, Kontrolle). 40 µg der zellulären RNA wurden mit der Ribonukleaseschutz-Methode, wie im Methoden-Teil angegeben, analysiert. Die konstruktsspezifische mRNA (Col.CAT) und das Transkript des endogenen Kollagenasegens (Col.) werden über eine Länge von 244 nt bzw. 63 nt geschützt. Die 318 nt großen Fragmente zeigen die Menge copräparierter Plasmid-DNA (DNA) an und dienen als interner Standard für die Transfektionseffizienz. Von der 347 nt langen Riboprobe Col.CAT SP6 (Probe) wurden 4000 cpm aufgetragen. Als Größenmarker wurde *Hae3*-geschnittener und ³²P-endmarkierter pBR322-Vektor verwendet, von dem 2000 cpm aufgetragen wurden. Die Fragmentgrößen des Markers (nt, Nukleotide) sind links angegeben.

Der positive Effekt der Proteinsynthese-Hemmung auf die akkumulierten Transkriptmengen eines transient transfizierten -74/+63 CAT5-Konstrukts ist überraschend, denn lange Kollagenasepromotoren werden kaum durch Anisomycin aktiviert, obwohl, sie wie das -74/+63-Konstrukt, die AP-1-Bindestelle enthalten, die die Anisomycin-Induzierbarkeit vermittelt (siehe Ergebnisse, Teil 3). Die Anisomycin-bedingte, starke Akkumulation des -74/+63 CAT-spezifischen Transkripts kann nicht durch eine Stabilisierung der basal oder TPA-induziert akkumulierten CAT-Transkripte erklärt werden, wie es für die RNAs von *c-fos* und *c-jun* beschrieben wurde (Edwards

und Mahadevan, 1992). Würde Kollagenase-CAT-mRNA durch Anisomycin stabilisiert werden, indem z.B. eine labile RNase nicht nachsynthetisiert wird, so müßte die Stabilisierung auch die Transkripte der langen Promotorkonstrukte betreffen, da die transkribierten Bereiche identisch sind und die Konstrukte sich nur in der Länge des Promotorabschnitts unterscheiden. Wie an anderer Stelle gezeigt wird (Abb. 34), verlängert der Proteinsynthese-Hemmstoff tatsächlich nicht die Halbwertszeit von Kollagenase-CAT-mRNA. Anisomycin aktiviert folglich die Transkription eines -74/+63 CAT5-Konstrukts, aber nicht die eines langen Kollagenasepromotors. Die Genaktivierung durch Anisomycin wird im dritten Teil der Arbeit untersucht. Für diesen Abschnitt der Arbeit ist die Feststellung wichtig, daß der positive Einfluss von Anisomycin auf die Transkription kurzer Kollagenase-Promotorkonstrukte durch zusätzliche 5'-Sequenzen effizient gehemmt wird.

Tab. 7: Signalstärken der Banden des in Abb. 23 gezeigten Experiments. In (A.) sind die densitometrisch gemessenen Signalstärken, d.h. die relative Intensität der Banden aufgeführt. In (B.) wurden die Signalstärken nach der Plasmid-Bande (DNA) korrigiert. Für dieses und alle weiteren Experimente gilt, daß die Korrekturen nur innerhalb eines Genkonstrukts vorgenommen werden. Zwischen den verschiedenen Genkonstrukten eines Experiments oder zwischen unterschiedlichen Experimenten kann nicht korrigiert werden, da die Qualität der Plasmidpräparationen und die Qualität der Kulturzellen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wesentlich die Transfektionseffizienz beeinflussen und nicht konstant gehalten werden können. Die absolute TPA-induzierte mRNA-Akkumulation unterschiedlicher Genkonstrukte kann auch deshalb weniger genau als im CAT-Test verglichen werden, weil, bedingt durch den großen experimentellen Aufwand der RNaseschutz-Analyse, immer nur drei bis maximal sechs Genkonstrukte im selben Experiment untersucht werden können. Außerdem ist die relative Signalstärke des spezifischen Signals davon abhängig, wie aktiv die radioaktive Probe war und wie lange das Autoradiogramm exponiert wurde. IF, Induktionsfaktoren.

A.	-1200/+63 CAT3				-518/+63 CAT5				-74/+63 CAT5			
	C	A	T	AT	C	A	T	AT	C	A	T	AT
DNA	1.01	1.75	1.89	2.26	0.66	0.66	0.62	0.89	0.42	0.97	1.03	1.15
Col.CAT	0.06	0.09	3.13	0.47	0.03	0.03	1.12	0.05	0.03	4.05	0.32	6.97
Col.	-	-	4.80	-	-	-	3.48	-	-	-	3.54	-
IF _{Col.CAT}	1	1.5	52	7.8	1	1.4	62	3	1	156	12.2	268

B.	-1200/+63 CAT3				-518/+63 CAT5				-74/+63 CAT5			
	C	A	T	AT	C	A	T	AT	C	A	T	AT
Col.CAT	0.06	0.05	1.7	0.21	0.03	0.03	1.19	0.04	0.03	1.75	0.13	2.55
IF _{Col.CAT}	1	0.8	28	3.5	1	1	40	1.3	1	58	4.4	85

2.9 Die Deletion der distalen Gruppe möglicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen ändert die Induzierbarkeit des Promotors nicht

Das zuletzt vorgestellte Experiment zeigte, daß die Promotorsequenzen zwischen den Endpunkten -518 und -74 die Proteinsynthese-Abhängigkeit der TPA-induzierten Aktivierung von langen Kollagenasepromotoren vermitteln. Durch die fortschreitende 5'-Deletion des -518/+63-

Kollagenasekonstrukts war es möglich, die hierfür verantwortlichen Sequenzen zu definieren. Zunächst wurde die -300/+63 CAT5-Deletionsmutante in HeLa tk⁻ Zellen exprimiert. Diesem Konstrukt fehlen die distalen NFκB-, GCN4-, AP-1-, LVa-, MBF-I- und NIP(II)-ähnlichen Sequenzen. Parallel zur Behandlung der Zellen mit TPA und Anisomycin wurde ein weiterer Proteinsynthese-Hemmstoff, nämlich Puromycin, getestet. Im Gegensatz zu Cycloheximid und Anisomycin, die ähnlich wirken, hemmt Puromycin die Translation durch einen unterschiedlichen Mechanismus (siehe Einleitung, Tab. 4).

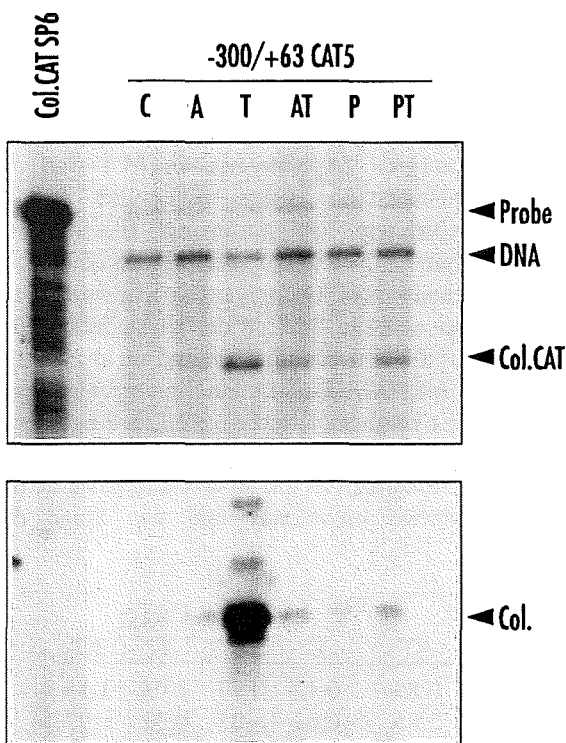


Abb. 24:

Die TPA-Induktion eines -300/+63 CAT5 Kollagenasepromotor-Konstrukts ist durch Anisomycin und Puromycin hemmbar. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden mit 15 µg -300/+63 CAT5-DNA transient transfiziert, 18 h in DMEM, 8% FCS, 1% PS kultiviert und dann mit 60 ng/ml TPA (T), 10 µg/ml Anisomycin (A) oder 50 µg/ml Puromycin (P) behandelt. Die Proteinsynthese-Hemmstoffe wurden 15 min vor der TPA-Induktion zugegeben. 6 h später wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA präpariert und 30 µg RNA im Ribonukleaseschutz-Experiment wie in Abb. 23 beschrieben analysiert. Die Abkürzungen bedeuten: Col.CAT SP6, verwendete Riboprobe; C, unbehandelte Kontrollzellen; Probe, unverdauter Überschuss an Proben-RNA; DNA, Menge an copräparierter Plasmid-DNA; Col.CAT, akkumulierte Konstrukt-spezifische mRNA; Col., Transkript des endogenen Kollagenasegens. In der T-Spur wurde weniger RNA für die Hybridisierung eingesetzt, wie durch den Vergleich der DNA-Banden zu sehen ist.

Das Experiment (Abb. 24) zeigt, daß die distalen Sequenzhomologien *nicht* für die Proteinsynthese-Sensitivität der TPA-Induktion verantwortlich sind. Der -300/+63-Promotorabschnitt verhält sich im Wesentlichen so, wie die zuvor charakterisierte -518/+63-Region und das endogene Gen. Das -300/+63 CAT-Konstrukt wird weder durch Anisomycin noch durch Puromycin aktiviert. Sowohl die Anisomycin-Vorbehandlung, als auch die Puromycin-Vorbehandlung der Zellen verhindert die TPA-induzierte Akkumulation der konstrukt-spezifischen mRNA und des Kollagenase-Transkripts. Daraus kann geschlossen werden, daß die Störung der TPA-Induzierbarkeit langer Konstrukte und des endogenen Gens tatsächlich durch die Hemmung der zellulären Proteinsynthese verursacht wird und nicht auf eine spezifische Wirkung des individuellen Proteinsynthese-Hemmstoffs zurückzuführen ist.

2.10 Analyse der Deletionsmutanten auf ihre TPA-Induzierbarkeit in An- und Abwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomycin

Die Serie von mir hergestellter Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten wurde transient in HeLa-Zellen transfiziert und die TPA-induzierte Akkumulation spezifischer RNA in An- und Abwesenheit von Anisomycin mit der RNaseschutz-Methode untersucht. In Abbildung 25 wurde eine repräsentative Auswahl an Experimenten zusammengestellt. Tabelle 8 zeigt die Auswertung der abgebildeten Autoradiogramme.

Zur Auswertung wurden die Signalstärken (entsprechend den mRNA-Mengen) der Kollagenase-CAT-spezifischen Banden mit dem Laser-Densitometer oder mit dem PhosphoImager bestimmt und nach der Plasmidbande korrigiert. Mit dem *Induktionsfaktor* wird der Quotient der Signalstärken aus behandelten und unbehandelten Zellen angegeben. Der Induktionsfaktor beantwortet die Frage: "Wieviel mal aktiver ist das Gen nach der Behandlung mit TPA und/oder Anisomycin im Vergleich zur Aktivität in unbehandelten Zellen?" Der Induktionsfaktor eignet sich für die Charakterisierung der Induzierbarkeit von Kollagenasegen-CAT-Konstrukten auf RNA-Ebene nur mit Einschränkung, da die basale Aktivität dieser Konstrukte wie auch des endogenen Gens äußerst gering ist und, bedingt durch die Nachweisgrenze der verwendeten Methode, nicht immer bestimmt werden kann. Auch ist von Nachteil, daß sich kleine Abweichungen im Basalwert drastisch auf die errechneten Induktionsfaktoren auswirken. Dazu kommt, daß die Transfektionseffizienz, die basale Aktivität und die Induzierbarkeit der Genkonstrukte erheblich von dem Zustand (z.B. Passage) der verwendeten Zellen abhängig ist. Der ist in der Praxis nur schwer konstant zu halten, sodaß bei der statistischen Auswertung mehrerer Experimente sehr hohe Standardabweichungen möglich sind (Tab. 9, Abb. 26).

Genauer wird die Wechselwirkung zwischen Proteinsynthese-Hemmstoffen und Phorbolestern bei der Induktion transient transfizierter Kollagenasepromotor-Konstrukte durch die Berechnung der *relativen Aktivität* der Konstrukte beschrieben. Hierfür wurde für jedes Konstrukt die Menge an TPA-induzierter Kollagenase-CAT-mRNA, die immer eindeutig bestimmbar ist, willkürlich 100 % gesetzt und die akkumulierten Transkriptmengen aus unbehandelten Zellen, Anisomycin-behandelten Zellen, sowie Anisomycin- und TPA-behandelten Zellen auf die TPA-Aktivierbarkeit bezogen. Mit dem Ausdruck der relativen Aktivität kann die Frage beantwortet werden: "Hemmt oder fördert Anisomycin die TPA-induzierte Akkumulation Kollagenase-CAT-spezifischer RNA oder wird die TPA-Induzierbarkeit nicht beeinflusst, d.h. liegt eine Additivität beider Agenzien vor?" Es hat sich in dieser Arbeit gezeigt, daß einzelne Experimente, die im Abstand von mehreren Monaten durchgeführt wurden, über die Berechnung der relativen Aktivitäten sehr gut vergleichbar sind. Denn obwohl die Induzierbarkeit eines Genkonstrukts in verschiedenen Experimenten teilweise erheblich variiert, sind die relativen Unterschiede zwischen der akkumulierten mRNA nach TPA-Stimulation und der Menge spezifischer RNA nach Anisomycin/TPA-Behandlung bemerkenswert konstant (Tab. 10 und Abb. 27).

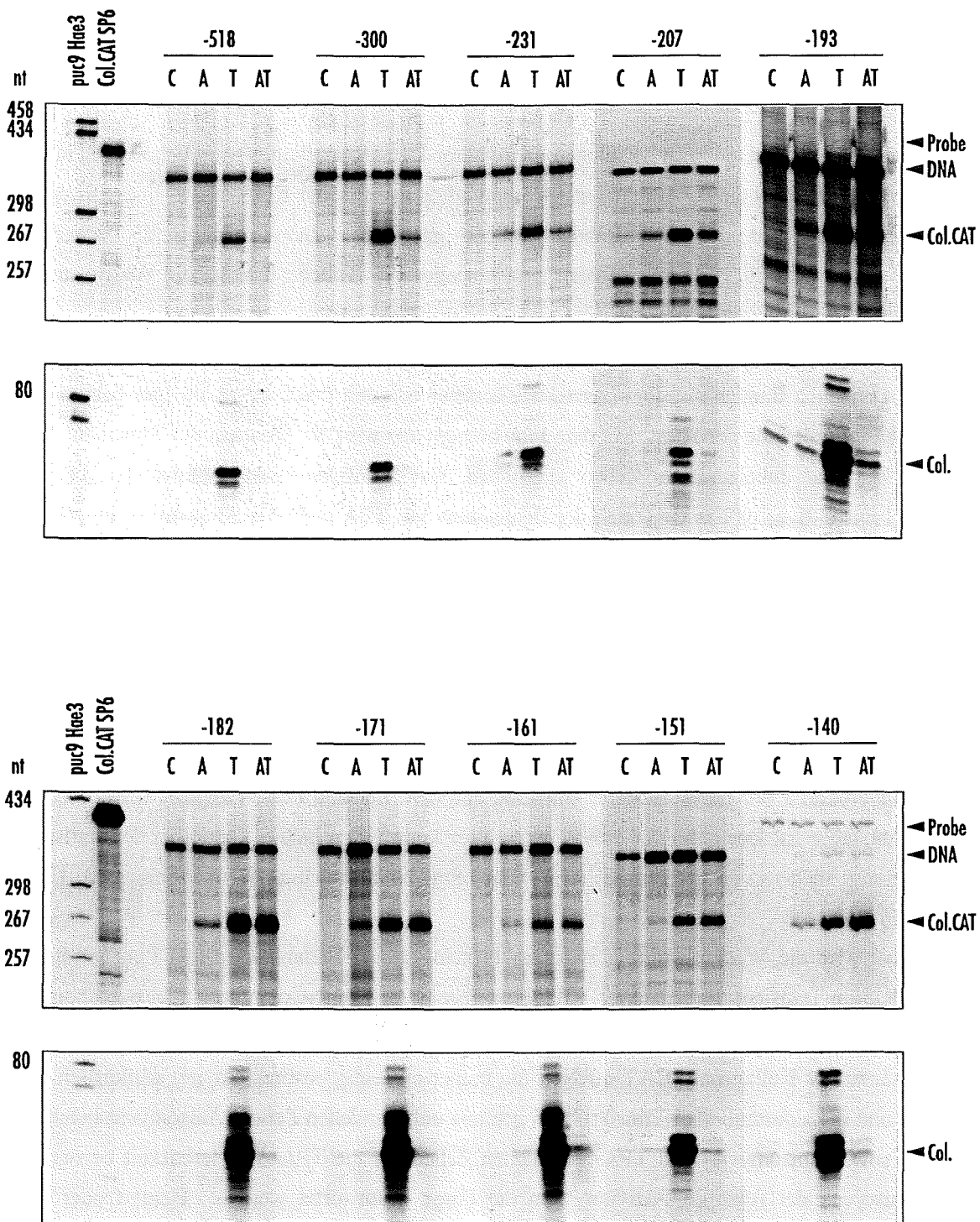
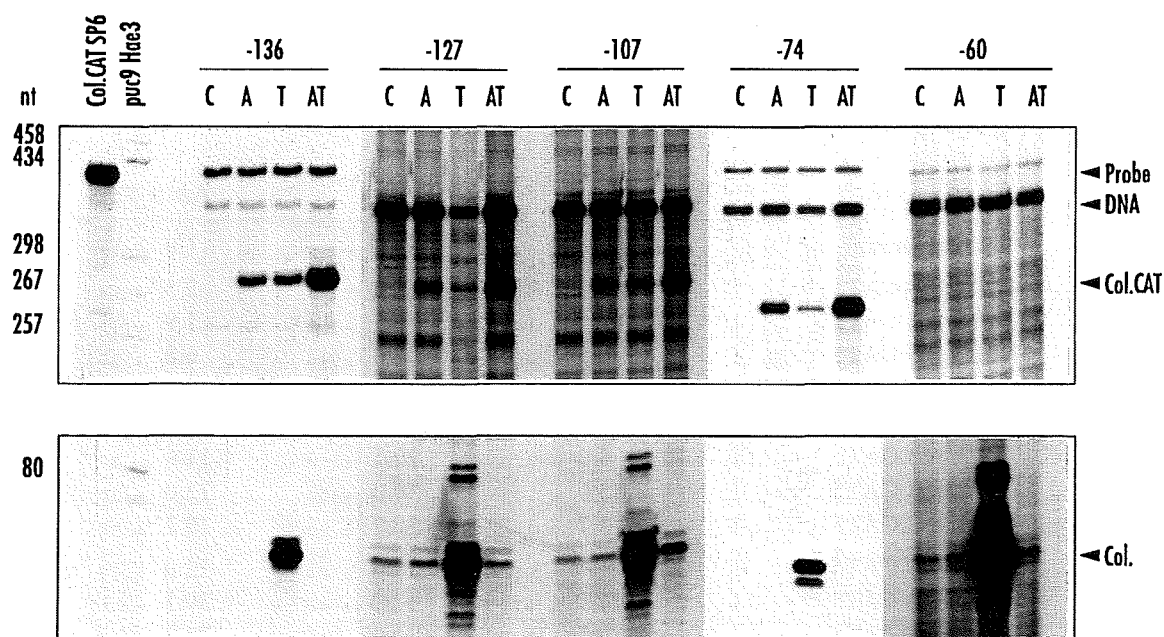


Abb. 25: Repression und Promotion der TPA-Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten durch Anisomycin. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden mit 15 µg Plasmid-DNA nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert, 20 h lang in Vollmedium kultiviert und mit 60 ng/ml TPA (T) und/oder 10 µg/ml Anisomycin (A) behandelt bzw. nicht behandelt (C). Der Proteinsynthese-Hemmstoff wurde 15 min vor dem Phorbol ester zugegeben. 6 h nach Beginn der TPA-Induktion wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA mit der CsCl-Methode präpariert. Je nach Ausbeute wurden 30 bis 50 µg mRNA mit ca. 500.000 cpm Col.CAT SP6-Riboprobe 14 h lang bei 45 °C hybridisiert (Fortsetzung auf der nächsten Seite).



Fortsetzung Abb. 25: Die Hybride wurden 45 bis 60 min lang bei 30 °C mit 220 Einheiten RNaseT1 inkubiert, gereinigt, gefällt und auf 8%-igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Abhängig von der Transfektionseffizienz und der Promotoraktivität wurden die Röntgenfilme mit den getrockneten Gelen 1 bis 3 Tage lang bei Raumtemperatur exponiert. Die spezifischen Banden sind durch Pfeile markiert. Die *Hae3*-fragmentierte, endmarkierte *puc9*-DNA zeigt die Größe der geschützten Fragmente an. Die Abkürzungen bedeuten: Probe, überschüssige Col.CAT SP6-Riboprobe (347 nt); DNA, Kollagenase-CAT-DNA (318 nt); Col.CAT, Kollagenase-CAT-mRNA (244 nt); Col., Transkript des endogenen Kollagenasegens (63 nt).

Tab. 8: Auswertung der in Abbildung 16 gezeigten Experimente

Konstrukt	Induktionsfaktoren				relative Aktivität (%)			
	C	A	T	AT	C	A	T	AT
-518/+63 CAT5	1	3	71	10	1	4	100	14
-300/+63 CAT5	1	3	68	13	1	4	100	19
-231/+63 CAT5	1	15	79	27	1	19	100	34
-207/+63 CAT5	1	14	78	17	1	18	100	22
-193/+63 CAT5	1	6	40	17	2	15	100	42
-182/+63 CAT5	1	7	55	41	2	13	100	74
-171/+63 CAT5	1	2	11	10	9	18	100	91
-161/+63 CAT5	1	3	6	6	17	50	100	100
-151/+63 CAT5	1	2	7	10	14	28	100	142
-140/+63 CAT5	1	9	21	35	5	43	100	167
-136/+63 CAT5 *)	1	33	35	194	3	94	100	554
-127/+63 CAT5	1	11	8	28	12	137	100	350
-107/+63 CAT5	1	15	14	68	7	107	100	486
-74/+63 CAT5	1	21	7	44	13	262	100	550
-60/+63 CAT5	nicht induzierbar				keine Aktivität messbar			

*) Das -136/+63 CAT5-Konstrukt enthält ein, durch die Klonierung gebildetes, zweites TRE (AP-1 Bindestelle) an der Position -137/-129 (siehe Material, 4.10).

Tab. 9: Induktion von transient transfizierten Kollagenasepromotor-Deletionskonstrukten in HeLa tk⁻ Zellen durch TPA (6 h) und Anisomycin (Am, 6 h 15 min). Mit Ausnahme von -91/+63 CAT5 wurden die Mittelwerte und Stichproben-Standardabweichungen (σ_{n-1}) der Induktionsfaktoren für jedes Konstrukt aus zwei bis fünf individuellen Experimenten gebildet.

	Gen / Konstrukt	Kontrolle	Am	TPA	Am + TPA
	Kollagenase I	1	1.8 ± 0.3	64.0 ± 5.9	1.9 ± 1.3
I	-1200/+63 CAT3	1	1.3 ± 0.4	48.0 ± 25.0	2.5 ± 1.8
	-518/+63 CAT5	1	1.8 ± 1.0	50.3 ± 31.0	1.9 ± 0.5
	-300/+63 CAT5	1	2.5 ± 0.6	42.0 ± 24.0	6.8 ± 2.0
	-231/+63 CAT5	1	2.1 ± 0.3	46.0 ± 29.0	3.4 ± 0.4
	-207/+63 CAT5	1	4.7 ± 1.6	37.2 ± 28.0	11.0 ± 4.7
	-193/+63 CAT5	1	5.0 ± 2.2	29.1 ± 16.0	11.6 ± 7.0
	-182/+63 CAT5	1	5.6 ± 1.4	34.0 ± 19.0	13.0 ± 2.0
	-171/+63 CAT5	1	3.7 ± 2.4	20.7 ± 9.5	19.2 ± 3.8
II	-151/+63 CAT5	1	1.4 ± 0.5	10.0 ± 4.0	12.0 ± 4.7
	-140/+63 CAT5	1	11.3 ± 5.7	17.7 ± 4.0	30.3 ± 8.3
	-127/+63 CAT5	1	10.7 ± 0.4	11.0 ± 4.0	31.2 ± 5.1
	-107/+63 CAT5	1	10.4 ± 6.0	9.6 ± 5.7	47.8 ± 28.0
	-91/+63 CAT5	1	14.0	8.9	44.0
	-74/+63 CAT5	1	46.0 ± 27.0	7.5 ± 1.8	70.8 ± 38.0
III	-60/+63 CAT5	keine RNA nachweisbar			

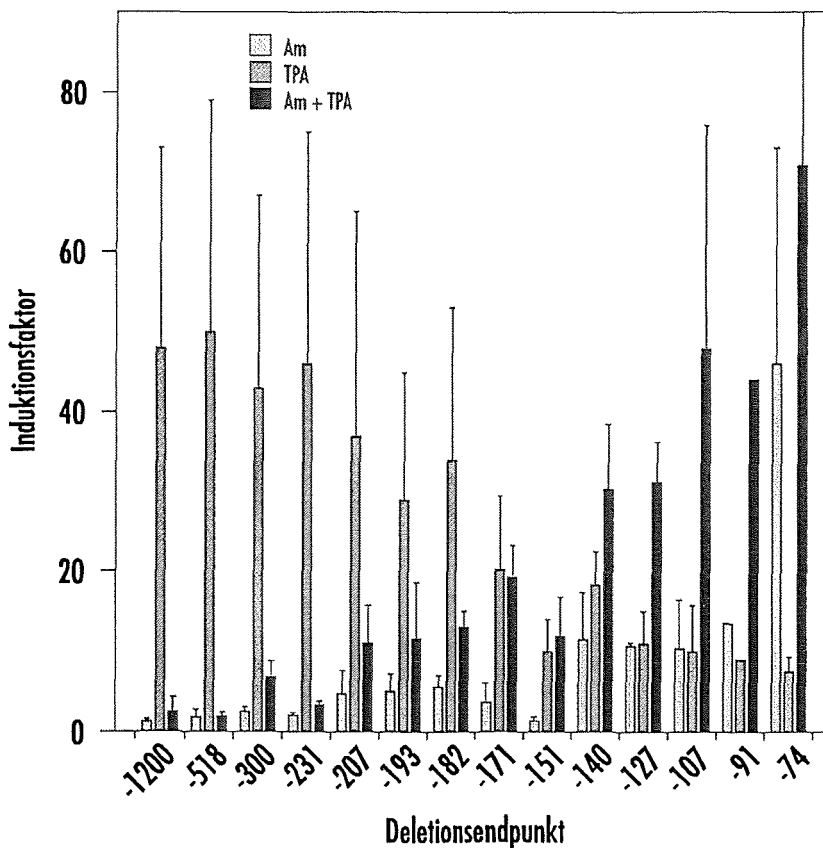
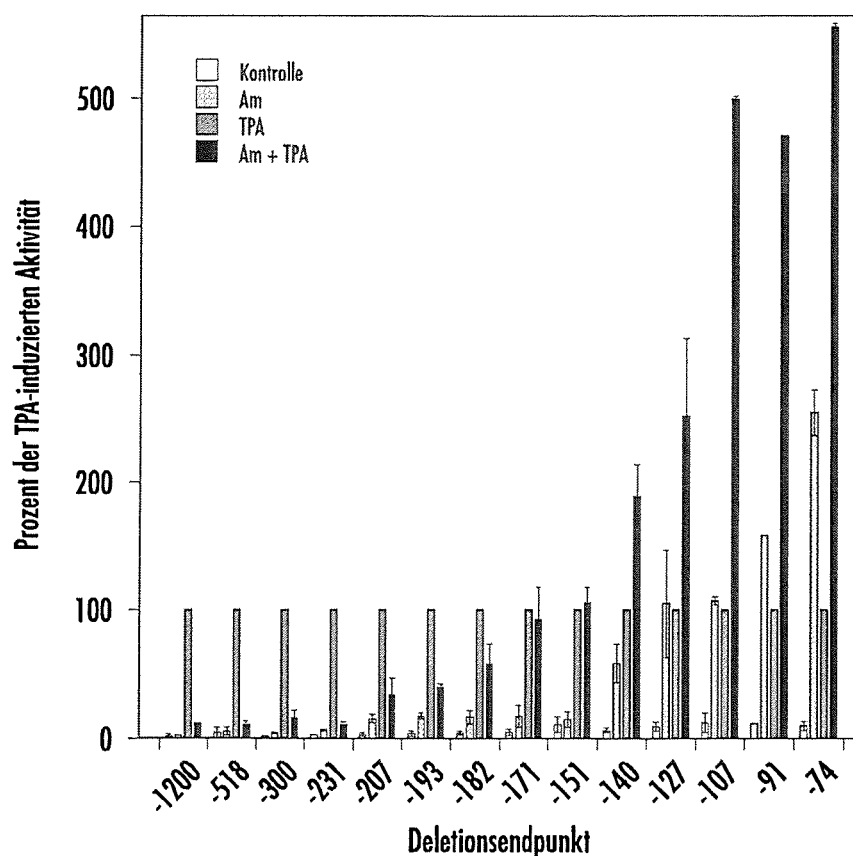


Abb. 26: Induktion von Kollagenasepromotor-Deletionskonstrukten durch TPA und/oder Anisomycin.

Tab. 10: Relative Aktivität von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten in Prozent der TPA-induzierten Aktivität. Die Menge an Kollagenase-CAT-spezifischer RNA nach 6 h TPA-Induktion transient transfizierter HeLa tk⁻ Zellen wurde willkürlich 100 % gesetzt.

	Gen / Konstrukt	Kontrolle (%)	Am (%)	TPA (%)	Am + TPA (%)
	Kollagenase I	1.6 ± 0.2	2.7 ± 0.4	100	4.8 ± 1.6
I	-1200/+63 CAT3	2.4 ± 1.3	2.6 ± 0.5	100	12.2 ± 0.5
	-518/+63 CAT5	4.8 ± 3.9	5.5 ± 3.0	100	11.4 ± 2.0
	-300/+63 CAT5	2.0 ± 0.7	4.6 ± 0.4	100	16.0 ± 6.0
	-231/+63 CAT5	3.3 ± 0.2	6.9 ± 0.7	100	11.4 ± 1.9
	-207/+63 CAT5	3.6 ± 1.6	15.9 ± 3.2	100	34.0 ± 13.0
	-193/+63 CAT5	4.1 ± 2.2	17.8 ± 2.0	100	40.0 ± 2.6
	-182/+63 CAT5	4.5 ± 1.5	17.0 ± 5.2	100	58.3 ± 15.0
	-171/+63 CAT5	5.2 ± 2.5	17.6 ± 8.3	100	93.0 ± 26.0
II	-151/+63 CAT5	11.0 ± 5.9	15.0 ± 5.9	100	108.0 ± 10.0
	-140/+63 CAT5	5.9 ± 1.6	58.0 ± 17.0	100	185.0 ± 26.0
	-127/+63 CAT5	9.7 ± 3.5	105.0 ± 42.0	100	252.0 ± 61.0
	-107/+63 CAT5	12.7 ± 7.5	107.0 ± 3.2	100	499.0 ± 2.4
	-91/+63 CAT5	11.5	158.0	100	470.0
	-74/+63 CAT5	10.0 ± 3.5	255.0 ± 18.0	100	556.0 ± 3.0
	III	-60/+63 CAT5	keine RNA nachweisbar		

Abb. 27: Relative Aktivität von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten nach Behandlung von transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem Protein-synthese-Hemmstoff Anisomycin (Am), mit TPA und mit TPA in Anwesenheit von Anisomycin.



Wie man in Abbildung 26 erkennt, beobachtet man zwei gegenläufige Prozesse, wenn der Phorbolster und der Proteinsynthese-Hemmstoff einzeln wirken: Die TPA-Induzierbarkeit der Kollagenasepromotoren nimmt bei Verkürzung der 5'-flankierenden Region in diskreten Schritten ab. Die Promotorsequenzen, welche zur TPA-Induktion beitragen, wurden mittels den in Teil 1 beschriebenen CAT-Analysen eindeutig identifiziert und werden durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt. Im Gegensatz zur TPA-Induzierbarkeit nimmt die Aktivierbarkeit der Kollagenasepromotoren durch Anisomycin mit abnehmender Promotorlänge zu. Die Anisomycin-Induzierbarkeit ist maximal, wenn alle Kollagenasesequenzen, das TRE ausgenommen, deletiert wurden (-74/+63 CAT5). Nach der Entfernung des TRE-Motivs reagiert der restliche Promotor (-60/+63 CAT5) nicht mehr auf Anisomycin oder TPA (Abb. 25). Das TRE (-73_TGAGTCA_-67) vermittelt also ebenfalls die Anisomycin-Induzierbarkeit, wobei distale Promotorsequenzen einen hemmenden Einfluß auf diesen Effekt haben. Da so unterschiedliche Induktoren wie Phorbolster (Angel et al., 1987 a, b) und ultraviolette Strahlung (Stein et al., 1989; Radler-Pohl et al., 1993) die Kollagenasetranskription über die Modifikation des Transkriptionsfaktors AP-1 regeln, soll im dritten Ergebnisteil untersucht werden, ob Anisomycin gleichfalls AP-1 aktiviert und deshalb die Expression von kurzen, AP-1-abhängigen Genkonstrukten induziert.

In den folgenden Kapiteln wird im Wesentlichen dargestellt, welche Promotorabschnitte für die Hemmung und Förderung der TPA-Induktion von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten durch den Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin verantwortlich sind. Dabei soll betont werden, daß die beobachteten Phänomene genaugenommen als *negative und positive Interferenz zwischen Phorbolestern und Proteinsynthese-Hemmstoffen bei der Regulation der Aktivität von Kollagenasegen-CAT-Konstrukten* beschrieben werden müssten, da mit der verwendeten Methode für mittellange und kurze Promotoren nicht geklärt werden kann, ob Anisomycin die TPA-Induktion hemmt (bzw. fördert) oder umgekehrt der Phorbolster negativ (bzw. positiv) auf die Anisomycin-Induktion einwirkt. Aus historischen und anschaulichen Gründen und weil für die Abhängigkeit der TPA-Induktion langer Kollagenasepromotoren und des endogenen Gens von *de novo* Proteinsynthese ein mechanistisches Modell vorgeschlagen werden kann, wird der Begriff "Hemmung der TPA-Induktion durch Proteinsynthese-Inhibitoren" beibehalten.

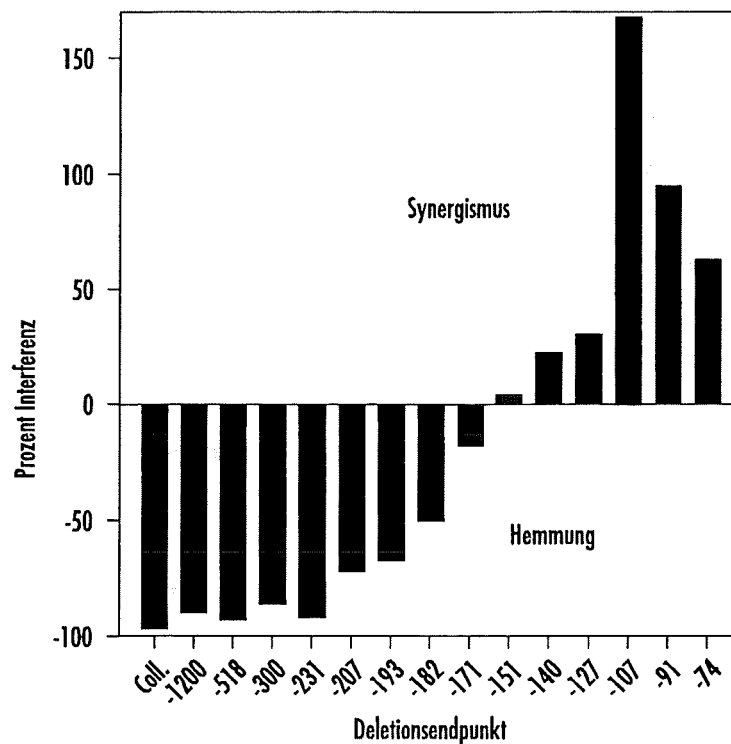
Um einen vergleichbaren Wert für den Einfluß des Proteinsynthese-Hemmstoffs auf die TPA-Induktion von Kollagenasegen-CAT-Konstrukten zu erhalten, wurde die folgende Berechnung, unter Verwendung der Meßwerte aus Tabelle 10, durchgeführt: Von den Anisomycin-, TPA-, und Anisomycin/TPA-induzierten Werten wurde der Kontrollwert abgezogen (Tab. 11). Dann wurde die relative Aktivität des Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukts nach TPA-Behandlung und die relative Aktivität nach Anisomycin-Behandlung addiert. Die Summe ergibt einen fiktiven Wert für die Promotoraktivität $[(Am + TPA)_{berechnet}]$, den man erhalten würde, wenn sich der Phorbolster und der Proteinsynthese-Hemmstoff in ihrer Wirkung gegenseitig nicht beeinflussen und die Wirkung beider Induktoren additiv ist.

Tab. 11: Negative und positive Interferenz zwischen TPA und Anisomycin (Am) bei der Induktion von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten und dem Kollagenasegen. Für die Berechnung (siehe Text) wurden die Meßwerte aus Tab. 10 verwendet. Alle Werte in Prozent.

Gen / Konstrukt	Induzierte Werte minus Kontrollwert				Differenz (gem. - ber.)	Interferenz
	Am	TPA	(Am + TPA) gemessen	(Am + TPA) berechnet		
Kollagenase I	1.4	98.4	3.2	99.8	-96.6	-97
I -1200/+63 CAT5	0.2	97.6	9.8	97.8	-88.0	-90
-518/+63 CAT5	0.7	95.2	6.6	95.9	-89.3	-93
-300/+63 CAT5	2.6	98.0	14.0	100.6	-86.6	-86
-230/+63 CAT5	3.6	96.7	8.1	100.3	-92.2	-91
-207/+63 CAT5	12.3	96.4	30.4	108.7	-78.3	-72
-193/+63 CAT5	13.7	95.9	35.9	109.6	-73.7	-67
-182/+63 CAT3	12.5	95.5	53.8	108.0	-54.2	-50
-171/+63 CAT5	12.4	94.8	87.8	107.2	-19.4	-18
II -151/+63 CAT5	4.0	89.0	97.0	93.0	4.0	4
-140/+63 CAT5	52.1	94.1	179.1	146.2	32.9	23
-127/+63 CAT5	95.3	90.3	242.3	185.6	56.7	31
-107/+63 CAT5	94.3	87.3	486.3	181.6	304.7	168
-91/+63 CAT5	146.5	88.5	458.5	235.0	223.5	95
-74/+63 CAT5	245.0	90.0	546.0	335.0	211.0	63

Abb. 28:

Negative und positive Interferenz zwischen TPA und Anisomycin bei der Induktion von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten und des endogenen Kollagenasegens. Die Werte stellen die Differenz zwischen dem gemessenen (Am + TPA)-Wert und dem berechneten (Am + TPA)-Wert in Prozent des berechneten (Am + TPA)-Werts dar. Die Hemmung der TPA-Induktion des endogenen Kollagenasegens (Coll.) durch Anisomycin ist nahezu vollständig (-97%). Ein Wert von 0 % Interferenz bedeutet Additivität der beiden Induktoren. Die kürzeren Kollagenasegen-CAT-Konstrukte werden durch TPA und Anisomycin superinduziert.



Wenn die tatsächliche Promotoraktivität $[(Am + TPA)_{\text{gemessen}}]$ niedriger als der fiktive Wert ist, so gibt es eine negative Interferenz ("Hemmung") zwischen Anisomycin und TPA. Im umgekehrten Fall, wenn die tatsächliche Promotoraktivität nach Anisomycin/TPA-Induktion höher als die Summe der Einzeleffekte ist, spricht man von positiver Interferenz ("Synergismus" oder "Superinduktion"). Die Differenz zwischen dem gemessenen $(Am + TPA)$ -Wert und dem berechneten $(Am + TPA)$ -Wert in Prozent des berechneten $(Am + TPA)$ -Werts gibt das Ausmaß der Interferenz an und wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{(Am + TPA)_{\text{gemessen}} - (Am + TPA)_{\text{berechnet}}}{(Am + TPA)_{\text{berechnet}}} \times 100 = \text{Interferenz (\%)}$$

Eine Interferenz von -100 % entspricht einer vollständigen Hemmung der TPA-Induktion durch den Proteinsynthese-Inhibitor. Dieser Fall liegt nahezu beim endogenen Kollagenasegen vor (-96.8 % Interferenz). Keine Interferenz (± 0 %), sondern eine additive Wirkung der Induktoren beobachtet man annähernd bei dem -151/+63 CAT5-Konstrukt (+4 %). Die kürzeren Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukte werden durch TPA und Anisomycin superinduziert. Die Aktivität eines -127/+63 CAT5-Konstrukts wird beispielsweise durch die kombinierte Induktion mit Anisomycin und TPA um 31 %, im Vergleich zur Summe der Einzeleffekte, gesteigert. Nach diesen Kriterien lassen sich die Kollagenasepromotoren in zwei Gruppen einteilen (Abb. 28): (1.) Promotoren, die nur dann maximal durch TPA aktivierbar sind, wenn Proteinsynthese möglich ist (-1200 bis -171) und (2.) Promotoren, die durch Anisomycin und TPA synergistisch induziert werden (-151 bis -74).

Die langen Kollagenasepromotor-Fragmente (-1200 bis -231) werden sehr gut durch TPA, aber nur schwach durch Anisomycin aktiviert. Die TPA-Induktion ist nahezu vollständig von Proteinneusynthese abhängig (Tab. 9, 10, und 11; Abb. 26, 27, 28) Diese Eigenschaften bleiben unverändert bestehen, wenn der Kollagenasepromotor bis zur Position -231 deletiert wird. Die distalen Sequenzhomologien, einschließlich des NIP(II)-Elements, sind also nicht für die Hemmung der TPA-Induktion durch Anisomycin von Bedeutung. Mit der fortschreitenden 5'-Deletion der Promotorsequenzen nimmt die negative Interferenz zwischen Anisomycin und TPA in konkreten Schritten ab. Nach der Entfernung der NIP(I)-Bindestelle (-231/-207) ist das verkürzte Kollagenasepromotorfragment etwa doppelt so gut durch Anisomycin aktivierbar (Tab. 10) und die negative Interferenz zwischen Anisomycin und TPA geht von -91 % auf -72 % zurück. Weitere Hemmbarkeit geht mit der Verkürzung des Promotors von Position -193 auf -182 verloren. Das -182/+63 CAT5-Konstrukt ist das letzte der Serie, das eindeutig proteinsyntheseabhängig durch Phorbolster aktiviert wird. Die negative Interferenz zwischen TPA und Anisomycin beträgt bei diesem Genkonstrukt -50 %. Die Entfernung der Promotorsequenzen zwischen den Endpunkten -182 und -171 führt zum Verlust von TPA-Aktivierbarkeit und zur nochmaligen Verminderung der Proteinsynthese-Abhängigkeit der TPA-Induktion (Tab. 10). Es ist aber wichtig festzustellen, daß Anisomycin und TPA dieses Genkonstrukt nicht synergistisch aktivieren, sondern sich gegenseitig

negativ beeinflussen (Interferenz = -18 %, Tab. 11). Mit der weiteren 5'-Deletion des Kollagenasepromotors ändert sich qualitativ die Interaktion zwischen TPA und Anisomycin. Promotoren der Länge -151/+63 und kürzer werden nicht mehr proteinsyntheseabhängig durch TPA induziert. Darüber hinaus aktivieren beide Agenzien synergistisch diese Kollagenasepromotoren.

Wie im ersten Ergebnisteil gezeigt wurde, tragen stromaufwärts von Position -151 zwei DNA-Motive zur TPA-Induzierbarkeit bei, eine Sequenz, die der AP-1-Bindestelle ähnelt (IMS4, -182/-176) und eine Sequenz, die einer C/EBP-Bindestelle ähnlich ist (IMS3, 171/-163). Da die Deletion des Promotors zwischen -181 und -151 die Anisomycin-Reprimierbarkeit der TPA-Induktion aufhebt, muß geschlossen werden, daß die TPA-Aktivierbarkeit der an diese Stellen bindenden Faktoren (IMF4 und IMF3) proteinsyntheseabhängig ist. Die Aktivierung aller 3' von IMS3 bindenden, für die TPA-Induzierbarkeit notwendigen Faktoren (IMF2, PEA3, AP-1), wird durch Anisomycin nicht gehemmt.

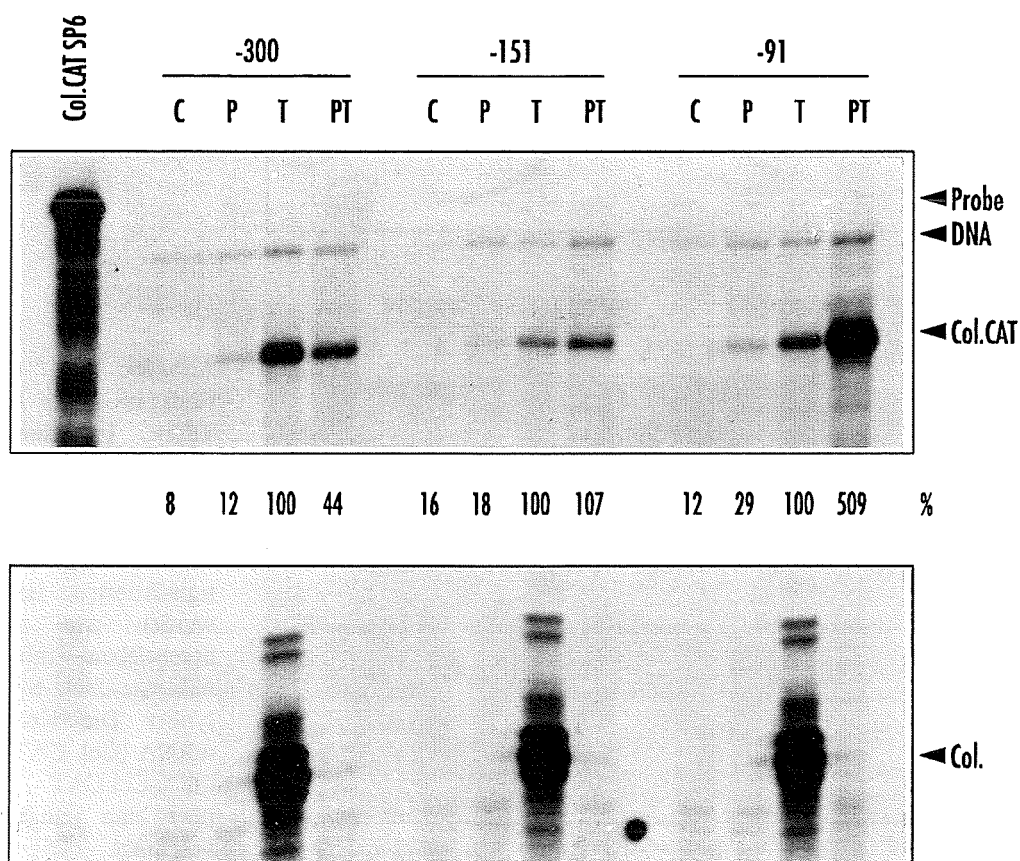


Abb. 29: Repression und Promotion der TPA-Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-Deletionsmutanten durch den Proteinsynthese-Hemmstoff Puromycin. Das Experiment wurde mit 30 µg Gesamt-RNA aus transient transfizierten HeLa tk⁻ Zellen wie in Abb. 23 beschrieben durchgeführt. Die Abkürzungen bedeuten: C, RNA aus unbehandelten Zellen; P, die Zellen wurden 6 h und 15 min mit 50 µg/ml Puromycin behandelt; T, die Zellen wurden 6 h lang mit 60 ng/ml TPA induziert. Um die relative Aktivität der Konstrukte in Prozent der TPA-induzierten Aktivität (%) zu berechnen, wurden die mit dem PhosphoImager gemessenen Mengen an Kollagenase-CAT-mRNA (Col.CAT) gegen die interne Kontrolle (DNA) korrigiert. Das gezeigte Autoradiogramm wurde 36 h lang bei -80 °C exponiert.

Im Wesentlichen gelten die oben aufgestellten Regeln auch für den Proteinsynthese-Hemmstoff Puromycin, wie beispielhaft an den Konstrukten -300/+63 CAT5, -151/+63 CAT5 und -91/+63 CAT5 gezeigt werden kann (Abb. 29). Puromycin ist, verglichen mit Anisomycin, ein schlechterer Hemmer der TPA-Induktion langer Promotorkonstrukte und ein weniger effizienter Induktor der Expression kurzer Promotorkonstrukte. Andere Wissenschaftler bestätigen in ihren Systemen die geringere Potenz von Puromycin bei der Induktion von *c-fos* und *c-jun* Transkription (Edwards und Mahadevan, 1992) und der Aktivierung von p54^{SAPK} (Kyriakis et al., 1994).

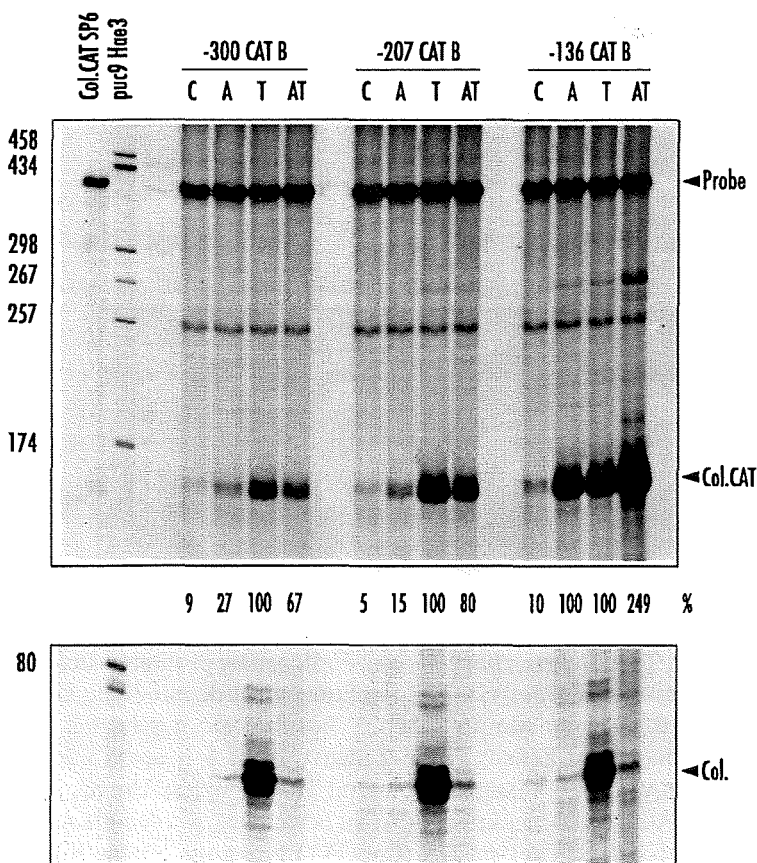
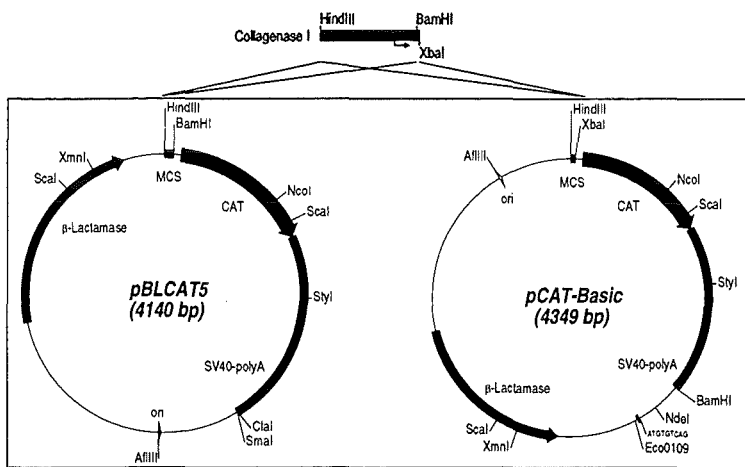


Abb. 30:
Repression und Promotion der TPA-Induzierbarkeit von -300/+63 CAT B, -207/+63 CAT B und -136/+63 CAT B durch Anisomycin. 30 µg Gesamt-RNA aus transient transfizierten HeLa tk⁻ Zellen wurden wie unter Abb. 23 beschrieben mit der Ribonukleaseschutz-Methode analysiert. Die Kollagenase-CAT-mRNA (Col. CAT) wurde durch die Col.CAT SP6-Riboprobe über eine Länge von 154 nt geschützt. Die Menge an spezifischem Signal ist als relative Aktivität in Prozent der TPA-induzierten Menge Col. CAT-mRNA angegeben (%). Weitere Abkürzungen siehe Abb. 23. Das Autoradiogramm wurde 3 Tage lang bei Raumtemperatur exponiert.

Es ist zunächst schwer zu verstehen, warum kurze Kollagenasepromotoren durch Proteinsynthese-Hemmstoffe induzierbar und in Kombination mit TPA superinduzierbar sind, während lange Konstrukte, die u.a. die gleichen Promotorelemente enthalten wie die kurzen Konstrukte, genau entgegengesetzt reagieren. Ohne das im Folgenden vorgestellte Experiment ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß hier keine Kollagenasepromotor-spezifischen Effekte beobachtet werden, sondern eine artifizielle Interaktion zwischen einer auf Anisomycin reagierenden Vektorsequenz und einer proximal gelegenen Kollagenasepromotor-Sequenz, beispielsweise dem TRE, untersucht wird. Man kann sich ein Modell vorstellen, nachdem die Vektorsequenz durch die fortschreitende 5'-Deletion des Kollagenasepromotors in die Nähe des TREs rückt und mit dem TRE zusammen die Anisomycin-Induzierbarkeit bewirkt. Durch die Klonierung der *Hind3/BamH1*-Kollagenasefragmente aus -300/+63 CAT5, -207/+63 CAT5 und -136/+63 CAT5 in den Promega-Vektor pCAT-Basic wurden drei Kollagenasepromotor-Konstrukte hergestellt, die andere Vektorsequenzen in der 5'-Nachbarschaft des Kollagenasepromotors besitzen (-300/+63 CAT B, -207/+63 CAT B, -136/+63 CAT B).

Abbildung 30 zeigt, daß die typischen Merkmale der Promotor-Deletionsfragmente auch in den umklonierten Genkonstrukten erhalten bleiben. Somit ist ein Einfluß des Vektorhintergrunds auf die Anisomycin-Induzierbarkeit kurzer Promotorstücke auszuschließen. Allerdings haben die CAT B-Konstrukte eine höhere Grundaktivität und die TPA-Induktion der langen Konstrukte (-300 CAT B, -207 CAT B) wird weniger gut durch Anisomycin reprimiert, als bei den korrespondierenden CAT5-Konstrukten. Die Überprüfung der pCAT-Basic-Sequenz zeigt, daß dieser Vektor noch das kryptische puc19-Vektor-TRE zwischen den Eco0109- und Nde1-Schnittstellen enthält (Abb. 30), das im pBL CAT3-Vektor (dem Vorläufer des pBL CAT5) für TPA-Induzierbarkeit sorgte und dort entfernt wurde (C. Jonat, 1990). Sehr wahrscheinlich ist das vektorielle TRE der Grund für die höhere basale Aktivität und die reduzierte Proteinsynthese-Sensitivität der TPA-Induktion bei den Kollagenase-CAT B-Konstrukten.

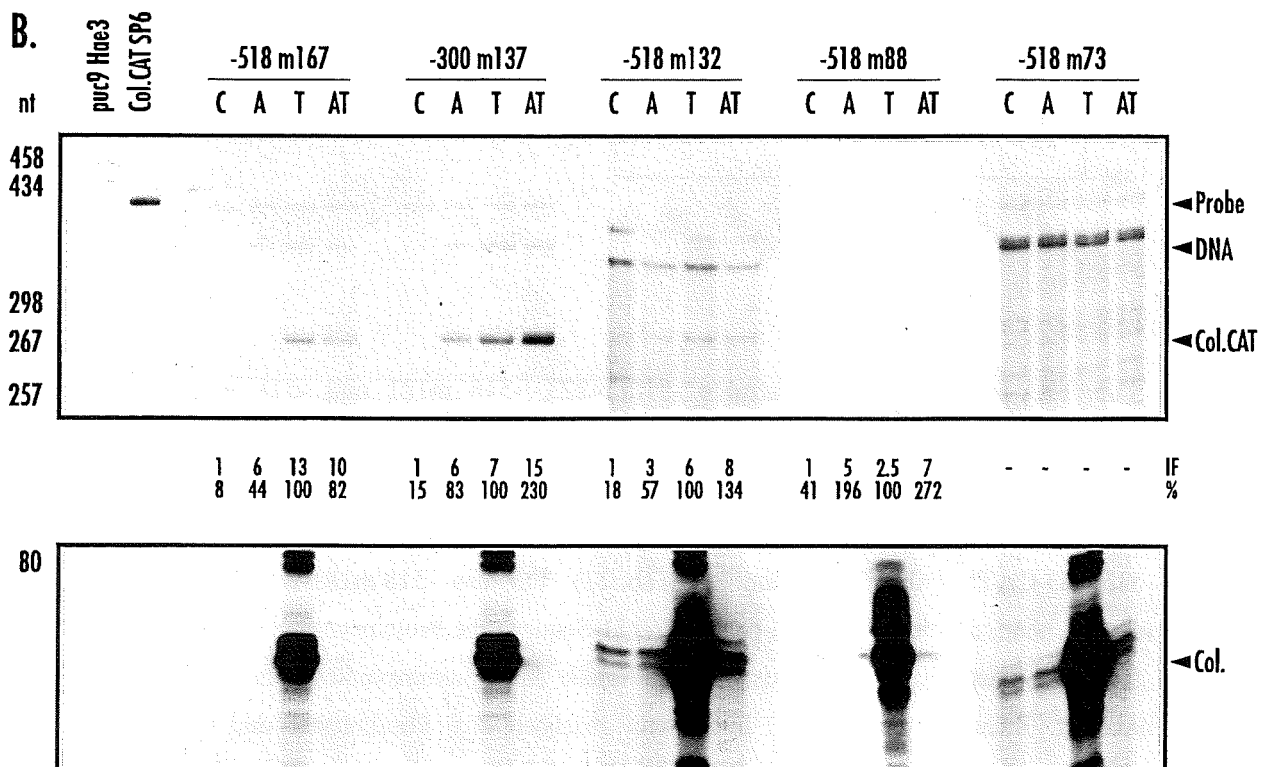
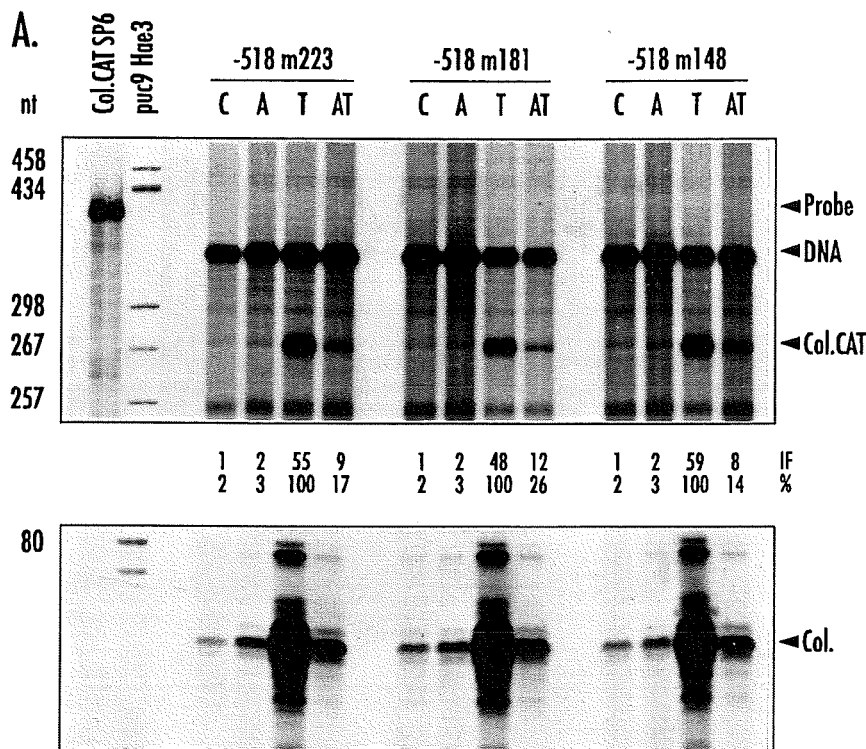
2.11 Identifikation von Anisomycin-sensitiven Sequenzen im Kollagenasepromotor mit internen Mutationen

Wie im vorausgegangenen Kapitel gezeigt wurde, ist der Promotorabschnitt -182/-151 für eine deutliche Hemmbarkeit der TPA-Induktion durch den Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin erforderlich. Um die kritischen Sequenzen möglichst genau zu finden, wurden in diesen Abschnitt eines langen Kollagenasepromotor-Fragments (-518/+63 CAT5 bzw. -300/+63 CAT5) Punktmutationen eingeführt und zwar in das TRE-ähnliche Motiv bei Position -182/-176 (-518 m181) und in die Region zwischen -171 und -161 (-518 m167). Zusätzlich wurden das NIP(I)-Motiv (-518 m223), die UEF2-homologe Sequenz bei Position -151/-141 (-518 m148), die TRE-ähnliche Sequenz bei Position -137/-128 (-300 m137 und -518 m132), die PEA3-Bindestelle (-518 m88) und das Kollagenase-TRE (-518 m73) intern mutiert. Die Basensubstitutionen sind in Abbildung 15 angegeben. Diese Genkonstrukte wurden transient in HeLa tk⁻ Zellen transfiziert und mit 60 ng/ml TPA in Abwesenheit oder in Gegenwart von 10 µg/ml Anisomycin aktiviert. Sechs Stunden später wurde die mRNA der Zellen präpariert und die Menge an akkumuliertem Kollagenase-CAT-spezifischem Transkript nachgewiesen. Die Induzierbarkeit der internen Mutanten wird in den Abbildung 31, Abbildung 32 und in Tabelle 12 gezeigt.

Tab. 12: Induktion und relative Aktivität von Kollagenasegen-CAT-Konstrukten mit internen Mutationen. Für die Berechnung der relativen Aktivität in Prozent der TPA-induzierten Aktivität wurde die Menge an Kollagenase-CAT-spezifischer RNA nach 6 h TPA-Induktion transient transfizierter HeLa tk⁻ Zellen willkürlich 100 % gesetzt. Die negative und positive Interferenz zwischen Anisomycin und TPA wurde wie im Text und Tab. 11 beschrieben berechnet. C, Kontrolle; T, TPA; A, Anisomycin.

Konstrukt	Induktionsfaktor				relative Aktivität (%)				Interferenz (%)	
	C	A	T	AT	C	A	T	AT		
I -518 m223	1	1.5	55	9.3	1.8	2.7	100	16.8	- 85	
-518 m148	1	1.9	59	8.0	1.7	3.2	100	13.5	- 88	
-518 m181	1	1.6	48	12.4	1.9	3.1	100	25.8	- 76	
-518 m167	1	3.6 ±3	11 ±3	8.7 ±2	10 ±3	32±16	100	84 ±2	- 34	
II -518 m88	1	4.8	2.5	6.8	41	196	100	272	8	
-518 m132	1	3.8 ±1	5.9 ±1	9.8 ±7	18 ±3	65 ±6	100	156 ±86	7	
-300 m137	1	6.5 ±1	7.2 ±2	19 ±7	15 ±4	91 ±11	100	252 ±28	47	
III -518 m73	keine RNA meßbar									

Abb. 31: Die Induzierbarkeit von punktmutierten Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten durch TPA oder Anisomycin und durch TPA in Gegenwart von Anisomycin. (A.) Kollagenasepromotoren mit internen Mutationen in der NIP-Sequenz (m223), der distalen TRE-ähnlichen Sequenz (m181) und der UEF-2-Homologie (m148). (B.) Kollagenasepromotoren mit internen Mutation in der C/EBP-ähnlichen Bindestelle (-518 m167), in der GCN4-ähnlichen Sequenz (-300 m137), in der -132/-128 -Region (-518 m132), in der PEA3-Bindestelle (-518 m88) und im TRE (-518 m73). Die Experimente wurden wie im Text und in Abbildung 23 beschrieben durchgeführt. Die Transkriptmengen der Kollagenasegen-CAT-Konstrukte wurden gegen die Plasmidbande korrigiert und in Induktionsfaktoren (IF) und relative Aktivitäten in Prozent der TPA-induzierten Aktivitäten (%) umgerechnet. →



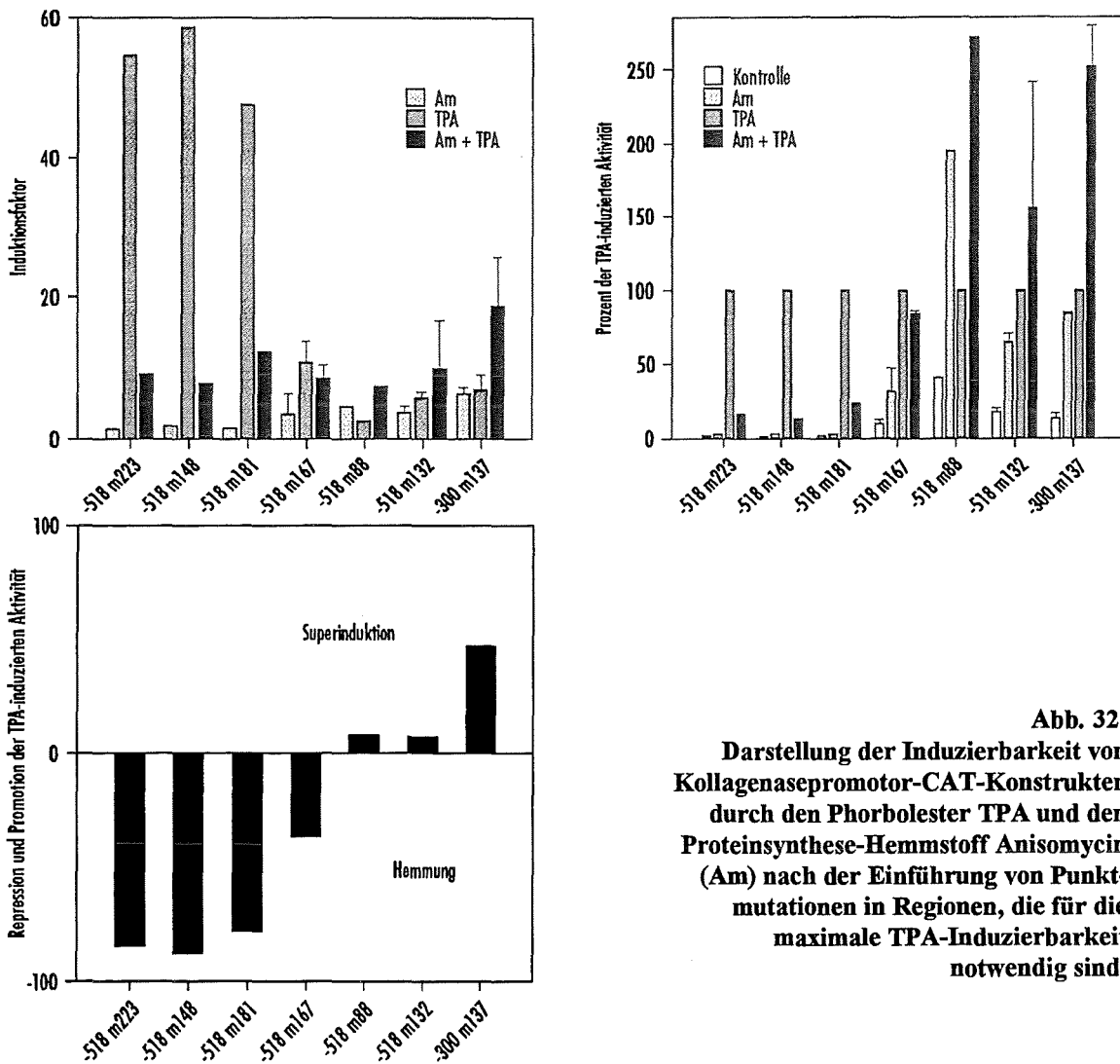


Abb. 32:
Darstellung der Induzierbarkeit von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten durch den Phorbol ester TPA und den Proteinsynthese-Hemmstoff Anisomycin (Am) nach der Einführung von Punktmutationen in Regionen, die für die maximale TPA-Induzierbarkeit notwendig sind.

Die TPA-Induktion der Konstrukte -518 m223, -518 m181 und -518 m148 wird durch die Proteinsynthese-Hemmung stark eingeschränkt. In Gegenwart von Anisomycin sind nur noch 14 - 26 % der normalen TPA-induzierten Transkription möglich (Abb. 31 A). Damit verhalten sich die genannten Punktmutanten ähnlich wie das nicht mutierte, parentale Promotorkonstrukt -518/+63 CAT5 (Abb. 31 A und 32, Tab. 12). Für das -518 m181-Konstrukt ist das Ergebnis überraschend, da die 5'-Deletion der -182/-171-Sequenz die Proteinsynthesesensitivität des Promotors stark vermindert, was den Verlust der Bindestelle eines proteinsyntheseabhängig aktivierten Faktors nahelegt. Zwar ist die negative Interferenz zwischen dem Phorbol ester und dem Proteinsynthese-Inhibitor durch die interne Mutation der -181/-176-Region von -93 % (-518 Wildtyp, Tab. 11) auf -76 % (-518 m181, Tab. 12) reduziert, doch ist der Effekt nicht so drastisch, wie erwartet. Das Ergebnis kann nur so interpretiert werden, daß ein oder mehrere weitere, die TPA-Induktion fördernde Faktoren, wie z.B. der an die IMS3-Stelle bindende Faktor, proteinsyntheseabhängig aktiviert werden.

Die Untersuchung des Konstrukts -518 m167 führt zu einem ähnlichen Resultat: Obwohl die TPA-Induzierbarkeit des -518/+63-Kollagenasepromotor-Fragments durch die Mutation der -167/-162-Region (IMF3 Bindestelle) erheblich beeinträchtigt wird, ist die noch bestehende, TPA-induzierte Aktivität durch Anisomycin weiter hemmbar (Abb. 31 B und 32, Tab. 12). Die wahrscheinliche Ursache hierfür ist der Faktor IMF4 (Bindesequenz -182/-176), dessen Aktivierung also Proteinsynthese voraussetzt. Abbildung 33 veranschaulicht die geschilderten Überlegungen.

Die internen Mutationen der IMS2 (-300 m137) und der in 3'-Richtung anschließenden Sequenzen (-518 m132), sowie des PEA3-Elements (-518 m88) beeinträchtigen ebenfalls sehr stark die TPA-Induzierbarkeit. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Verhältnissen, wird die minimale TPA-Reaktivität dieser Konstrukte durch Anisomycin nicht gehemmt, sondern im Fall des -300 m137 sogar gefördert (Abb. 31 B und 32, Tab. 12). Setzt man voraus, daß durch die eingeführten Basensubstitutionen nicht nur die Bindung von IMF2 bzw. PEA3, sondern ebenso die aktivierende Wirkung der stromaufwärts bindenden Faktoren IMF3 und IMF4 verhindert wird, so ist es erklärbar, warum die Proteinsynthese-Hemmung keinen negativen Effekt auf die TPA-Induktion dieser Konstrukte hat. Im anschließenden Resümee werden die komplizierten Zusammenhänge anhand eines Schemas dargestellt.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß die Mutation des *TRE-Motivs* (-518 m73) die Aktivierung des Promotors durch Anisomycin und TPA verhindert. Das TRE ist also das auf Anisomycin reagierende Element des Kollagenasepromotors (Abb. 31 B).

2.12 Zusammenfassung

Die Phorbolster-induzierte Expression des Kollagenasegens ist von *de novo* Proteinsynthese abhängig. Ein transient in HeLa tk⁻ Zellen transfiziertes CAT-Konstrukt, das von einem ausreichend langen Kollagenasepromotor-Fragment kontrolliert wird, verhält sich diesbezüglich wie das endogene Gen (Abb. 23). Die Entfernung der Sequenzen zwischen den Endpunkten -182 und -171, sowie zwischen -171 und -151, durch Deletion der 5'-liegenden Sequenzen, führt zum vollständigen Verlust der Proteinsynthese-Sensitivität der TPA-Induktion (Abb. 25 und folgende). In diesem kritischen Abschnitt liegen die Bindestellen (IMS4, -182/-176 und IMS3, -171/-163) für Faktoren, die für die volle TPA-Reaktivität des Kollagenasepromotors notwendig sind (siehe auch Ergebnisteil 1). IMF4 und IMF3 werden also proteinsyntheseabhängig aktiviert, wobei mit den hier angewandten Methoden nicht unterscheidbar ist, ob diese Faktoren nach TPA-Induktion neu synthetisiert oder durch einen Proteinsynthese erfordernden Prozeß posttranslational modifiziert werden. Wie erwartet, wenn sowohl IMF4, als auch IMF3 proteinsyntheseabhängig aktiviert werden, führt die selektive Zerstörung einer der Bindestellen nicht zur Aufhebung der Anisomycinsensitivität der TPA-Induktion:

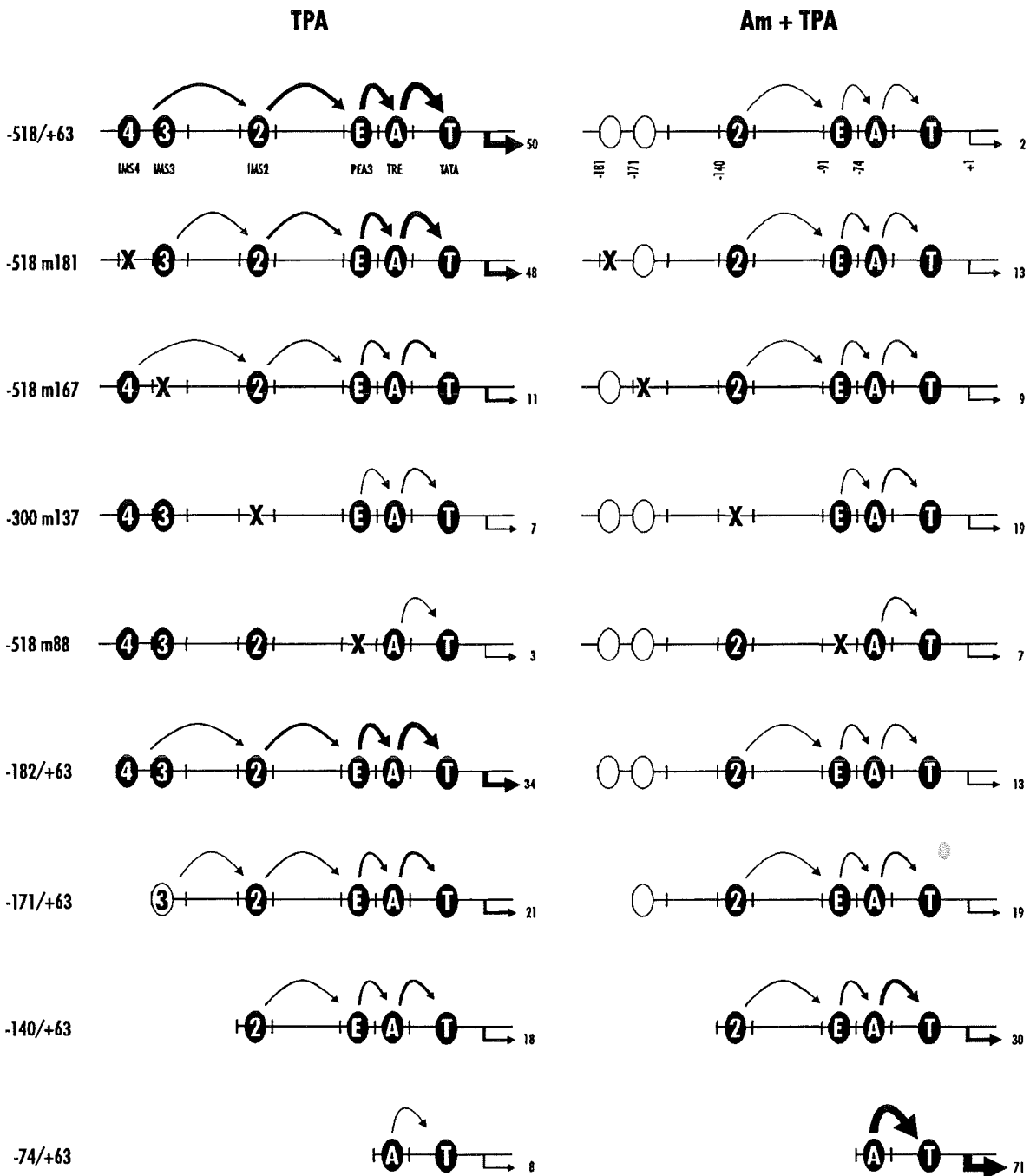
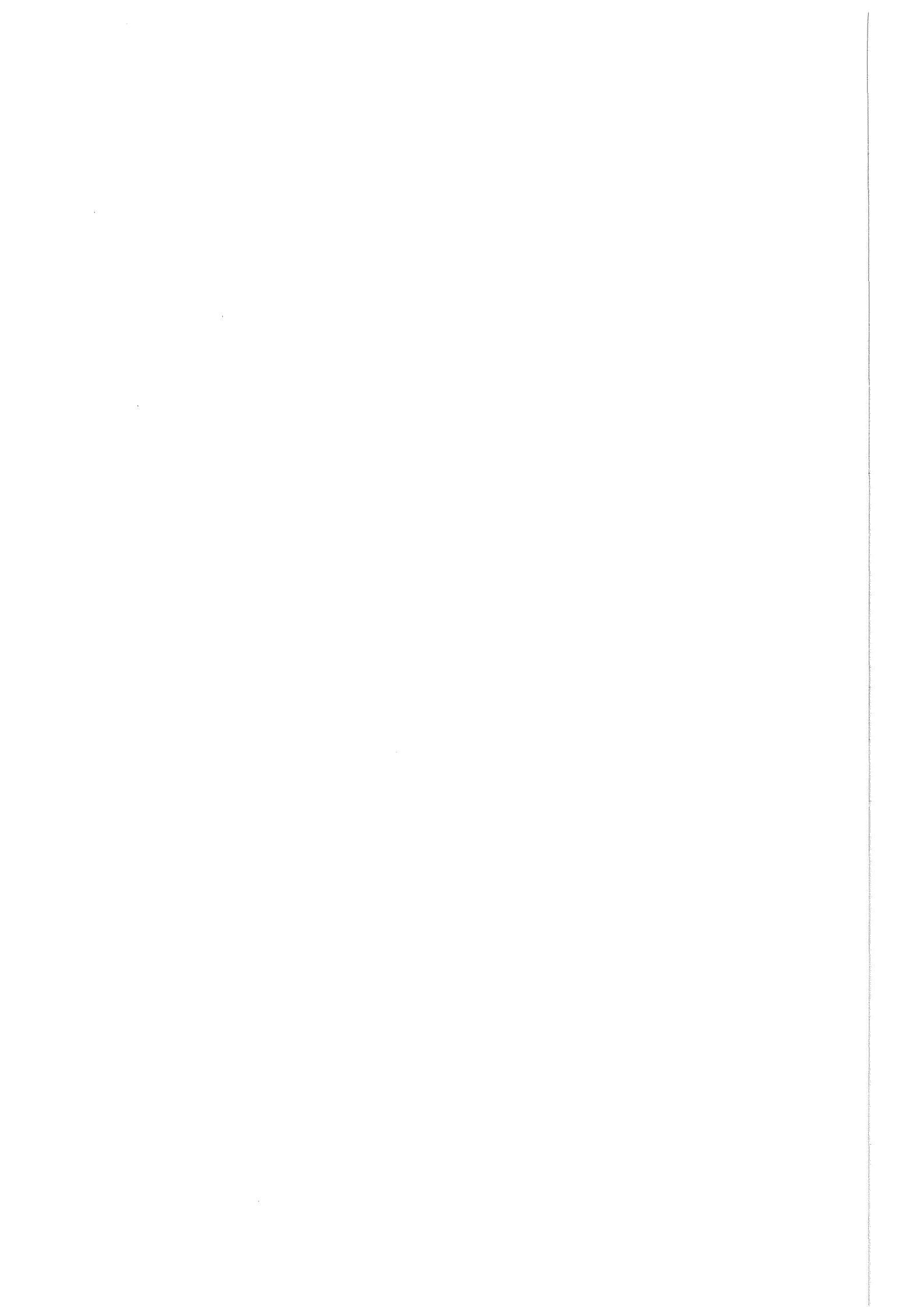


Abb. 33: Modell für die Kooperation von aktivierenden Transkriptionsfaktoren bei der Regulation von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten durch Phorbol ester (TPA) und Anisomycin (Am). Die Strichstärke der runden Pfeile symbolisiert die Fähigkeit der Faktoren (schwarze Ellipsen), unter den gegebenen Umständen, die Transkription (abgewinkelter Pfeil) zu induzieren. Rechts neben dem Transkriptionspfeil sind die Induktionsfaktoren (nach Tab. 9 und 12) angegeben. Kreuze (x) zeigen die Position von Punktmutationen an. Die Faktoren IMF4 (4) und IMF3 (3) werden proteinsyntheseabhängig aktiviert und sind deshalb bei der Induktion der Promotorkonstrukte durch Anisomycin und TPA nicht beteiligt (weiße Ellipsen ohne Nummerierung). Im -171/+63 CAT5-Konstrukt ist die Affinität von IMF3 für seine Bindesequenz möglicherweise durch die Deletion weniger 5'-flankierender Basenpaare der Bindestelle beeinträchtigt (dargestellt als weiße Ellipse mit Zahl), wodurch der geringe Unterschied zwischen TPA-induzierter Promotoraktivität und TPA-/Anisomycin-induzierter Promotoraktivität erklärt werden kann. Die Transkriptionsfaktoren IMF2 (2), Ets (E) und AP-1 (A) werden proteinsyntheseunabhängig aktiviert. T, Faktoren des basalen Transkriptionskomplexes.

Wird die IMF4-Bindestelle zerstört (Konstrukt -518 m181), dann ist die verbleibende TPA-Induzierbarkeit des Promotors (etwa 60 % des Wildtyp-Promotors, Tab. 6) noch stark durch Anisomycin hemmbar (negative Interferenz = -76 %), allerdings nicht mehr so stark, wie der nicht mutierte Promotor (negative Interferenz = -93 %). Die verbleibende Hemmbarkeit der -518 m181-Mutante beruht auf der Hemmung der TPA-induzierten Aktivierung von IMF3 durch Anisomycin. Die interne Mutation der IMF3-Bindestelle (Konstrukt -518 m167) erniedrigt die TPA-induzierte Aktivität des Konstrukts auf 11 % des Wildtyp-Konstrukts (Tab. 6). Diese TPA-induzierte Restaktivität des Konstrukts ist deshalb noch durch Anisomycin hemmbar, weil der nur in Anwesenheit von Proteinsynthese aktivierbare Faktor IMF4 zur Aktivierbarkeit beiträgt.

Anders ist die Situation, wenn die Bindestellen für IMF2 oder Ets durch 5'-Deletion oder interne Basensubstitution mutiert sind (-518 m132, -158 m88). In beiden Fällen können IMF3 und IMF4 nicht mehr wirken, sodaß die verbleibende, TPA-induzierte Restaktivität durch Anisomycin nicht mehr hemmbar ist. TPA und Anisomycin induzieren synergistisch (additiv oder superadditiv) Deletionsmutanten, denen die Promotorbereiche 5' von -151 fehlen oder interne Mutanten mit punktmutierten Bindestellen für IMF2 bzw. Ets. Alle 3' von Position -151 bindenden, für die TPA-Induzierbarkeit notwendigen Faktoren (IMF2, Ets, AP-1) werden folglich proteinsyntheseunabhängig aktiviert.



Teil 3:
Die Induzierbarkeit kurzer Kollagenase-Konstrukte
durch Anisomycin

2.13 Anisomycin verlängert nicht die Halbwertszeit von Kollagenase-CAT-mRNA

In zweiten Ergebnisteil der Dissertation wurde untersucht, wie Anisomycin die TPA-Induktion des endogenen Kollagenase I-Gens und von langen Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten hemmt. Dabei wurde festgestellt, daß der Proteinsynthese-Hemmstoff selbst die Akkumulation von Kollagenase-CAT-mRNA induziert, und zwar um so besser, je kürzer das Kollagenasepromotor-Fragment ist. Bei der Analyse der 5'-Deletionsfragmente blieb nicht unbemerkt, daß vor allem die Deletionen der Promotorabschnitte -231/-207 (NIP-Element), -151/-140 (UEF2-Sequenz), -140/-127 (IMS2) und -91/-74 (PEA3-Bindestelle) die Anisomycin-Induzierbarkeit signifikant steigern (Tab. 10). Diese Beobachtung wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da es interessanter erschien, das auf Anisomycin reagierende Element des Kollagenasepromotors und die durch Anisomycin aktivierten Faktoren zu identifizieren. Die in der vorangegangenen Sektion beschriebenen Versuche zeigten, daß das Kollagenase-TRE ebenfalls das Anisomycin-induzierte Signal überträgt, da die Deletion oder Punktmutation des TRE die Anisomycin-Aktivierbarkeit des Promotors verhindert. Im Verlauf der Doktorarbeit wurden Experimente durchgeführt, um das aktivierende Potential des Proteinsynthese-Hemmstoffs zu verstehen. Diese Experimente sind im nachfolgenden, dritten Teil der Arbeit zusammengefaßt.

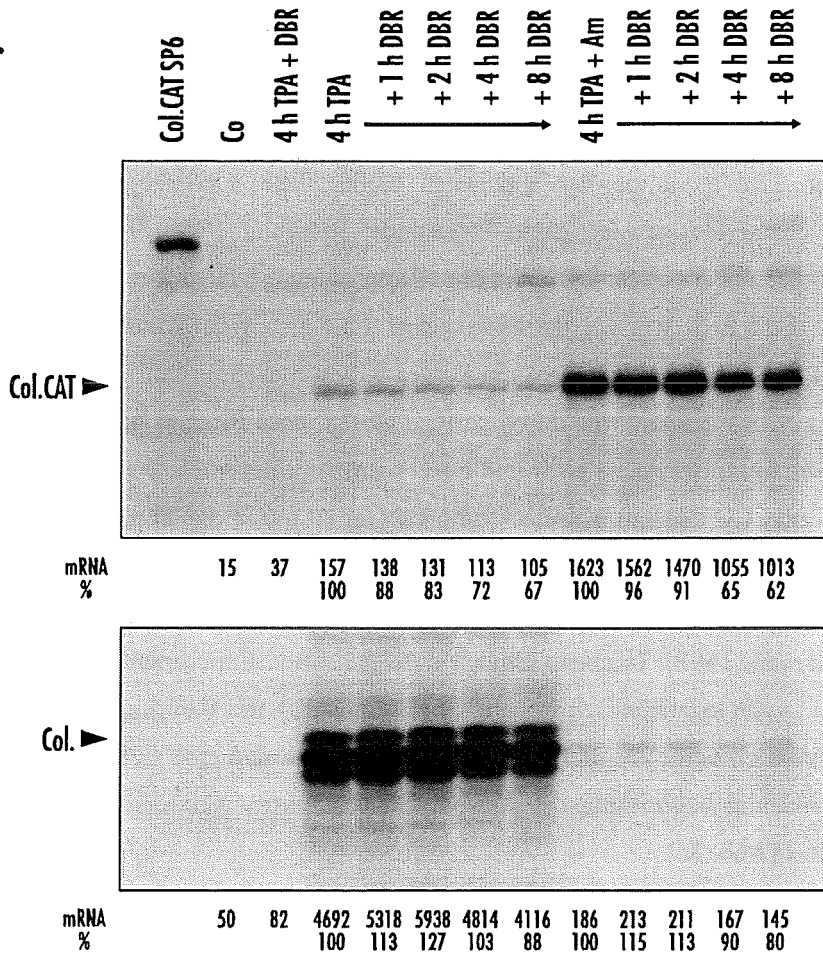
Da mit der verwendeten Ribonukleaseschutz-Analyse Veränderungen in den akkumulierten mRNA-Mengen, aber keine Transkriptionsraten gemessen werden können, war zunächst die Frage zu klären, ob Anisomycin die Expression eines kurzen Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukts steigert oder die Halbwertszeit der Kollagenase-CAT-mRNA verlängert. Einerseits ist es sehr unwahrscheinlich, daß die Lebensdauer von mRNA, die von Konstrukten transkribiert wird, die sich nur in den Promotorkonstrukten unterscheiden, durch Anisomycin unterschiedlich reguliert wird. Auch wird ein langes Promotorkonstrukt durch Anisomycin viel weniger stark aktiviert, als ein kurzes Promotorkonstrukt, obwohl die basale Expression langer und kurzer Promotoren ähnlich ist. Andererseits ist bekannt, daß Anisomycin den Abbau von bestimmten Transkripten verzögern kann. So wurde für die mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) induzierten mRNAs von *c-fos* und *c-jun* gezeigt, daß Anisomycin in einer Konzentration von 10 µg/ml die *fos*- und *jun*-Transkripte stabilisiert (Edwards u. Mahadevan, 1992). Möglicherweise reagieren kurzlebige und längerfristig stabile mRNAs unterschiedlich auf Anisomycin. Weil keine Publikation über die Stabilität der hier untersuchten Kollagenase-CAT-mRNA in eukaryontischen Zellen existiert, wurde die Abbaurate der Kollagenase-CAT-mRNA durch das im folgenden beschriebene Experiment bestimmt.

HeLa tk⁻ Zellen wurden mit -74/+63 CAT5 transient transfiziert und mit TPA alleine oder zusammen mit Anisomycin induziert. Nach einer vierstündigen mRNA-Akkumulation wurden die Zellen mit 25 µg/ml DBR (5,6-Dichlorobenzimidazolribosid; Zandomeni et al., 1982, 1986; Laird-Offringa et al., 1990; Edwards u. Mahadevan, 1992) behandelt. DBR ist ein Nukleotid-Analogen und blockiert die weitere Transkription durch Vergiftung der RNA-Polymerase II. Eine Stunde bis acht Stunden später wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA präpariert und die Menge des CAT-spezifischen Transkripts analysiert (Abb. 34 A). Längere Inkubationszeiten mit dem Transkriptions-Blocker wurden nicht für sinnvoll erachtet, weil die Induktionszeiten in dieser Arbeit sechs Stunden nicht überschreiten und sich durch eine längere Behandlung mit den Transkriptions-/Translations-Hemmstoffen ohnehin der zelluläre Pool an RNA-degradierenden Enzymen erschöpft. Ein zweites Experiment wurde mit dem Transkriptions-Hemmstoff Actinomycin D (Act. D; 10 µg/ml Endkonzentration nach Maniatis, 1982) analog zu dem oben beschriebenen Versuch durchgeführt (nicht gezeigt).

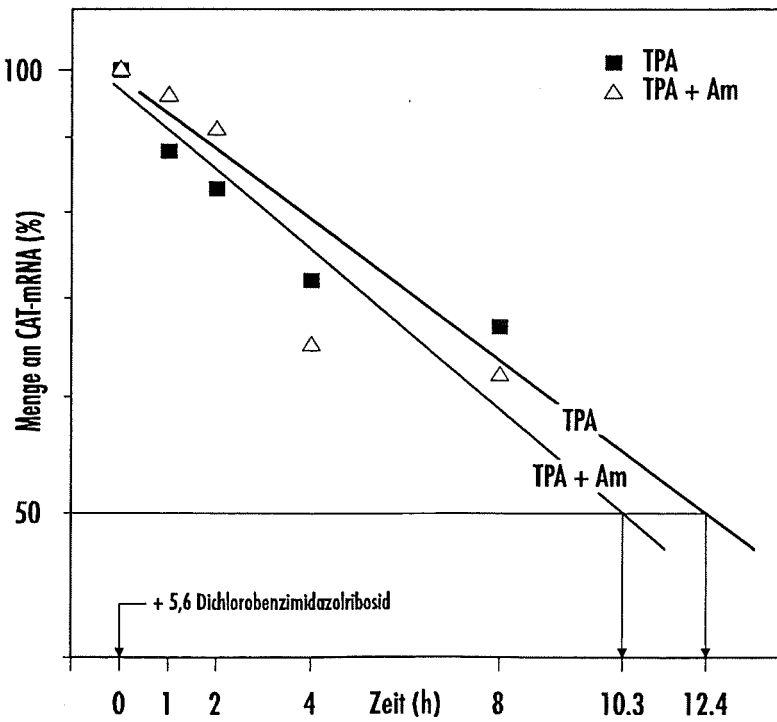
Die Halbwertszeit der Kollagenase-CAT-mRNA wurde erhalten, indem die Menge an verbleibender mRNA gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abb. 34 B). Für die TPA-induzierte Kollagenase-CAT-mRNA wurde eine Halbwertszeit von 12.4 Stunden (DBR-Experiment) bzw. 15.4 Stunden (Act. D-Experiment) bestimmt. In Gegenwart von Anisomycin und TPA ist die Hälfte der Kollagenase-CAT-mRNA nach 10.3 Stunden (DBR-Experiment) bzw. 13.2 Stunden (Act. D-Experiment) abgebaut. Anisomycin schützt demnach das CAT-Transkript keinesfalls vor der Degradation; eher ist das Gegenteil der Fall. Da für Anisomycin in Bezug auf CAT-mRNA keine Halbwertszeit-verlängernden Effekte nachgewiesen werden konnten, muß angenommen werden, daß die Erhöhung der basalen und der TPA-induzierten Kollagenase-CAT-Transkriptmengen nach Anisomycin-Behandlung auf einer Induktion bzw. Verstärkung der Transkription beruht. Die Halbwertszeit der TPA-induzierten Kollagenase-mRNA wurde mit 28.3 Stunden (DBR-Experiment) bestimmt und entspricht den in der Literatur genannten Werten (Brinckerhoff et al., 1986; Otani et al., 1990). Wiederum beobachtet man bei der kombinierten Behandlung der Zellen mit TPA und Anisomycin eine Destabilisierung des Transkripts ($t_{1/2} = 19.5$ Stunden).

Abb. 34: Anisomycin hat keinen Einfluß auf die Stabilität von CAT-mRNA. HeLa tk⁻ Zellen wurden mit -74/+63 CAT5 wie in Abbildung 23 beschrieben transient transfiziert und mit 60 ng/ml TPA alleine (4 h TPA) oder zusammen mit 10 µg/ml Anisomycin (4 h TPA + Am) induziert. Kontrollzellen blieben unbehandelt (Co). Zur Überprüfung der Transkriptionshemmung wurden die Zellen 4 h lang mit TPA und 25 µg/ml DBR (5,6-Dichlorobenzimidazolribosid) gleichzeitig behandelt (4 h TPA + DBR). In den anderen Ansätzen wurde nach 4 h die mRNA-Akkumulation durch Zugabe von 25 µg/ml DBR gestoppt. 1 h bis 8 h später wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA präpariert. (A.) 60 µg Gesamt-RNA wurden im RNase-Schutznachweis mit der Probe Col.CAT SP6 analysiert. Die mit dem PhosphoImager bestimmte, absolute Menge an Kollagenase-CAT-spezifischer mRNA (Col.CAT) bzw. die Menge des endogenen Kollagenasetranskripts (Col.) ist angegeben (mRNA). Der gezeigte Film wurde über Nacht bei Raumtemperatur belichtet. (B.) Die relative Menge an CAT-mRNA (%) nach Zugabe des Transkriptions-Hemmstoffs (zum Zeitpunkt 0 h) wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Regressionsgeraden hat das Grafikprogramm *Signaplot* (Jandel Scientific) errechnet. Die Halbwertszeit der CAT-mRNA wurde aus der Kurve durch Extrapolation ermittelt. →

A.



B.



2.14 Ein kurzes Kollagenasepromotor-Konstrukt wird durch eine subinhibitorische Anisomycin-Konzentration schwach induziert

Die zur Hemmung der TPA-Induktion der endogenen Kollagenase notwendige Anisomycin-Konzentration wurde in einem Dosisabhängigkeits-Experiment bestimmt (Abb. 36). Im gleichen Ansatz wurden die induzierenden Eigenschaften des Proteinsynthese-Hemmstoffs untersucht. Besonderen Wert wurde auf die Beantwortung der Frage gelegt, ob Anisomycin-Konzentrationen, die nicht mehr die zelluläre Proteinsynthese hemmen, ein kurzes Kollagenasepromotor-Konstrukt noch induzieren können. Es sind Gene bekannt, die durch geringe Dosen eines Proteinsynthese-Inhibitors induziert werden: Für die Sofortantwortgene *c-fos* und *c-jun* wurde mit der *nuclear run-on* Methode gezeigt, daß Anisomycin- und Cycloheximid-Konzentrationen von 10 µg/ml die Transkription dieser Gene in konfluenten, ruhenden Fibroblasten (C3H10T1/2) *langanhaltend* und subinhibitorische Konzentrationen (0.05 µg/ml) die Transkription *transient* induzieren (Mahadevan und Edwards, 1991; Edwards u. Mahadevan, 1992). In einem ähnlich durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von logarithmisch wachsenden HeLa-Zellen mit 0.05 µg/ml Anisomycin zu einer schnellen Akkumulation von *c-fos* und *c-jun* mRNA führt, und daß eine gleichzeitige UVC-Behandlung der Zellen eindeutig *negativ* mit der Anisomycin-induzierten Akkumulation der *c-fos*- und *c-jun*-RNAs interferiert (Abb. 35).

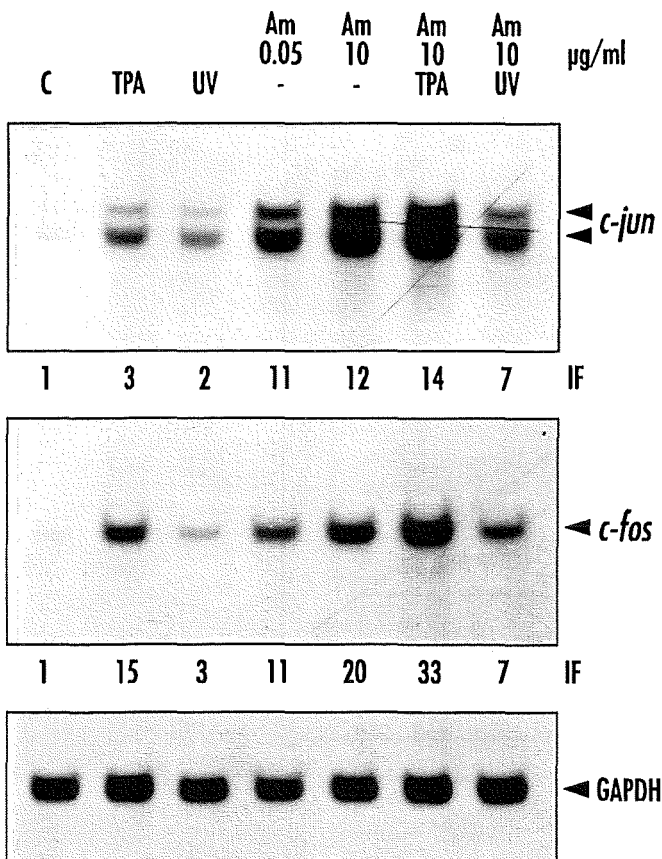


Abb. 35: Anisomycin induziert die schnelle Akkumulation von *c-fos* und *c-jun* mRNA sowohl in proteinsynthese-inhibitorischen (10 µg/ml) als auch in subinhibitorischen (0.05 µg/ml) Konzentrationen. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben 45 min lang mit 60 ng/ml TPA oder 40 J/m² UVC (UV) bzw. 55 min lang mit 0.05 µg/ml oder 10 µg/ml Anisomycin (Am) behandelt, bevor die Zellen lysiert und die Poly(A)⁺-mRNA-Fraktion präpariert wurde (Rahmsdorf et al., 1987). 8 µg Poly(A)⁺-mRNA wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit Proben für *c-jun*, *c-fos* und GAPDH hybridisiert (Stein et al., 1989). Vor der Berechnung der Induktionsfaktoren (IF), wurden die akkumulierten Mengen an spezifischer *c-jun* bzw. *c-fos*-mRNA gegen das GAPDH-Signal korrigiert. Die gezeigten Autoradiogramme wurden 3 Tage lang bei -80° C exponiert.

durch den Phorbol ester. Es wurden Konzentrationen von 100 µg/ml bis 0.01 µg/ml Anisomycin getestet. Die Verdünnungen des Proteinsynthese-Inhibitors wurden so hergestellt, daß gleiche Volumina Lösungsmittel zu den Zellen gegeben werden konnten.

Die TPA-induzierte Akkumulation von Kollagenase-spezifischem Transkript wird durch 100 µg/ml Anisomycin und 10 µg/ml Anisomycin effizient gehemmt. Das sind Dosen, die die zelluläre Proteinsynthese unterbinden (Edwards u. Mahadevan, 1992). 1 µg/ml Anisomycin hemmt die Induktion der Kollagenasetranskription zwar noch gut, aber nicht mehr vollständig. Geringere Konzentrationen interferieren nicht mit der TPA-Induktion des endogenen Gens (Abb. 36, unten).

100 µg/ml und 10 µg/ml Anisomycin induzieren sehr effektiv die Akkumulation der mRNA eines kurzen Kollagenasepromotor-Konstrukts (-136/+63 CAT5). Mit der Verringerung der Anisomycin Konzentration auf 1 µg/ml und 0.1 µg/ml nimmt die induzierende Wirkung stark ab. Eine Konzentration von 0.01 µg/ml aktiviert die Transkription des Genkonstrukts nicht (siehe die Induktionsfaktoren (IF), die aus den laserdensitometrisch gemessenen und gegen die Plasmidbande korrigierten Signalstärken errechnet wurden; Abb. 36, oben). Das cotransfizierte α -Globinpromotor-Konstrukt (Gilman, 1988) wird gleichermaßen durch Anisomycin-Konzentrationen von 100 µg/ml bis 10 µg/ml stark und durch die geringeren Konzentrationen schwach induziert (Abb. 36, Mitte). Auch Puromycin (50 µg/ml) stimuliert die Akkumulation von α -Globin-mRNA (nicht gezeigt).

Das zeigt, daß die inhibierende und die stimulierende Wirkung von Anisomycin auf die Transkription des Kollagenasepromotors auf zwei unterschiedlichen Wirkungen des Anisomycins beruhen: Die inhibitorische Wirkung auf der Fähigkeit des Anisomycins, Proteinsynthese zu hemmen und die stimulierende Wirkung auf einer Eigenschaft, die unabhängig von der Hemmung der Proteinsynthese ist.

2.15 Der zeitliche Ablauf der Induktion von Kollagenasegen-CAT-Konstrukten durch TPA und Anisomycin

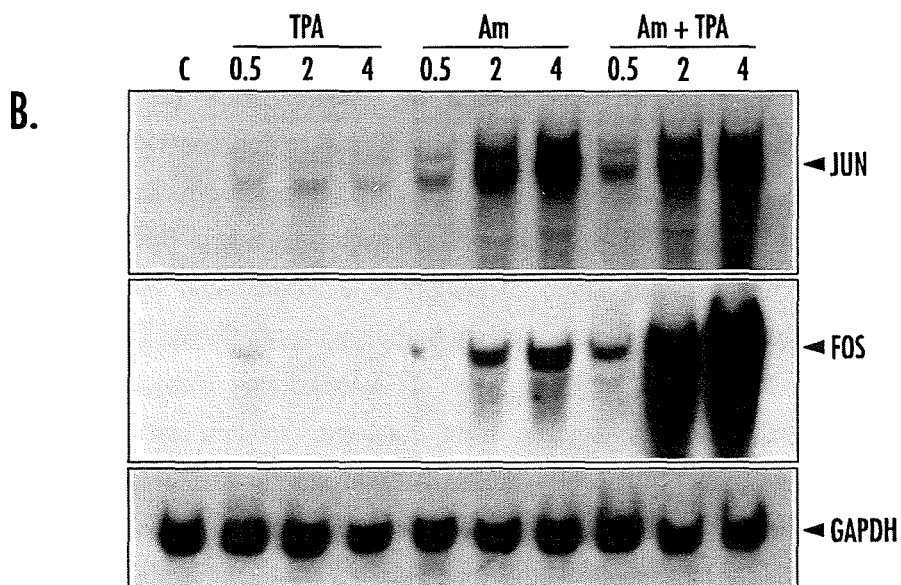
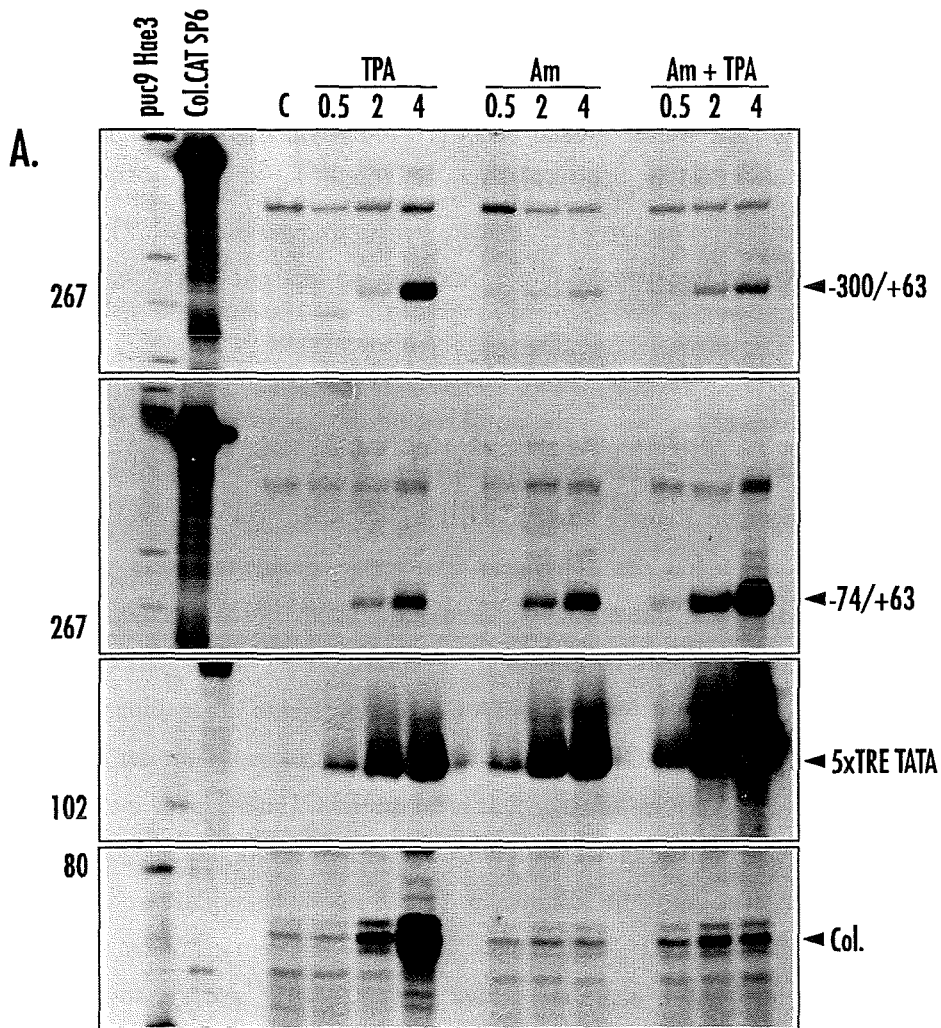
In der Einleitung wurde der zeitliche Ablauf der Kollagenaseexpression beschrieben und vorgeschlagen, daß die verzögert einsetzende Transkription durch die zunächst notwendige Neusynthese aktivierender Faktoren erklärt werden könnte. Um festzustellen, ob sich die Induktionskinetiken von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten und des endogenen Gens unterscheiden, wurde im nachfolgend gezeigten Experiment die zeitliche Änderung der TPA- und Anisomycin-induzierten mRNA-Akkumulation eines langen Kollagenasepromotor-Konstrukts (-300/+63 CAT5), eines kurzen Kollagenasepromotor-Konstrukts (-74/+63 CAT5), eines Minimalpromotors mit multimeren AP-1-Bindestellen (5xTRE TATA CAT6) und der zellulären Gene Kollagenase I, *c-jun* und *c-fos* bestimmt (Abb. 37).

Etwa zwei Stunden lang induzieren TPA bzw. Anisomycin die Akkumulation der -300/+63 CAT5-Konstrukt-mRNA mit der gleichen Potenz, was sich auch in der additiven Wirkung beider Induktoren

wiederspiegelt. In dieser Zeit werden präexistierende Transkriptionsfaktoren aktiviert. Ähnlich wie beim endogenen Gen induziert der Phorbol ester, aber nicht Anisomycin, nach zwei Stunden eine drastische Zunahme der mRNA-Akkumulationsrate, was in diesem Fall gleichbedeutend mit einer Steigerung der Transkriptionsrate ist. Dieser Prozeß benötigt Proteinsynthese und könnte auf der TPA-induzierten Aktivierung von transkriptionsfördernden Faktoren oder auf der Entfernung inaktivierender Faktoren, die 5' von Position -151 binden (siehe Ergebnisse, Teil 2), beruhen. Unterbindet man die TPA-induzierte Neusynthese dieser Faktoren, so bleibt die Transkriptionsrate konstant.

Die Interpretation der Beobachtung wird durch die Analyse von Konstrukten unterstützt, denen die 5'-flankierenden Promotorbereiche fehlen, woran die transkriptionsmodulierenden Faktoren binden. Die TPA-induzierte Transkriptionsrate, wie auch die Anisomycin- und Anisomycin/TPA-induzierten Transkriptionsraten AP-1-abhängiger Konstrukte (5xTRE TATA CAT6, -74/+63 CAT5) bleiben konstant, sodaß die mRNA-Mengen mit der Zeit linear ansteigen. Die induzierende Potenz des Proteinsynthese-Hemmstoffs wird auch mit einem weiteren Experiment beschrieben, in dem die Kinetik der Anisomycin-induzierten mRNA-Akkumulation eines kurzen Kollagenasepromotor-Konstrukts (-136/+63 CAT5) und eines 5xTRE TATA CAT6-Konstrukts über einen längeren Zeitraum verfolgt wurde (Abb. 38). Die mRNA-Menge steigt ohne Verzögerung mit der Zeit linear an. Ein Maximum wird in dem untersuchten Zeitabschnitt nicht erreicht. Unterschiede zwischen den beiden Konstrukten bestehen nur in der erhöhten Aktivität des 5xTRE-Konstruktes gegenüber dem Kollagenasepromotor-Konstrukt, was durch die multimeren AP-1-Bindestellen erklärt werden kann.

Vergleicht man die Induktionskinetiken AP-1-abhängiger Konstrukte mit dem zeitlichen Ablauf der Induktion von Sofortantwortgenen (IEG, engl. *immediate early-response genes*), so stellt man Gemeinsamkeiten fest: AP-1-abhängige Konstrukte und IEG werden durch TPA und Anisomycin schnell induziert, die TPA-induzierte mRNA-Akkumulation ist unabhängig von Proteinsynthese und Anisomycin und TPA steigern zusammen synergistisch die Akkumulation der Transkripte. Unterschiede bestehen in der Hinsicht, daß die TPA-induzierte Transkription von *c-jun* und *c-fos* innerhalb kurzer Zeit ihr Maximum erreicht und schnell auf ein niedrigeres Niveau zurückkehrt (Abb. 37). Die drastische *c-jun*- und *c-fos*-mRNA-Akkumulation nach Anisomycin-Behandlung wird durch drei Prozesse hervorgerufen: Erstens durch transkriptionelle Aktivierung, zweitens durch Hemmung der Transkriptionsabschaltung und drittens durch Stabilisierung der RNAs (Rahmsdorf et al., 1987; Edwards und Mahadevan, 1992). Die TPA-induzierte Transkription von Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten ist dagegen nicht transient, sondern im untersuchten Zeitabschnitt konstant. Mit einer ähnlichen Kinetik induziert Anisomycin die Anhäufung von CAT-Transkripten. Die Möglichkeit der Stabilisierung von CAT-Transkripten durch Anisomycin wurde, wie gezeigt, ausgeschlossen. Die langanhaltende Aktivierung eines AP-1-abhängigen Genkonstrukts durch TPA kann dadurch erklärt werden, daß die TPA-induzierte Synthese von AP-1-Proteinen die Transkription der Genkonstrukte fördert. Im Unterschied dazu hemmen neu synthetisierte Jun- und Fos-Proteine die Transkription der *c-fos* und *c-jun*-Gene (siehe Einleitung 1.7.3).



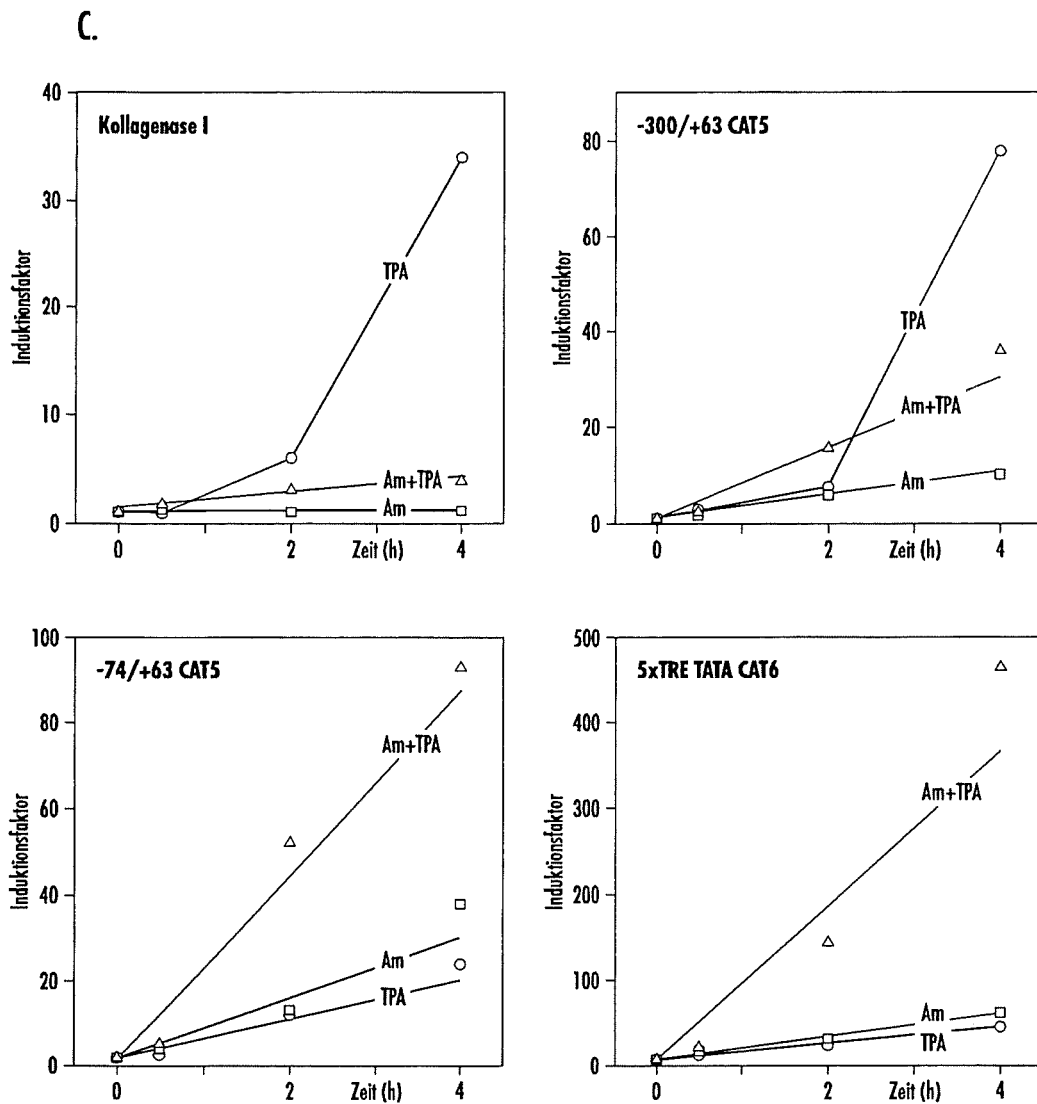


Abb. 37: Kinetik der TPA- und Anisomycin-induzierten Akkumulation von RNAs verschiedener Herkunft. HeLa tk⁻ Zellen wurden mit -300/+63 CAT5, -74/+63 CAT5 und 5xTRE TATA CAT6 Plasmid-DNA wie in Abb. 23 beschrieben transient transfiziert. Die Zellen wurden nicht behandelt (C), mit dem Phorbol ester (TPA, 60 ng/ml), mit Anisomycin (Am, 10 µg/ml) oder mit Anisomycin und TPA zusammen (Am + TPA) für 0,5, 1 und 4 Stunden behandelt. (A.) Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden im RNase-Schutz-Experiment auf die akkumulierten Mengen spezifischer Transkripte (Pfeile) analysiert. Gezeigt sind Autoradiogramme nach zweitägiger Exposition. Col., Expression der endogenen Kollagenase; Col.CAT SP6, verwendete Riboprobe; puc9 Hae3, Größenmarker. (B.) Northern-Analyse der Transkriptmengen von *c-jun* und *c-fos*. Hierfür wurden 20 µg Gesamt-RNA des oben beschriebenen Experiments eingesetzt. Die Proben für die Northern-Hybridisierung sind in Stein et al. (1992) beschrieben. GAPDH-mRNA (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) dient als Standard für gleiche Mengen eingesetzter RNA. (C.) Darstellung des zeitlichen Verlaufs der mRNA-Akkumulation. Das in (A.) gezeigte Experiment wurde densitometrisch ausgewertet und die erhaltenen Signalstärken in Induktionsfaktoren umgerechnet. Die bei der kombinierten Anisomycin- und TPA-Behandlung akkumulierten mRNA-Mengen des 5xTRE-Konstrukts wurden aus einem schwächer exponierten Autoradiogramm bestimmt. Beachte die unterschiedlichen Skalen der Ordinate.

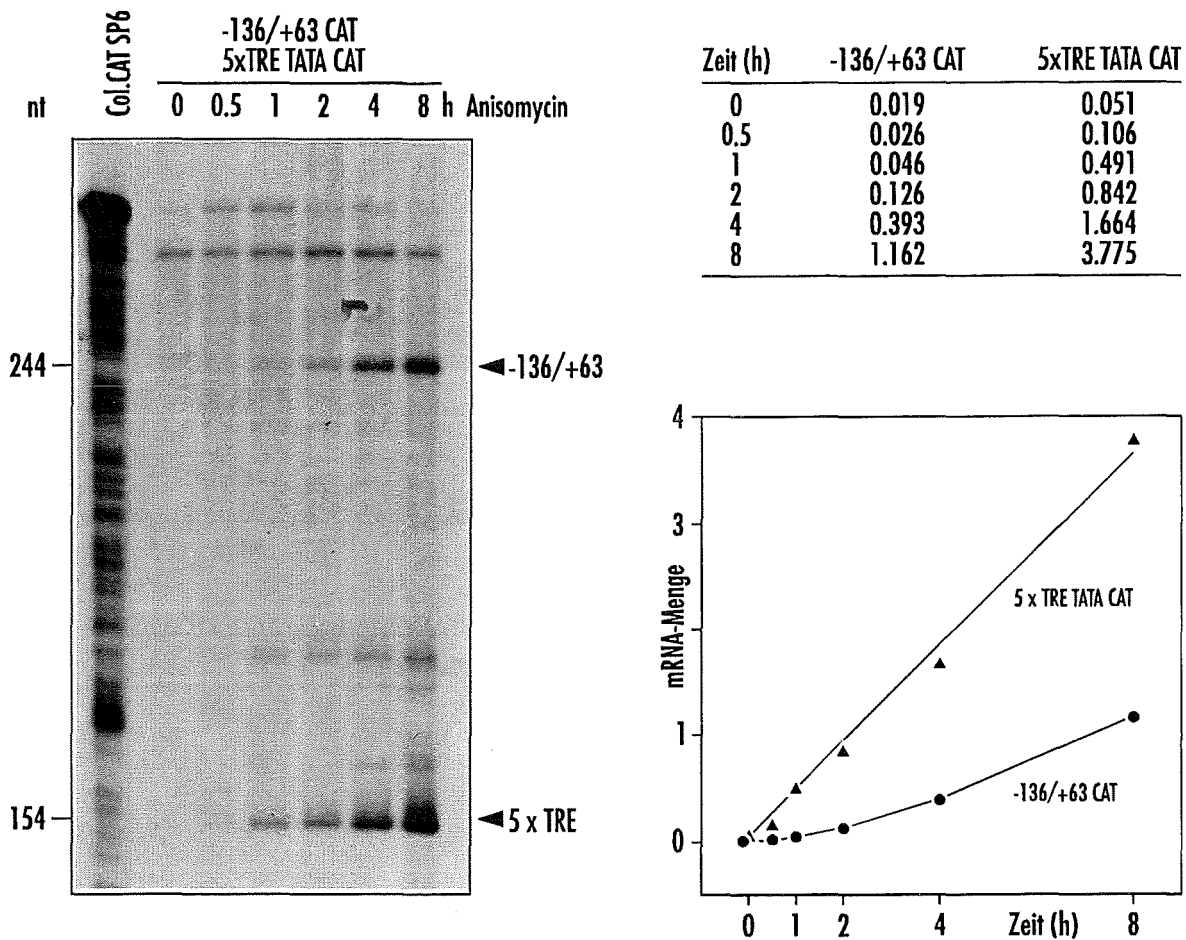


Abb. 38: Kinetik der Anisomycin-induzierten Akkumulation von CAT-mRNA. HeLa tk⁻ Zellen wurden mit jeweils 10 µg -136/+63 CAT5 und 5xTRE TATA CAT6 Plasmid-DNA wie in Abb. 23 beschrieben cotransfiziert und mit 10 µg/ml Anisomycin für 0, 0.5, 1, 2, 4 und 8 h behandelt. Die Riboprobe Col.CAT SP6 eignet sich sowohl zum Nachweis der -136/+63 CAT5-spezifischen RNA als auch zum Nachweis des 5xTRE TATA CAT6-Transkripts im gleichen Ansatz. Mit der Kollagenase-CAT-mRNA hybridisieren 244 nt der Probe, während die CAT-mRNA über 154 nt homolog ist. Die Signalstärken wurden densitometrisch bestimmt (Tabelle, oben rechts). In der Grafik wurden die Signalstärken (entsprechend den relativen mRNA-Mengen) gegen die Induktionszeit aufgetragen.

2.16 Anisomycin induziert die Transkription eines AP-1 abhängigen Promotorkonstrukts in HeLa-Zellen, aber nicht in undifferenzierten F9 Teratokarzinoma-Stammzellen

Das Kollagenase-TRE ist, wie wiederholt gezeigt wurde, das auf Anisomycin reagierende Promotorelement. Es soll nun aufgeklärt werden, welche Transkriptionsfaktoren durch Anisomycin aktiviert und welche intrazellulären Signalwege dafür benutzt werden. Sehr wahrscheinlich werden die präexistierenden AP-1-Komponenten (Jun und/oder Fos) durch Anisomycin posttranslational modifiziert. Deshalb sollte Anisomycin in Zellen, die keine basale AP-1-Aktivität besitzen, ein AP-1-abhängiges Konstrukt nicht aktivieren können. Das ist in der Tat der Fall.

In logarithmisch wachsenden, undifferenzierten F9 Teratokarzinoma-Stammzell-Kulturen (F9) kann, im Gegensatz zu den meisten Zellen, keine basale AP-1-Aktivität nachgewiesen werden. Phorbolster, die in vielen Zellen zu einer koordinierten Akkumulation von *c-fos* und *c-jun* mRNAs und zu einem Anstieg der AP-1-Bindeaktivität führen, induzieren in F9-Zellen keine *c-jun* Transkription, keine AP-1-Aktivität und keine Transkription TRE-regulierter Gene und Genkonstrukte (Kryszke et al., 1987; Chiu et al., 1989; Auer et al., 1994; Abb. 38). Dementgegen aktiviert die Bestrahlung der Zellen mit physiologischen Dosen UVC (256 nm, 40 J/m²) sowohl die Transkription von *c-jun* und *c-fos*, als auch die AP-1-Bindeaktivität. Auch die mRNA-Akkumulation AP-1-abhängiger Genkonstrukte wird durch UVC induziert (Auer et al., 1994; Abb. 39).

Um zu untersuchen, ob Anisomycin in F9-Zellen genauso wie in HeLa-Zellen ein AP-1-abhängiges Minimalkonstrukt aktiviert, wurden beide Zelllinien mit 5xTRE TATA CAT6 transient transfiziert und 6 Stunden mit Anisomycin, UVC-Strahlung und TPA behandelt. Anisomycin induziert in HeLa-Zellen, aber nicht in F9-Zellen die Akkumulation von 5xTRE TATA CAT-spezifischer mRNA (Abb. 39). Die Anisomycin-Induktion wirkt also über präformiertes AP-1. Phorbolster induzieren ebenfalls nur in HeLa-Zellen die Transkription des transfizierten Genkonstrukts⁷ und des endogenen Kollagenasegens. UVC induziert in beiden Zelllinien die CAT-mRNA-Akkumulation, wenngleich in F9-Zellen mit wesentlich stärkerer Effizienz. Die UVC-Induktion des 5xTRE-Konstrukts wird in F9-Zellen vollständig durch Anisomycin gehemmt. Sie benötigt also die Neusynthese von c-Jun (AP-1). Unerwarteterweise und zur Zeit nicht erklärbar, beobachtet man in HeLa-Zellen ebenfalls eine negative Interferenz zwischen der Anisomycin-Induktion und der UVC-Induktion des 5xTRE TATA CAT-Konstrukts. Wie zuvor für die schnelle Anisomycin-induzierte Akkumulation von *c-jun* und *c-fos*-mRNA beschrieben wurde (Abb. 35), hemmt die UVC-Behandlung der Zellen die Fähigkeit von Anisomycin, ein AP-1-abhängiges Genkonstrukt zu aktivieren. Die Hemmung ist, im Gegensatz zur Situation in F9-Zellen, nicht vollständig, sodaß sich die zugrunde liegenden Mechanismen möglicherweise unterscheiden.

⁷ Die geringen Mengen an scheinbar TPA-induzierter CAT-mRNA in F9-Zellen stammen von der stark radioaktiven UV-Probe und sind beim Laden der Geltaschen übergelaufen (sog. spill over).

2.17 Anisomycin erhöht die AP-1-Bindeaktivität nicht

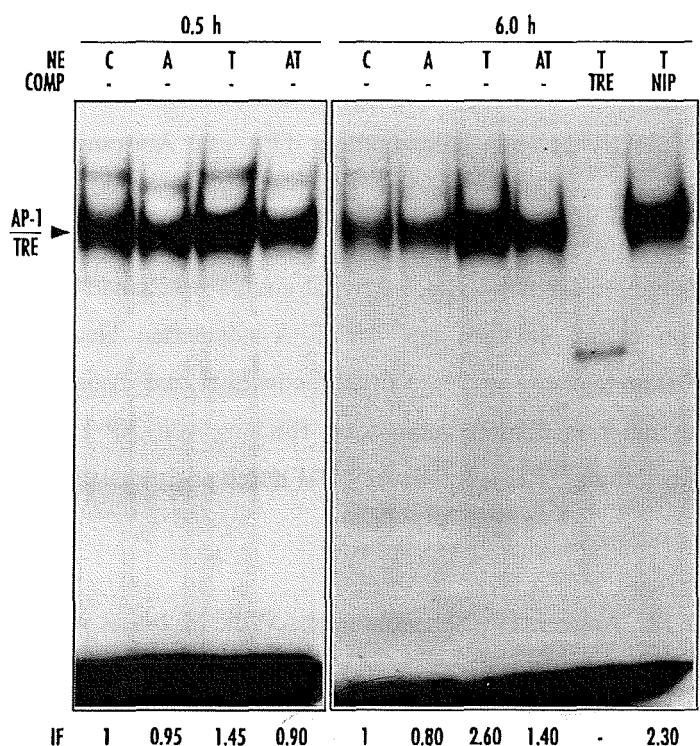
Es sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie Anisomycin AP-1-abhängige Genkonstrukte aktivieren und die TPA-Induktion fördern kann: Entweder durch Verstärkung der AP-1-Bindeaffinität für die TRE-Sequenz oder durch Erhöhung des Transaktivierungspotentials von gebundenem AP-1. Um die Veränderung des Bindeverhaltens von AP-1 zu testen, wurden HeLa tk⁻ Zellen für 30 Minuten und für 6 Stunden mit TPA und Anisomycin behandelt, dann die Kernproteinfraktion präpariert und die Formierung des AP-1/TRE-Komplexes im Gelretardationsexperiment untersucht (Abb. 40).

Abb. 40:

Anisomycin erhöht die AP-1-Bindeaktivität nicht. HeLa tk⁻

Zellen wurden 18 h in serumfreiem DMEM kultiviert (C) und danach mit 60 ng/ml TPA (T), mit 10 µg/ml Anisomycin (A) oder mit TPA in Gegenwart von Anisomycin (AT) behandelt, wobei der Proteinsynthese-Hemmstoff 15 min vor dem Phorbol ester zugegeben wurde. Die Zellen wurden nach 30 min bzw. 6 h geerntet und die Kernproteinfraktion nach Dignam et al. (1983; modifiziert) präpariert. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt und optisch durch Auftrennung von 5 µg Kernextrakt in einem 10%-igen Proteingel mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft (nicht gezeigt). Für die Gelretardationsanalyse wurden 5 µg Kernextrakt und 10 fmol ³²P-TRE-Oligonukleotid (Klenow-markiert) eingesetzt. Die Reaktion wurde wie in "Methoden" beschrieben durchgeführt. Die AP-1-Bindung an das radioaktiv markierte TRE (Pfeil) wird durch einen 100-fachen Überschuss an nicht-markierten TRE-

Oligonukleotiden aufgehoben. Ein unspezifisches Oligonukleotid aus der distalen Kollagenasepromotorregion (NIP-Sequenz und flankierende Basenpaare) kompetiert dagegen nicht um die AP-1-Bindung. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide ist angegeben. Mit dem PhosphoImager-System (Fuji) wurde die Menge an AP-1/³²P-TRE-Komplexen bestimmt, woraus die Induktionsfaktoren (IF) berechnet wurden. NE, Kernextrakt (nuclear extract); COMP, Kompetitor-Oligonukleotid.



TRE (Col. -79/-59): 5' -AGCTTAAGCATGAGTCAGACAGCCG
ATTGCTACTCAGTCTGTCCGCCCTAG-5'

NIP (Col. -231/-205): 5' -ACTGTTTACATGGCAGAGTGTGTCTCC
TGACAAATGTACCGTCTCACACAGAGG-5'

Serumgehungerte, nicht konfluente HeLa-Zellen enthalten eine ungewöhnlich große Menge an AP-1 oder verwandten Faktoren, die in der Lage sind, an ein Kollagenase-TRE-Oligonukleotid *in vitro* zu

binden. Das Transaktivierungspotential des basal gebundenen AP-1 muß sehr niedrig sein, da AP-1-abhängige Gene in HeLa-Zellen ohne Stimulation nur sehr schwach exprimiert werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Faktoren in der Zelle nicht binden und die Bindungsfähigkeit im Zuge der Präparation des Zellextrakts entsteht. In Folge der TPA-Behandlung von HeLa-Zellen oder Fibroblasten wird die c-Jun DNA-Bindedomäne an einer oder mehreren Aminosäureresten (Thr-231, Ser-243 und Ser-249) dephosphoryliert (Boyle et al., 1991), wodurch die DNA-Affinität des Proteins erhöht wird. Außerdem induziert TPA innerhalb von 30 Minuten die Transkription von *c-fos* und *c-jun* und damit auch die unmittelbare *de novo* Synthese von AP-1, was zu einer Zunahme der TRE-gebundenen Aktivität führt (Abb. 40).

Die TPA-induzierte AP-1/TRE-Komplexbildung wird durch Anisomycin-Behandlung der Zellen gehemmt. Ein naheliegender Grund ist, daß keine TPA-induzierte Neusynthese von AP-1 in Gegenwart des Proteinsynthese-Inhibitors stattfinden kann. Allerdings wäre eine Zunahme der AP-1-Bindaktivität nach halbstündiger TPA und Anisomycin-Behandlung zu erwarten gewesen, da die schnelle posttranslationale Modifikation der DNA-Bindedomäne durch TPA proteinsynthese-unabhängig sein sollte. Eine mögliche Erklärung ist, daß auch die nach 30 Minuten gemessene Zunahme der AP-1 Bindeaktivität aus TPA-behandelten Zellen nicht auf der schnellen Modifikation von c-Jun, sondern auf der TPA-induzierten Neusynthese von AP-1 beruht. Das in diesem Zusammenhang wichtige Ergebnis ist aber, daß Anisomycin alleine, im Unterschied zu TPA, nicht zu einer meßbaren verstärkten Bindung von AP-1 an das TRE führt. Es ist naheliegend, daß Anisomycin TRE-gebundenes AP-1 durch posttranslationale Modifikation aktiviert.

2.18 Anisomycin-Behandlung ändert die Mobilität von zellulärem c-Jun

Zur Erfassung der Anisomycin-induzierten, aktivierenden Modifikation der AP-1-Komponenten, wurde das konstitutiv in HeLa-Zellen exprimierte Protein metabolisch markiert. Dazu wurden serumgehungerte Zellen drei Stunden mit ³⁵S-Methionin-Medium inkubiert und dann 30 Minuten mit Anisomycin, 20 Minuten mit ultravioletter Strahlung (256 nm) und 20 Minuten mit TPA induziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und c-Fos bzw. c-Jun mit spezifischen Antikörpern aus dem RIPA-Extrakt herauspräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt (Abb. 41).

Die TPA-Behandlung der HeLa-Zellen führt innerhalb von 20 Minuten zu einem stark veränderten Laufverhalten des c-Fos-Proteins. Die Modifikation ist unempfindlich gegenüber Proteinsynthesehemmung (nicht gezeigt). Die durch UVC und Anisomycin verursachten Mobilitätsänderungen des Fos-Proteins sind geringfügig.

Dagegen modifiziert Anisomycin binnen 30 Minuten das c-Jun-Protein mit der gleichen Effizienz wie UVC-Strahlung, wie an den weniger mobilen c-Jun-Isoformen zu sehen ist. Die Anisomycin-induzierte Modifikation bleibt bei nachfolgender Behandlung mit TPA in gleicher Stärke erhalten.

Die Modifikation von c-Jun, nach Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster alleine, ist anderer Art und ändert kaum das Mobilitätsverhalten von c-Jun in einem eindimensionalen Gel. Es ist bekannt, daß TPA eine Dephosphorylierung in der DNA-Bindedomäne von c-Jun (Peptid a) und eine verstärkte Phosphorylierung in der Transaktivierungsdomäne (Peptid x; S. Gebel, 1992; Radler-Pohl et al., 1993) bewirkt.

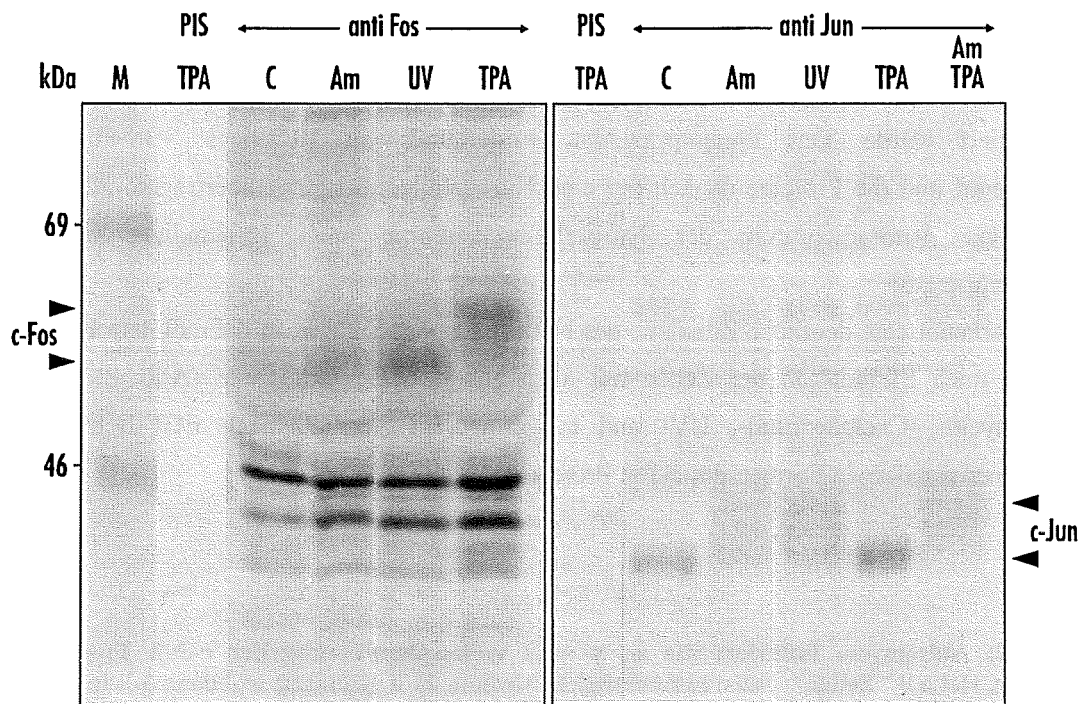


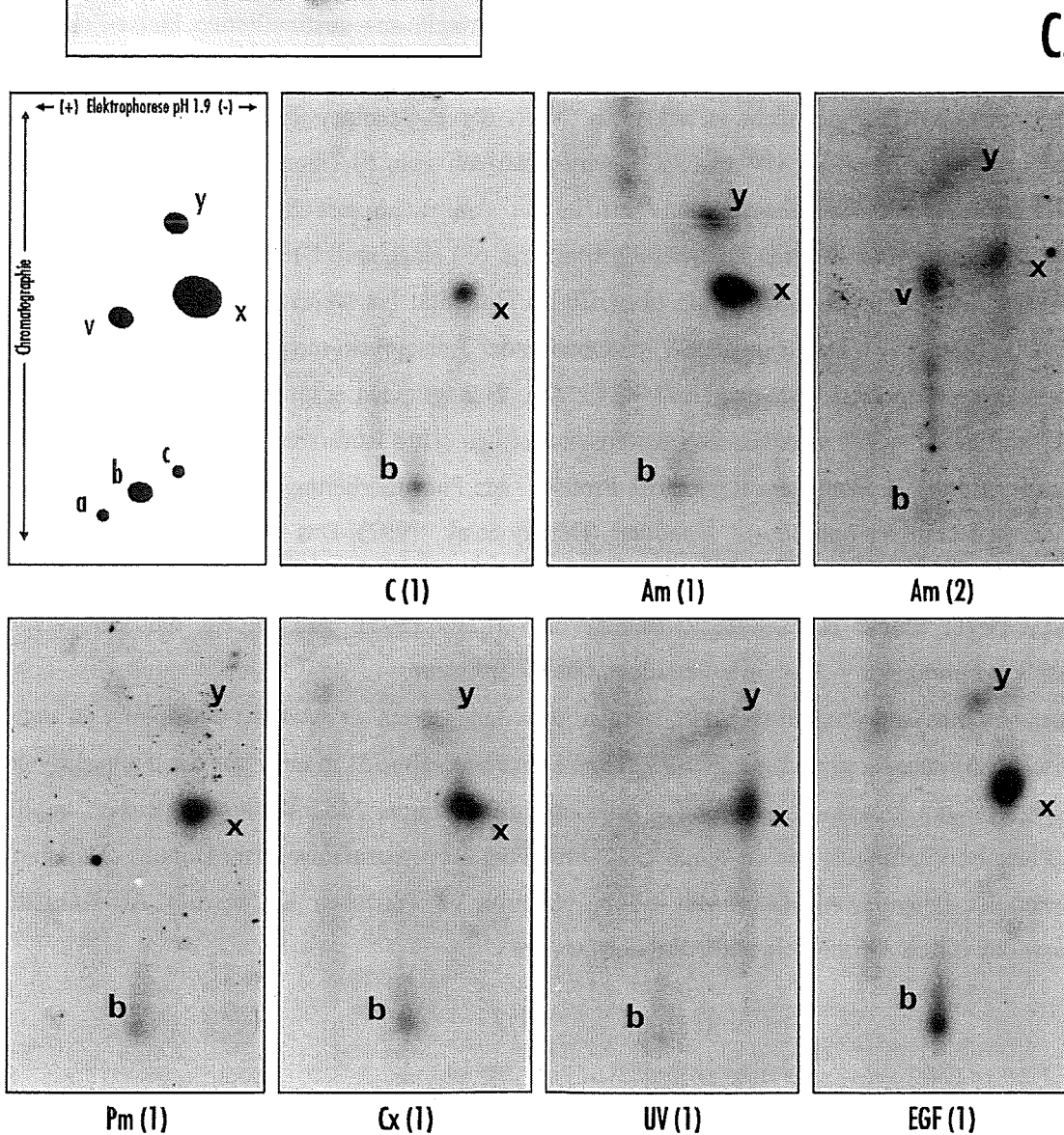
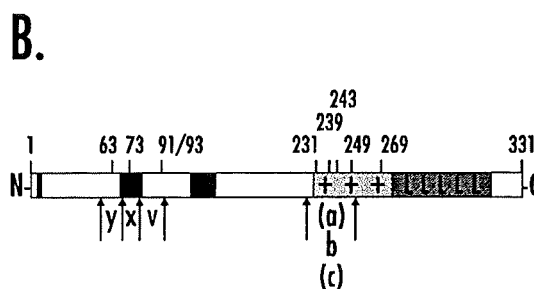
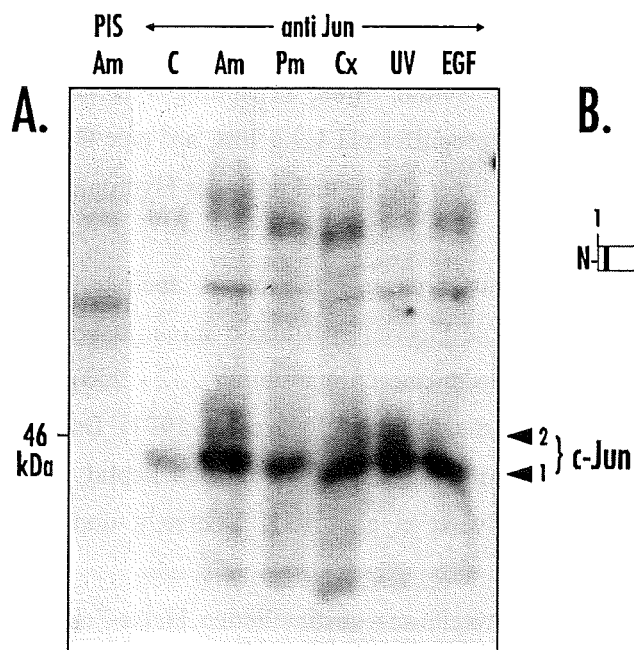
Abb. 41: Anisomycin-Behandlung von HeLa tk⁻ Zellen führt zu einer schnellen posttranslationalen Modifikation von c-Jun, aber nicht von c-Fos. 4×10^5 HeLa tk⁻ Zellen wurden 24 h in Vollmedium inkubiert und dann 20 h in serumfreiem DMEM gehalten. Anschließend wurde das Medium gegen methioninfreies RMPI ausgetauscht, 4.6 MBq ³⁵S-Methionin pro ml Medium zugegeben und die Zellen 3 h inkubiert. Die Zellen wurden 30 min mit Anisomycin (Am, 10 µg/ml), 20 min mit ultravioletter Strahlung (UV, 256 nm, 40 J/m²) und 20 min mit TPA (60 ng/ml) behandelt. Bei gleichzeitiger Anisomycin- und TPA-Behandlung (Am/TPA) wurde der Proteinsynthese-Hemmstoff 10 min vor dem Phorbolster eingesetzt. Kontrollzellen blieben unbehandelt (C). Die Zellen wurden in eiskaltem RIPA-Puffer (inkl. 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A, 1 µg/ml Aprotinin und 0.5 mM PMSF) lysiert. C-Fos und c-Jun wurden mit spezifischen Antikörpern (anti FosX, IGEN; anti c-Jun/AP1, *Oncogene Science*) aus den Extrakten immunpräzipitiert (siehe "Methoden"). Zur Kontrolle wurden zuvor aus den gleichen Extrakten Immunpräzipitationen mit dem jeweiligen Präimmunserum (PIS) durchgeführt. Die TPA-Extrakt/PIS-Präzipitation ist exemplarisch gezeigt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit PPO aktiviert, getrocknet und autoradiographiert.

2.19 Anisomycin phosphoryliert c-Jun in denselben Peptiden wie UVC und EGF

Um die Phosphorylierungsstellen im c-Jun Protein nach Anisomycin-Behandlung zu kartieren, wurden HeLa tk⁻ Zellen 24 Stunden in DMEM ohne Serum gehungert. Anschließend wurden die Zellen zur Markierung der konstitutiv exprimierten Proteine 3 Stunden lang mit ³²P-Orthophosphat (18.5 MBq/1.5 ml Medium) markiert. Sodann wurden die Zellen jeweils 20 Minuten lang mit Anisomycin (Am, 10 µg/ml), Puromycin (Pm, 50 µg/ml), Cycloheximid (Cx, 10 µg/ml), ultravioletter Strahlung (UVC, 40 J/m²) und epidermalem Wachstumsfaktor (hu EGF, 1 ng/ml) behandelt, bevor sie geerntet und c-Jun mit einem spezifischen Antikörper aus den Zellysaten präzipitiert wurde. Das Immunpräzipitat wurde über ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine danach auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Abbildung 42 A zeigt das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran nach 15-stündiger Exposition bei Raumtemperatur.

Man erkennt eine deutliche Zunahme des Netto-Phosphat-Einbaus in die mobilere Form des c-Jun Protein nach Stimulation der Zellen mit allen angewandten Induktoren (Abb. 42 A, < 1). Nach Anisomycin-, Cycloheximid-, UV- und in geringerem Ausmaß nach EGF-Behandlung treten langsamer wandernde Formen des c-Jun Proteins auf (< 2).

Abb. 42: Anisomycin induziert die α -, γ - und ν -Phosphorylierung der c-Jun Transaktivierungsdomäne. HeLa tk⁻ Zellen wurden in serumfreiem Medium 24 h gehungert und dann 3 h in phosphatfreiem DMEM mit ³²P-Orthophosphat (1 mCi/1.5 ml) inkubiert. Die Zellen blieben unbehandelt (C) oder wurden mit Anisomycin (Am, 10 µg/ml), Puromycin (Pm, 50 µg/ml), Cycloheximid (Cx, 10 µg/ml), UV-Strahlung (UV, 40 J/m²) oder mit menschlichem epidermalem Wachstumsfaktor (EGF, 1 ng/ml, *Sigma*) behandelt. Nach 20 min wurden die Zellen lysiert und das c-Jun Protein mit einem c-Jun-spezifischen Antikörper (c-Jun/AP1, Oncogene Science) präzipitiert. (A.) Eindimensionale Auftrennung des immunpräzipitierten, ³²P-markierten c-Jun Proteins auf einem 10%-igen SDS-PAGE. Gezeigt ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran, auf die die Proteine übertragen wurden. Die Pfeilköpfe geben die Lage der c-Jun spezifischen Banden an, die weniger mobile c-Jun Isoform ist mit (2) gekennzeichnet. PIS, Präimmumserum. (B.) Skizze des c-Jun Proteins nach Angel u. Herrlich (1994). Wichtige Aminosäuren sind numeriert. Schwarze Bereiche deuten Transaktivierungsdomänen an. Die DNA-Bindedomäne ist grau schattiert dargestellt. Pfeile symbolisieren Trypsin-Spaltstellen. Die Phospho-Peptide γ , α , a, b und c werden im Text behandelt. (C.) 2D-Auftrennung von Phospho-Peptiden nach tryptischem Verdau von c-Jun. Die c-Jun spezifischen Banden wurden ausgeschnitten und die Proteine aus der Membran eluiert. Die Proteine wurden mit 2 x 5 µg Trypsin (Boehringer Mannheim) verdaut, mit Perameisensäure oxidiert, und eingetrocknet. Vergleichbare Aktivitäten (ca. 100 - 150 Cerenkow-cpm) wurden auf eine TLC-Platte aufgetragen und durch Elektrophorese bei pH 1.9 mit 1000 V Spannung 25 min lang nach der Größe aufgetrennt. Bei diesem pH-Wert tragen die meisten Peptide eine positive Ladung und wandern im elektrischen Feld zur Kathode. Die Chromatographie der Peptide erfolgte senkrecht zur Elektrophoreserichtung in einer Butanol/Pyridin/Essigsäure-Lösung. Die TLC-Platten wurden 14 Tage bei -80° C mit einer Verstärkerfolie autoradiographiert. Die Phospho-Peptide sind nach der 2D-Trennung diagonal angeordnet und bilden ein typisches Muster, wie in der Schemazeichnung zu sehen ist. c-Jun aus Anisomycin-behandelten Zellen zeichnet sich durch stark phosphorylierte α - und γ -Peptide (Phosphorylierung von Ser-73 und Ser-63 der Transaktivierungsdomäne) aus. Zusätzlich wird in den langsamer wandernden c-Jun Isoformen das ν -Peptid phosphoryliert, das sonst nur nach UV-Behandlung, aber nicht nach TPA-Behandlung auftritt. →



Die mobileren c-Jun Banden (< 1) und bei der Anisomycin-Induktion auch die weniger mobilen c-Jun Isoformen (< 2) wurden aus der Membran ausgeschnitten, von der Nitrozellulose eluiert, mit Trypsin⁸ verdaut, oxidiert und lyophilisiert (Hunter u. Sefton, 1980; Scheidtmann et al., 1982; Boyle et al., 1991 b). Die Peptide wurden in Elektrophoresepuffer pH 1.9 gelöst, auf eine Cellulose-Platte aufgetragen und nach zwei Dimensionen, d.h. nach der Größe und nach der Hydrophobizität, aufgetrennt.

In Abbildung 42 C ist ein schematisiertes Peptidmuster des c-Jun Proteins nach tryptischem Verdau und 2-dimensionaler Auftrennung dargestellt. Die Flecken a, b und c stammen von einem Peptid des c-Jun Proteins aus der Nähe der DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 227 - 253). Dieses Peptid trägt entweder drei (a), zwei (b) oder eine (c) Phosphatgruppe (Boyle et al., 1991). Das Peptid x ist ein Teil der zweiten Transaktivierungsdomäne (Aminosäuren 71 - 78). Das Peptid y wurde genau daneben lokalisiert (Aminosäuren 57 - 70; Pulverer et al., 1991; Übersicht und weitere Referenzen in Radler-Pohl et al., 1993).

Das Verdauemuster von immunpräzipitiertem c-Jun Protein aus unstimulierten HeLa-Zellen zeigt die dominanten Flecken b und x. Die schwächeren a- und c-Flecken sind wegen der geringen endogenen c-Jun Mengen nicht zu erkennen. Nach der Behandlung der Zellen mit Anisomycin, Puromycin, Cycloheximid, UV und EGF wird innerhalb von 20 Minuten das x-Peptid verstärkt phosphoryliert. Die Phosphorylierung betrifft den Aminosäurerest Serin-73. Gleichzeitig wird Phosphat in das y-Peptid (Phosphorylierung von Serin-63) eingebaut. Die y-Peptid Phosphorylierung des c-Jun-Proteins durch Anisomycin übertrifft an Quantität bei weitem die Wirkung der anderen getesteten Induktoren. Das tryptische Verdauemuster der Anisomycin-modifizierten c-Jun-Banden mit langsamerem Migrationsverhalten (Abb. 42 C: Am, 2) zeigt einen zusätzlichen Flecken. Dieser, mit (v) bezeichnete Flecken wird nur in den weniger mobilen c-Jun Isoformen gefunden und stammt aus einem Peptid der N-terminalen Region des Proteins. Als Phosphorylierungsstellen im v-Peptid werden die Threoninreste-91 und Thr-93 diskutiert (Devary et al., 1992). Das v-Peptid ist für die H-Ras- und UVC-induzierte c-Jun Modifikation typisch (Binétruy et al., 1991; Smeal et al., 1991; Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Anisomycin induziert also die Phosphorylierung der v-, x- und y-Peptide mit hoher Effizienz.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Anisomycin *in vivo* die Phosphorylierung von kritischen Aminosäuren (Ser-63, Ser-73, Thr-91 und/oder Thr-93) in einer für die Transaktivierung wichtigen c-Jun Domäne bewirkt. Die Anisomycin-induzierten Modifikationen gleichen qualitativ den Phosphorylierungen, wie sie durch UVC-Strahlung hervorgerufen werden. Damit ist Anisomycin ein äußerst potenter Aktivator von c-Jun, wodurch zu verstehen ist, warum AP-1-abhängige Konstrukte durch Anisomycin stark aktiviert werden.

⁸ Trypsin schneidet Proteine durch Spaltung hinter den Aminosäuren Lysin oder Arginin in spezifische Peptide

2.20 Anisomycin induziert die Aktivierung von c-Jun-spezifischen Kinasen (JNK)

Nach der Identifikation des durch Anisomycin aktivierten Transkriptionsfaktors (c-Jun) ist die nächste Aufgabe die Charakterisierung des Mechanismus der c-Jun Phosphorylierung. Es sind zwei Wege denkbar, über die Anisomycin die c-Jun Phosphorylierung induziert: Die generelle Translationshemmung könnte die Synthese einer labilen Phosphatase verhindern, die c-Jun fortlaufend dephosphoryliert. Dazu müssten die c-Jun Transaktivierungsdomänen spontan kinasiert werden, wofür es zur Zeit keine Hinweise gibt. Außerdem würde dadurch nicht die Aktivierung AP-1 abhängiger Genkonstrukte durch niedrige Anisomycin-Konzentrationen, die die Proteinsynthese nicht hemmen, erklärt werden. Drittens wäre die Evolution eines solchen Mechanismus aus ökonomischen Gründen nicht sinnvoll. Viel wahrscheinlicher ist die spezifische Induktion einer c-Jun modifizierenden Kinase durch Anisomycin.

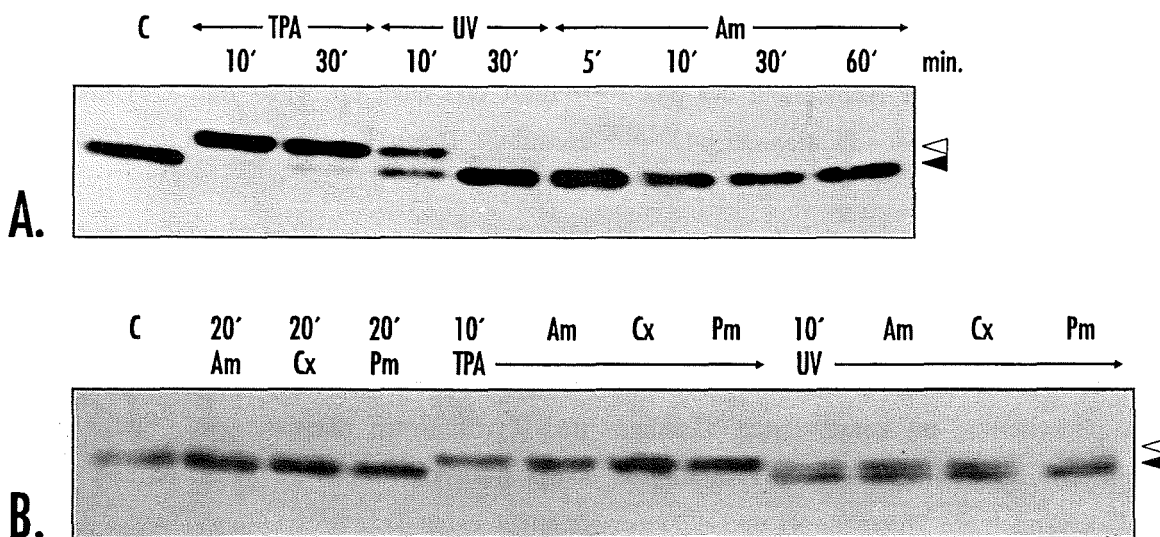


Abb. 43: Phorbolster und UV-Strahlung, aber nicht Anisomycin, aktivieren die p42^{MAPK}-Kinase. Logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen wurden entweder nicht behandelt (C) oder mit Phorbolster (TPA, 60 mg/ml), UVC-Strahlung (UV, 256 nm, 40 J/m²), Anisomycin (Am, 10 µg/ml), Cycloheximid (Cx, 10 µg/ml) oder Puromycin (Pm, 50 µg/ml) behandelt. In (B.) wurden die Proteinsynthese-Hemmstoffe 10 min vor der TPA- und UV-Induktion eingesetzt. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen wie in Leever und Marshall (1992) beschrieben lysiert. 30 µg Gesamtzelleextrakt wurde in einem 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem spezifischen Antikörper gegen p42^{MAPK} (*anti Erk-2 rabbit # 121*; erhalten von Chris Marshall, ICRF, London) nachgewiesen (siehe Methoden, 5.8.5). (A.) TPA-Stimulation überführt p42^{MAPK} (schwarzer Pfeil) innerhalb 10 min vollständig und in eine langsamer migrierende Form (weißer Pfeil), die länger als 30 min beständig ist. UVC-Bestrahlung aktiviert etwa 50 % der p42^{MAPK} für kurze Zeit. Anisomycin-Behandlung aktiviert dagegen in dem getesteten Zeitraum die p42^{MAPK} nicht. (B.) Auch Cycloheximid und Puromycin aktivieren nicht die p42^{MAPK}. Die posttranskriptionelle Modifikation der p42^{MAPK} durch TPA und UVC wird durch die Vorbehandlung der Zellen mit Proteinsynthese-Hemmstoffen nicht gestört.

Als guter Kandidat käme die p42^{MAPK} (MAP-2 Kinase, MAPK2, ERK2) in Frage. MAP-Kinasen (MAPK) phosphorylieren ihre Substrate an Serin- oder Threoninresten im Sequenzmotiv P/L X T/S P⁹. Substrate der p42^{MAPK} sind unter anderem die Phospholipase A2 (Lin et al., 1993), die Kinasen p90^{rsk} (Erikson et al., 1991), MAPKAP Kinase-2 (Stokoe et al., 1992) und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc (Seth et al., 1991), Elk-1 (Übersicht in Treisman, 1994) und c-Jun (Pulverer et al., 1991). Die Erforschung der Signaltransduktionswege rund um MAPK hat in den letzten drei Jahren eine Fülle von Ergebnissen gebracht. Durch UVC-Strahlung und Wachstumsfaktoren stimulierte Rezeptor-Thyrosinkinase (z.B. EGF-Rezeptor) aktivieren die p42^{MAPK} via p21 ras, Raf-Kinase und MAP Kinase Kinase. Phorbolster aktivieren die p42^{MAPK} über die Proteinkinase C und Raf (Radler-Pohl et al., 1993; Sachsenmaier et al., 1994). Raf-unabhängige Signalwege zu MAPK sind ebenfalls beschrieben (Lange-Carter et al., 1993).

Um zu untersuchen, ob Anisomycin die p42^{MAP} Kinase aktiviert, wurden HeLa-Zellen mit TPA, UVC-Strahlung und Anisomycin behandelt. Durch aktivierende Agenzien wie TPA und UVC wird die p42^{MAPK} an Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert, was zu einem veränderten Laufverhalten bei der Gelelektrophorese führt. In Abbildung 43 ist zu sehen, daß Anisomycin-Behandlung nicht zur Aktivierung der p42^{MAPK} führt und nicht die TPA- und UVC-induzierte posttranskriptionale Modifikation der p42^{MAPK} beeinflusst. Dieses Ergebnis wird durch Cano et al. (1994) bestätigt.

Die Abbildung 44 zeigt, daß Anisomycin die Phosphorylierung von c-Jun über einen noch nicht charakterisierten Signaltransduktionsweg, an dessen Ende eine Jun-spezifische Kinase (JNK, c-Jun N-terminale Proteinkinase; Hibi et al., 1993) aktiviert wird, induziert. Die JNK, deren Hauptform ein Molekulargewicht von 46 kDa (JNK1) hat und wie p44^{MAPK} (ERK1) und p42^{MAPK} (ERK2) durch Phosphorylierung an konservierten Threonin- und Tyrosinresten aktiviert wird, bindet an die aminoterminalen Hälfte des c-Jun Proteins und phosphoryliert ihrerseits die Serine-63 und -73 und wahrscheinlich die Threonine-91 und -93 einer wichtigen c-Jun-Transaktivierungsdomäne. Die JNK wird ebenfalls durch oncogenaktiviertes Ras (H-Ras), UVC-Bestrahlung und EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) aktiviert (Devary et al., 1993; Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994; Abb. 44). c-Jun spezifische Kinasen, wie die JNK1, JNK2 und p54-Kinase (Kyriakis u. Avruch, 1990) sind Mitglieder der sog. SAPK (durch zellulären Stress aktivierte Proteinkinasen; Kyriakis et al., 1994), einer Untergruppe der MAPK-Familie.

Abbildung 44 zeigt, daß Anisomycin schon in Konzentrationen, die die zelluläre Proteinsynthese nicht hemmen (0.05 µg/ml), die Aktivierung der JNK1 und einer langsamer wandernden Form (JNK2, 55 kD; Hibi et al., 1993) in HeLa-Zellen induziert. Während die Jun-spezifischen Kinasen auch durch UVC und EGF aktiviert werden, aktiviert TPA diese Kinasen nicht. Damit ist die Frage, warum Anisomycin AP-1 abhängige Genkonstrukte aktiviert, geklärt.

⁹ P = Prolin, L = Leucin, X = beliebige Aminosäure, T = Threonin, S = Serin.

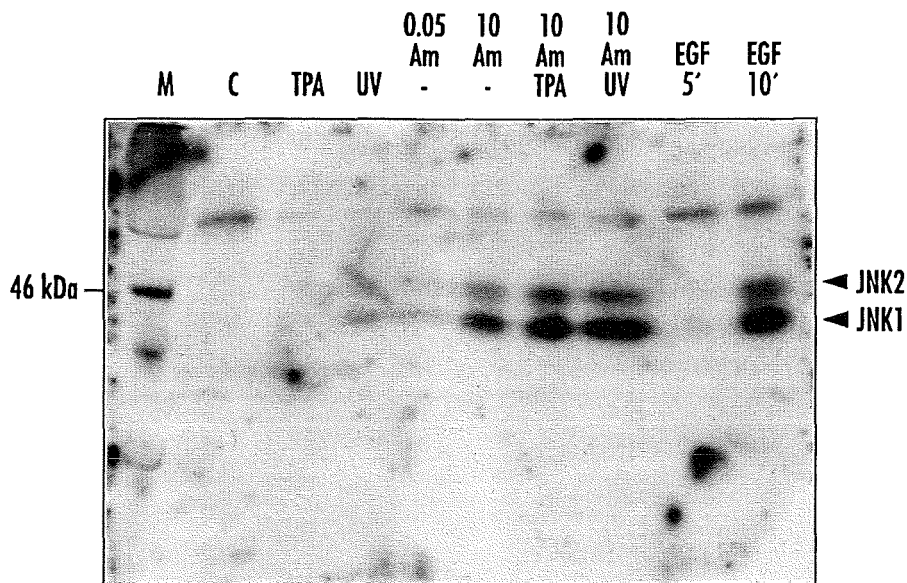


Abb. 44: Anisomycin, UVC und EGF aktivieren die c-Jun N-terminalen Proteinkinasen JNK1 (46 kDa) und JNK2 (55 kDa). HeLa tk⁻ Zellen wurden nicht behandelt (C), mit 60 ng/ml TPA (30 min), mit 40 J/m² UVC (30 min), mit 0.05 µg/ml (0.05 Am) oder 10 µg/ml (10 Am) Anisomycin (10 min) oder mit 10 ng/ml EGF (5 und 10 min) behandelt, dann mit eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen und auf Eis lysiert. Zum Nachweis der JNK1- und JNK2-Aktivität im Zellextrakt wurden [γ -³²P] ATP und als Substrat GST-c-Jun-Fusionsproteine, die in das SDS-Polyacrylamidgel eingeschlossen wurden, verwendet. Der gezeigte c-Jun Kinase-Nachweis wurde freundlicherweise von Dagmar Wilhelm, IGEN, durchgeführt.

2.21 Zusammenfassung

Ein AP-1-abhängiges, kurzes Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt wird nur schwach durch Phorbolster induziert, aber sehr stark durch den Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin. TPA und Anisomycin zusammen induzieren synergistisch die Transkription des Genkonstrukts. Das Kollagenase-TRE ist das auf Anisomycin reagierende Element, da die 5'-Deletion der TRE-Sequenz oder die interne Mutation des TREs die Anisomycin-Induzierbarkeit ebenso wie die TPA-Induzierbarkeit verhindert. In F9-Zellen, die kein präformiertes AP-1 besitzen, ist die Induktion eines AP-1-abhängigen Konstrukts nicht möglich, woraus geschlossen werden kann, daß Anisomycin präexistierendes AP-1 aktiviert. Die DNA-Bindeeigenschaften von AP-1 werden durch die Anisomycin-Behandlung der Zellen nicht verstärkt, woraus geschlossen werden kann, daß Anisomycin gebundenes AP-1 durch posttranslationale Modifikation aktiviert. Tatsächlich zeigte die Präparation und Analyse von metabolisch markiertem c-Jun aus Anisomycin-behandelten HeLa-Zellen, daß Anisomycin die selben Phosphorylierungsmuster induziert, wie UVC-Strahlung, aber mit wesentlich höherer Effizienz. Anisomycin aktiviert also c-Jun durch die Phosphorylierung der, für den Transaktivierungsprozess kritischen, Serine-73 und -63 in der c-Jun Transaktivierungsdomäne. Anisomycin benutzt dafür nicht den zur p42^{MAPK} führenden Signaltransduktionsweg, sondern aktiviert c-Jun-spezifische Kinasen mit Molekulargewichten von 46 und 55 kDa. Auch niedrige

Konzentrationen von Anisomycin, die die zelluläre Proteinsynthese nicht hemmen, aktivieren diese c-Jun Kinasen. Damit unterscheidet sich die induzierende Wirkung des Anisomycins auf die Transkription der Sofortantwortgene *c-jun* und *c-fos*, sowie auf die Transkription von AP-1 abhängigen, kurzen Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten womöglich von der Fähigkeit des Anisomycins, die TPA-Induktion des endogenen Kollagenase I-Gens und langen Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten zu hemmen.

3. Diskussion

Die Expression des Kollagenase I-Gens ist ein komplexer Vorgang, der durch mehrere aktivierende Transkriptionsfaktoren reguliert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Promotorsequenzen identifiziert, die die maximale Induktion des Kollagenasegens in HeLa tk⁻ Zellen durch PKC-aktivierende Phorbolster (TPA) vermitteln. Die IMS (die Induzierbarkeit maximierende Sequenzen) genannten Enhancerelemente kooperieren miteinander und mit dem TRE (auf TPA reagierendes Element) des Kollagenasepromotors. Zwei dieser induktionsfördernden Enhancerelemente sind Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die proteinsyntheseabhängig aktiviert werden. Sie sind der Grund dafür, daß die TPA-Induktion langer Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukte, ebenso wie die des endogenen Kollagenasegens, durch Proteinsynthese-Inhibitoren (z.B. Anisomycin) gehemmt wird. Im extremen Gegensatz dazu, werden kurze Kollagenasepromotor-Konstrukte durch Anisomycin und TPA synergistisch aktiviert. Das auf Anisomycin reagierende Element ist das Kollagenase-TRE.

3.1 Mehrere Enhancerelemente regulieren kooperativ die Expression des Kollagenase I-Gens

Das TRE (-73_TGAGTCA_-67) wurde schon vor sieben Jahren als das hauptsächliche Enhancerelement des Kollagenasepromotors beschrieben (Angel et al., 1987 a). Der an das TRE bindende Proteinkomplex AP-1 (c-Jun/c-Fos) gehört zu den am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren (Übersicht in Angel u. Herrlich, 1994). Die TRE-Sequenz ist zwar absolut notwendig, aber nicht ausreichend für die maximale TPA-Induktion von transient in HeLa-Zellen transfizierten Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten (Angel et al., 1987 a und b; diese Arbeit). In der 5'-flankierenden Region des Kollagenasepromotors (-182/-83) wurden vier Enhancerelemente (IMS4, IMS3, IMS2 und PEA3) charakterisiert, die in Zusammenarbeit mit dem TRE die Aktivierbarkeit des Promotors drastisch steigern (Tab. 5, 6).

Kooperativität oder Synergismus zwischen Transkriptionsfaktoren wird häufig dann beobachtet, wenn ein Promotor mehrere Transkriptionsfaktor-Bindestellen für verschiedene, entwicklungsgeschichtlich ähnliche oder unterschiedliche, Proteine enthält (Übersicht in Ptashne, 1988). Die Kooperativität wird entweder durch synergistische DNA-Bindung der Faktoren oder durch alternative Mechanismen erreicht, bei der die DNA-Bindedomäne eine direktere Rolle bei der Aktivierung der Transkription spielt, als bisher angenommen (z.B. Änderung der DNA-Struktur, Verdrängung von Nukleosomen, direkte Interaktion zwischen DNA-Bindedomäne und dem basalen Transkriptionskomplex; Oliviero und Struhl, 1991). Gut untersuchte Promotoren, bei denen die Kooperativität zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde, sind z.B. der SV40-

Enhancer, der Polyoma-Enhancer, die Enhancer für die frühen Gene des Adenovirus und der Metallothionein IIA-Promotor (Übersicht und Literatur in Jones et al., 1988; Rahmsdorf u. Herrlich, 1990).

Für die kooperative Interaktion der an IMS4-, IMS3-, IMS2-, PEA3- und TRE-bindenden Faktoren gibt es folgende Evidenzen:

(1.) Ein Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt, das Sequenzen von Position -182 bis +63 (-182/+63) und damit alle der oben genannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen enthält, ist durch TPA 55-mal stärker induzierbar, als ein -74/+63 CAT-Konstrukt, das nur durch das TRE reguliert wird (Abb. 11).

(2.) IMS4 (bzw. IMF4), IMS3 (IMF3), IMS2 (IMF2) und PEA3 (Ets) sind ohne TRE (AP-1) nicht in der Lage, Induzierbarkeit zu vermitteln (Abb. 16, 18). Dies könnte daran liegen, daß nur der TRE-gebundene Transkriptionsfaktor AP-1 das Transaktivierungssignal über einen spezifischen Koaktivator an den basalen Transkriptionskomplex weiterleiten kann (Oehler u. Angel, 1992).

(3.) Die selektive Zerstörung der Bindestelle eines Faktors (IMF3 bzw. IMF2 oder Ets), bei vollständiger Integrität der übrigen Promotorsequenzen, beeinträchtigt die Aktivierbarkeit durch Phorbolester sehr viel mehr, als es bei einer additiven Wirkung der Faktoren zu erwarten wäre und die kontinuierliche 5'-Deletion dieser Elemente zeigt (Abb. 17).

(4.) Werden die Bindestellen für IMS2 oder Ets in einem langen Promotorfragment (-518/+63) punktmuiert, so ist die verbleibende, TPA-induzierte Restaktivität nicht durch Anisomycin hemmbar (Abb. 31). Dies kann nur so erklärt werden, daß die stromaufwärts von Position -151 bindenden Faktoren nicht zur TPA-Induktion beitragen können, wenn einer der stromabwärts bindenden Faktoren abwesend ist.

In den folgenden Abschnitten werden die IMS getrennt besprochen.

3.1.1 Das PEA3-Motiv

An die PEA3-Sequenz (-91_{AGAGGATGT}-83) des Kollagenasepromotors bindet ein Protein der Ets-Familie (Übersicht in Wasylyk et al., 1993). Es wurde wiederholt gezeigt, daß isolierte Ets/AP-1-Motive als potente Enhancerelemente für die Onkogen- und TPA-induzierte Transkription eines heterologen Promotors funktionieren können (Wasylyk et al., 1989; Gutman u. Wasylyk, 1990; Galang et al., 1994); die Bedeutung des Ets-Motivs im natürlichen Promotorzusammenhang wurde seltener untersucht (Sirum-Connolly u. Brinckerhoff, 1991; Wu et al., 1994).

In den Stromelysin I- und Kollagenase I-Genen verschiedener Spezies ist die Ets-Bindestelle bei Position -87 bzw. -91 konserviert erhalten und in enger Nachbarschaft zum TRE dieser Gene lokalisiert (Abb. 45). Während diese Ets-Bindestelle im menschlichen Stromelysin-Gen intern mutiert werden kann, ohne daß die Interleukin-1-Induzierbarkeit wesentlich beeinflusst wird (Sirum-Connolly u. Brinckerhoff, 1991), reduziert die selektive Mutation des PEA3-Motivs im

Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt -518/+63 m88 (-91 AGAACATGT -83) die TPA-Induzierbarkeit um 97 %, verglichen mit der TPA-Induzierbarkeit des nicht mutierten Wildtyp-Konstrukts (Tab. 6). Die Ets-Bindestelle ist also für die maximale Induzierbarkeit des menschlichen Kollagenase I-Promotors durch PKC-aktivierende Signale von größter Wichtigkeit. Die nach der internen Zerstörung der Ets-Bindestelle verbleibende Induzierbarkeit (3 %) entspricht derjenigen eines Promotors (-74/+63 CAT5), der nur durch das TRE kontrolliert wird (3 %; Tab. 5). Die Wirkung der 5' der PEA3-Stelle bindenden Faktoren scheint also vollständig von der Bindung des Ets-Proteins abhängig zu sein.

3.1.2 Die Induzierbarkeit maximierende Sequenz 2 (IMS2)

In der IMS2-Region (-137 GGAGTCACCA -128) fällt eine Sequenz auf (unterstrichen), die bis auf das Nukleotid an Position -137 mit dem TRE des Kollagenasepromotors (-74 TGAGTCA -67) identisch ist. Diese, für die Bindung von AP-1 kritische Base (Angel et al., 1987 b, Risse et al., 1989), ist im Gegenstrang an der richtigen Stelle vorhanden, sodaß die Sequenz in revertierter Ausrichtung als AP-1-Bindestelle funktionieren könnte. Die IMS2 kann jedoch nicht das proximale TRE ersetzen, denn die interne Mutation des TREs verhindert die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors vollständig. Allerdings senkt die selektive Mutation der IMS2 im Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt -300/+63 m137 (-137 TCGATCACCA -128) bzw. im Genkonstrukt -518/+63 m132 (-137 GGAGTACATG -128) die TPA-Induzierbarkeit der Promotoren auf 12 bzw. 9 % der Induzierbarkeit des Wildtyp-Konstrukts (Tab. 6). An die IMS2 bindet also ein, die TPA-Induzierbarkeit unterstützender Faktor (IMF2), der zumindest mit dem an das TRE bindenden Faktor (AP-1) kooperieren muß. Die Natur des IMF2 ist noch unklar. Ein vorläufiges, in dieser Arbeit nicht dargestelltes, Gelretardations-Experiment zeigte, daß nach TPA-Behandlung von HeLa-Zellen ein oder mehrere *in vitro* an die IMS2-Region bindende, nukleäre Faktoren verstärkt auftreten. Die Bindung dieser Faktoren an die IMS2-Region wird durch einen Überschuß an TRE-Oligonukleotiden teilweise, aber nicht vollständig, verhindert. Umgekehrt kompetiert ein IMS2-Oligonukleotid schwach um die AP-1-Bindung an die TRE-Sequenz. Es kann ohne weitere Untersuchungen nicht entschieden werden, ob es sich bei IMF2 um AP-1 (c-Jun/c-Fos) oder um einen mit AP-1 verwandten Faktor handelt, der *in vitro* an das IMS2-Oligonukleotid bindet. Ein von Dr. Harald König durchgeführtes *in vivo footprint*-Experiment (s.u.) zeigte allerdings, daß sich das Proteinbindungsmuster von IMF2 in der IMS2-Region und das Proteinbindungsmuster von AP-1 am TRE unterscheiden (Abb. 47).

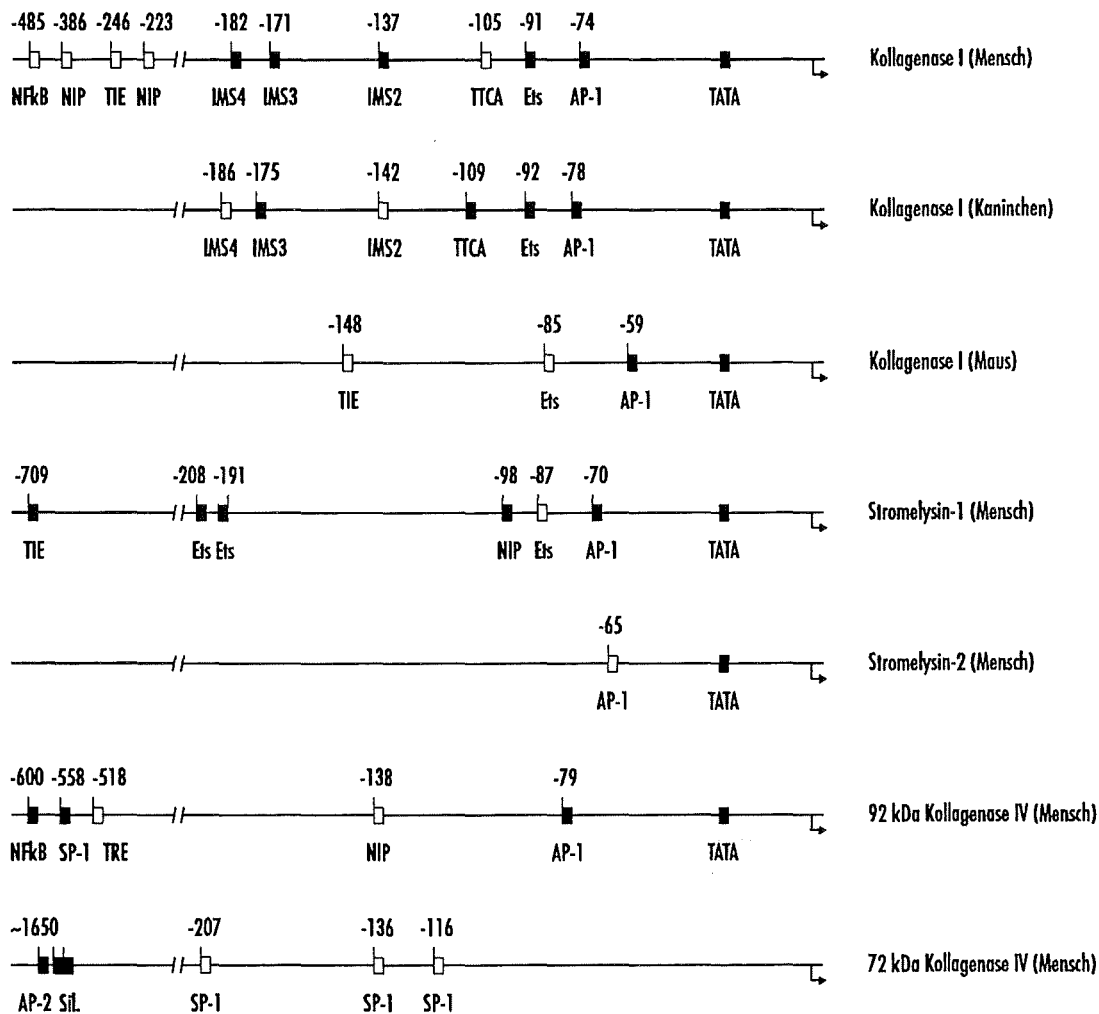


Abb. 45: Vergleich der Promotorstruktur einiger MMP-Gene. Die Bindestellen (Kästchen) sind entweder nach dem wahrscheinlich bindenden Transkriptionsfaktor (z.B. Ets, Protein der Ets-Familie) oder mit dem eingeführten Namen (z.B. TIE, TGF- β inhibitorisches Element) benannt. Schwarze Kästchen repräsentieren Bindestellen, deren Funktion als Enhancer oder Silencer (Sil.) experimentell erschlossen wurden. Weiße Kästchen wurden aufgrund von Sequenzhomologien eingezeichnet. Es ist möglich, daß diese homologen Sequenzen in anderen Geweben aktiv sind oder auf andere Signale ansprechen, als die bislang untersuchten. Quellenangabe: menschliche Kollagenase I (Angel et al., 1987 a; diese Arbeit), Kaninchen-Kollagenase I (Chamberlain, et al., 1993), Maus-Kollagenase I (Jörg Schaper, Diplomarbeit am IGEN; P. Angel, persönliche Mitteilung), Stromelysin-1 (Mensch: Sirum-Connolly u. Brinckerhoff, 1991; Ratte: Kerr et al., 1990), Stromelysin-2 (Brinckerhoff et al., 1992), 92 kDa Kollagenase IV (Sato u. Seiki, 1993), 72 kDa Kollagenase IV (Frisch et al., 1990; Frisch u. Morisaki, 1990).

3.1.3 Die Induzierbarkeit maximierenden Sequenzen 3 und 4 (IMS3 und IMS4)

Die Punktmutation der IMS3 (-171_ATTGCAACA_-163) im Genkonstrukt -518 m167 verringert die TPA-Induzierbarkeit um 89 %, verglichen mit der TPA-Induzierbarkeit des nicht mutierten Kollagenasepromotors. Basensubstitutionen in der IMS4 (-182_TTAATCA_-176) haben eine deutliche, aber weniger drastische Reduktion der TPA-Aktivierbarkeit um 40 % zur Folge (Tab. 6). Beide induktionsmaximierenden Sequenzen liegen identisch im Kaninchen-Kollagenase I-Promotor

vor, was eine konservierte Rolle dieser Region für die Transkriptionsregulation andeutet (Abb. 46). Tatsächlich konnten Chamberlain et al. (1993), ohne die genaue Sequenz zu benennen, zeigen, daß die interne Deletion der -182/-162-Region des Kaninchen-Kollagenasepromotors (die der -178/-158-Region, d.h. der IMS3 des menschlichen Kollagenasegens entspricht) die TPA-Induzierbarkeit um 70 % reduziert. Allerdings hat die Mutation der IMS4-entsprechenden Sequenz, im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten, keinen Effekt auf die TPA-Induzierbarkeit des Kaninchen-Kollagenasepromotors.

Es konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, welche Faktoren an die IMS3 und IMS4 binden. Wie schon im vorangegangenen Abschnitt für IMS2 beschrieben wurde, gibt es in der Kernproteinfraktion aus TPA-behandelten HeLa-Zellen Faktoren, die *in vitro* auch an IMS3- bzw. IMS4-Oligonukleotide binden (nicht gezeigt). Die Abfolgen der Nukleotide deuten an, daß es sich bei den IMS4-bindenden Faktoren um Mitglieder der AP-1-Familie und bei den IMS3-bindenden Faktoren um Proteine mit C/EBP-ähnlichen Bindungspräferenzen handeln könnte. Das CAAT-Enhancer bindende Protein (C/EBP) wurde als erstes Protein der bZIP-Superfamilie (siehe Einleitung, 1.7.2) charakterisiert und ursprünglich als leberspezifischer Transkriptionsfaktor von McKnight und Mitarbeitern beschrieben (Johnson et al., 1987). Kloniertes C/EBP ist ein potenter *trans*-Aktivator verschiedener Gene, die bei Differenzierungsprozessen beteiligt sind (Umek et al., 1991). Die Expression von Proteinen der C/EBP-Familie scheint nicht auf Hepatozyten beschränkt zu sein, sondern wurde mittlerweile auch in anderen Geweben und Zelllinien gefunden (Übersicht u. Literatur in De Simone u. Cortese, 1991; Xanthopoulos u. Mirkovitch, 1993). Das im Kollagenasepromotor gefundene Enhancermotiv für C/EBP-ähnliche Transkriptionsfaktoren, reguliert möglicherweise (gewebespezifisch ?) die Expression der interstitiellen Kollagenase bei Differenzierungs- und Gewebeumbauprozessen (siehe Einleitung, 1.4).

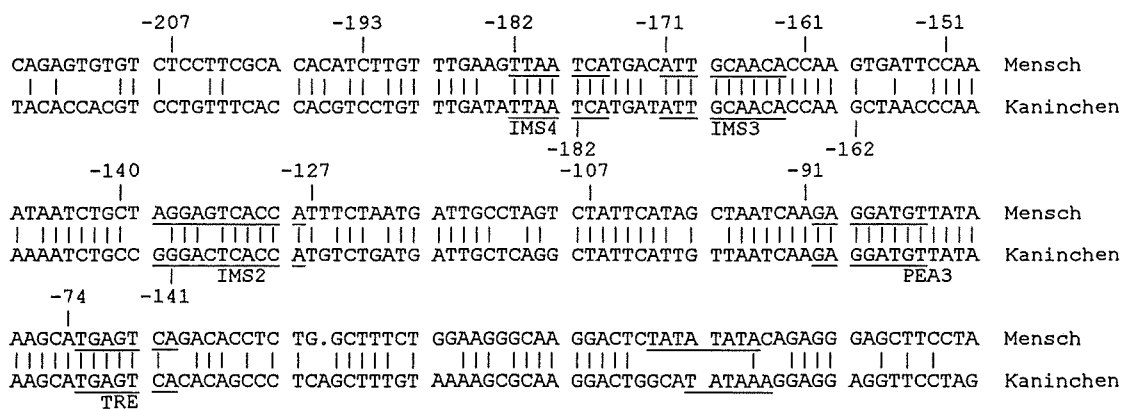


Abb. 46: DNA-Sequenz der Promotorregionen des menschlichen und des Kaninchen-Kollagenase I-Gens. Die Sequenzen sind zu 79 % identisch. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm GAP (GCG Software Package; Madison, Wisconsin, U.S.A.) durchgeführt. Quellenangabe: Menschliche Kollagenase I (Angel et al., 1987 a), Kaninchen-Kollagenase I (Chamberlain et al., 1993).

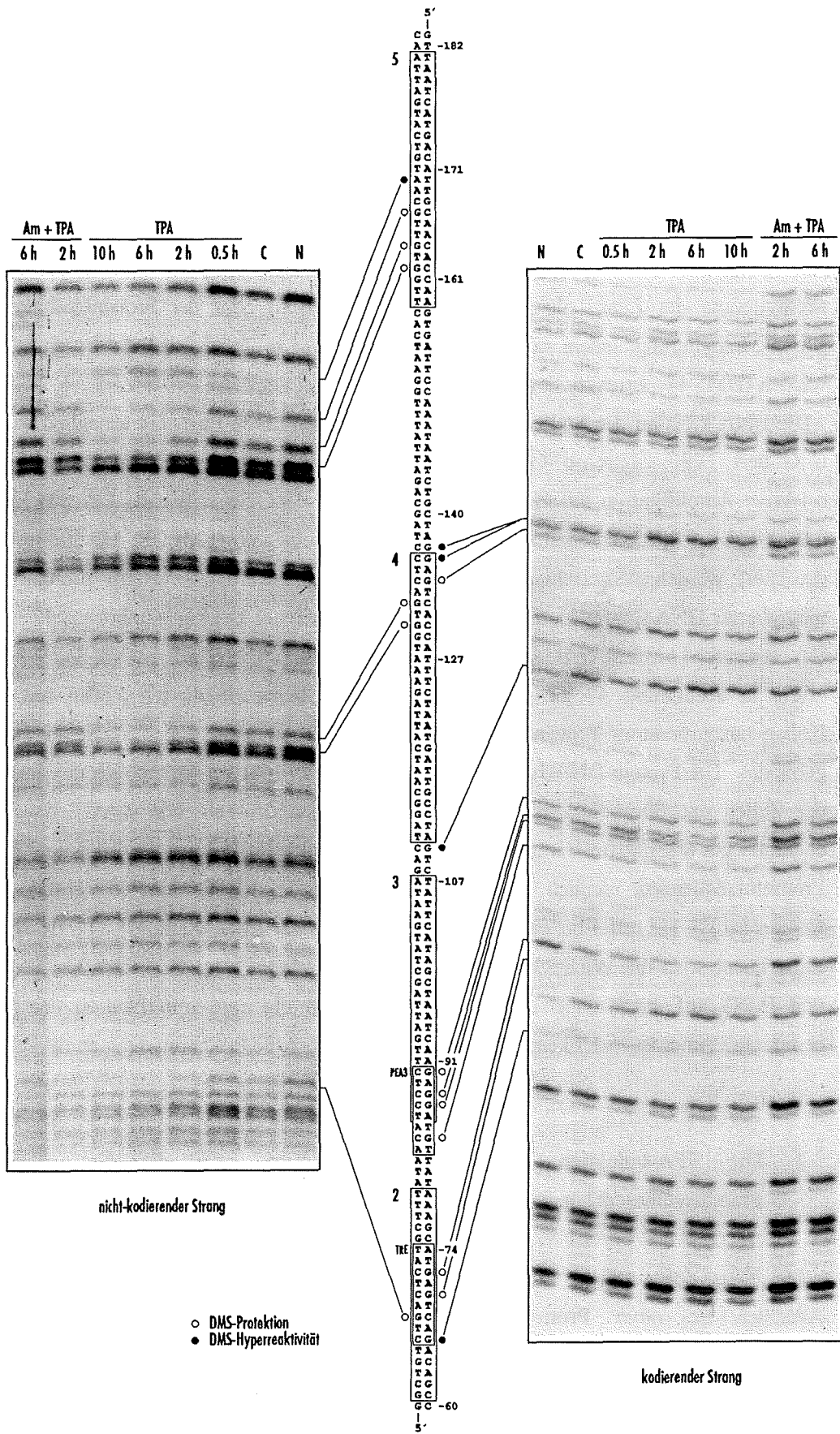
3.1.4 Die Proteinbesetzung des Kollagenasepromotors *in vivo*

Angel et al. (1987 b) zeigten, daß DNA-bindende Proteine u.a. auch die IMS2-Region (Box4) und die IMS3/IMS4-Region (Box 5) *in vitro* vor dem Angriff von Exonukleasen schützen. Mit einer sensitiveren Methode und *in vivo* konnte Dr. Harald König¹ darstellen, daß die transkriptionelle Aktivierung des Kollagenasegens in TPA-induzierten menschlichen Hautfibroblasten mit der zeitlich korrelierten Besetzung des TREs, aber auch der -182/-83-Promotorregion, durch DNA-bindende Proteine einhergeht (H. König, 1992). Mit Harald Königs freundlicher Genehmigung wird das Experiment nachfolgend vorgestellt.

Mit der *in vivo footprint*-Methode kann die Proteinbesetzung eines bestimmten Gens des Zellkerns (in diesem Fall des Kollagenasegens) in intakten und lebenden Zellen untersucht werden. Für die Proteinbindungsstudien wurden primäre menschliche Hautfibroblasten (CRL 1497) verwendet, weil sich der Zellzyklus dieser Zellen in der Kultur sehr gut durch Serumreduktion synchronisieren läßt. Dadurch erhält man deutlicher ausgeprägte DMS-Reaktivitätsmuster. Die unten beschriebenen Veränderungen der Protein-DNA-Interaktionen wurden, schwächer ausgeprägt, ebenso bei HeLa-Zellen beobachtet, bei denen der Serumentzug nicht zur Synchronisation führt (nicht gezeigt).

Abb. 47: TPA induziert die Proteinbesetzung des TREs, des PEA3-Elements, der IMS2 (-139/-127) und der IMS3 (-171/-163) des Kollagenasepromotors bei der transkriptionellen Aktivierung des Gens. Primäre menschliche Hautfibroblasten (CRL 1497) wurden 48 Stunden lang in DMEM, 0.5% FCS kultiviert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml TPA bzw. mit 100 µg/ml Anisomycin und TPA (Am + TPA) behandelt oder nicht behandelt (C, Kontrolle). Die Zellen wurden sodann für 2 Minuten mit 0.5% DMS (*Fluka*) in DMEM, 10 mM HEPES-KOH pH 7.5 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% SDS lysiert. Die zellulären Proteine wurden mit 300 µg/ml Proteinase K verdaut (37 °C, 14 Std.) und durch wiederholte Phenol/Chloroform-Extraktionen entfernt. Die genomische DNA wurde präzipitiert, mit EcoR1 (37 °C, 14 Std.) und RNaseA (30 min. bei Raumtemperatur) behandelt, durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und gefällt. Proteinfreie genomische DNA aus *nicht* DMS-behandelten Zellen wurde ebenso präpariert und *in vitro* methyliert (N, nackte DNA). Dazu wurden 20 µg genomische DNA mit 200 µl 0.5% DMS in 50 mM Na-Cacodylat, 1 mM EDTA gemischt und 1 min. lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1.5 M Natriumacetat pH 7, 1 M β-Mercaptoethanol beendet und die DNA mit Ethanol präzipitiert. Der Nachweis der kollagenasespezifischen Spaltprodukte mit der LMPCR-Methode (Mueller u. Wold, 1989) erfolgte wie von H. König (1992) und Herr et al. (1994) beschrieben. Promotorbereiche, die durch DNase I-*footprinting* als Proteinbindestellen definiert wurden (Angel et al., 1987 b) sind mit einem weiten Rahmen markiert (Box 2 - 5). Das TRE-Motiv und das PEA3-Element sind eng eingerahmt. Durch Proteinbindung vor der DMS-Methylierung geschützte Nukleotide (○) und besonders exponierte Nukleotide (●) sind gekennzeichnet. Die Position der Nukleotide ist in Bezug auf den Startpunkt der Transkription (+1) angegeben. →

¹ Dr. Harald König arbeitete in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rahmsdorf u.a. über die Interferenz zwischen AP-1 und Glucocorticoiden bei der phorbolsterinduzierten Kollagenase-Transkription (H. König, 1992).



Die Versuchszellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit TPA bzw. mit TPA und dem Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin behandelt. Dann wurden die Zellen mit einer partiell methylierenden Dosis von DMS (Dimethylsulfat) für kurze Zeit inkubiert. DMS diffundiert sehr schnell in die Zelle und in den Zellkern und methyliert bevorzugt die N-7-Position von Guaninen in der großen DNA-Rinne (engl. *major groove*) und mit geringerer Effizienz die N-3-Position von Adeninresten in der kleinen DNA-Rinne (engl. *minor groove*). Spezifisch mit DNA-Sequenzen interagierende Proteine können die DNA entweder vor dem methylierenden Agens schützen und die Methylierung der Basen abschwächen (DMS-Protektion) oder die Proteinbindung verstärkt die Basen-Methylierung, indem sie die DNA-Konformation so ändert, daß die Basen besser exponiert werden (DMS-Hyperreaktivität).

Die DNA kann an den Stellen der modifizierten Basen durch Piperidin gespalten werden (Maxam u. Gilbert, 1980; Church u. Gilbert, 1984 u. Referenzen darin). Die Spaltprodukte konnten durch selektive Amplifikation mit Hilfe von Kollagenasepromotor-spezifischen Primern (siehe Material, 4.7.4) und der ligationsvermittelten Polymerase-Kettenreaktion (LMPCR; Mueller und Wold, 1989) detektiert werden. Unterschiede zwischen den DMS-Reaktivitätsmustern proteinfreier, *in vitro* methylierter DNA (N, nackte DNA) und *in vivo* methylierter DNA aus unbehandelten Kontrollzellen (C) zeigen die konstitutive Besetzung des Promotors mit Faktoren an.

Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, sind schon in unstimulierten Zellen an das TRE des Kollagenasepromotors Proteine (wahrscheinlich AP-1 oder ein sehr verwandter Proteinkomplex) gebunden. Die Protein-DNA-Interaktionen am TRE (-74/-66) verstärken sich durch die Behandlung der Zellen mit Phorbolestern nach 6 bis 10 Stunden deutlich. Die TPA-Behandlung induziert ebenfalls gut erkennbare Veränderungen im DMS-Reaktivitätsmuster an distal vom TRE gelegenen Promotorsequenzen, nämlich im kodierenden Strang des PEA3-Motivs (-91/-83), in der IMS2-Region (-137/-128) und im nicht kodierenden Strang der IMS3-Region (-171/-163). Durch dieses Experiment wird die Wichtigkeit der funktionell charakterisierten Promotorelemente PEA3, IMS2 und IMS3 auf struktureller Ebene bestätigt. Durch die zur Amplifikation der Spaltfragmente benutzten Primer ist leider keine eindeutige Aussage über die Proteinbindung an die IMS4 möglich.

3.2 Die TPA-Induktion der Kollagenaseexpression setzt die Neusynthese oder die proteinsyntheseabhängige Aktivierung der IMS3- und IMS4-bindenden Proteine voraus

Als eines der wenigen Gene, dessen transkriptionelle Aktivierung durch PKC-aktivierende Agenzien *de novo* Proteinsynthese voraussetzt, ist die Kollagenase ein interessantes Untersuchungsobjekt, um neue Regulationsmechanismen, neue intrazelluläre Signalwege und neue *trans*-wirkende Faktoren zu erforschen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die TPA-induzierte Transkription von genügend langen Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukten, die transient in HeLa-Zellen transfiziert wurden, ebenfalls von Proteinneusynthese abhängig. Die 5'-Deletion der distalen

Promotorsequenzen zwischen den Endpunkten -1200 und -151 konvertiert den Kollagenasepromotor in einen Promotortyp, der durch Phorbolster (TPA) und Proteinsynthese-Hemmstoffe (z.B. Anisomycin) additiv oder sogar synergistisch induziert wird, wobei das auf Anisomycin positiv reagierende Enhancerelement das Kollagenase-TRE und der durch Anisomycin aktivierbare Transkriptionsfaktor AP-1 ist. Eine negative Interferenz zwischen TPA und Anisomycin läßt sich letztmalig dann beobachten, wenn die Basenpaare zwischen -171 und -151 vorhanden sind (Abb. 28). Die TPA-Induktion eines Genkonstrukts, das zusätzlich zur IMS3-Region die IMS4-Region enthält (-182/+63 CAT5), wird durch Anisomycin deutlich gehemmt (Abb. 26 und folgende). Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß weitere 5'-Kollagenasepromotor-Sequenzen, insbesondere die Region zwischen -231 und -182 die negative Interferenz verstärken. Diese Ergebnisse zeigen, daß alle Faktoren, die die TPA-Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors fördern und zwischen Position -182 und -151 binden (also IMF4 und IMF3) bei der Expression des Kollagenasegens neu synthetisiert oder proteinsyntheseabhängig aktiviert werden müssen, und daß alle Faktoren, die 3' von -151 binden (IMF2, PEA3 und AP-1) proteinsyntheseunabhängig reguliert werden.

Im scheinbaren Widerspruch zu diesen Daten zeigt die in Abbildung 48 vorgestellte, am endogenen Kollagenasegen durchgeführte Proteinbindungsstudie, daß die Hemmung der zellulären Proteinsynthese die TPA-induzierten Veränderungen der DMS-Reaktivitätsmuster nicht nur an der IMS3, sondern an *allen* funktionellen Proteinbindungsstellen, einschließlich dem TRE, verhindert (H. König, 1992). Mit anderen Worten: In Abwesenheit von Proteinsynthese bindet keiner der Faktoren an die spezifischen Stellen im Promotor des zellulären Kollagenasegens, die im normalen, induzierten Zustand durch Proteine besetzt sind. Eine Möglichkeit ist, daß die Methode nicht empfindlich genug ist, um z.B. geringe Mengen an TRE-gebundenem AP-1 nachzuweisen. Für die Richtigkeit der Analyse spricht andererseits, daß sowohl der endogene Kollagenasepromotor, als auch ein transient transfiziertes, ausreichend langes Kollagenasepromotor-Fragment in Gegenwart eines Proteinsynthese-Hemmstoffs inaktiv ist und nicht durch TPA aktiviert werden kann, obwohl AP-1 unter diesen Bedingungen ein starkes transaktivierendes Potential besitzt und die Transkription eines kurzen, AP-1 abhängigen Konstrukts induziert. Das *in vivo footprint* Experiment kann damit so interpretiert werden, daß genügend lange Kollagenasepromotoren im nicht-induzierten Zustand "verschlossen" sind und bei der Aktivierung durch Phorbolster durch einen proteinsyntheseabhängigen Prozess "geöffnet" werden müssen, bevor AP-1 und weitere Faktoren binden können. Transfizierte, kurze Promotorkonstrukte sind dagegen nicht verschlossen. Der "Verschluß" des Promotors befindet sich in der Region 5' von Position -151 und kann entweder ein konstitutiv bindendes Repressorprotein oder die Chromatinstruktur des Kollagenasepromotors sein. Als das "Öffnen" des Promotors wäre die Ablösung des Repressors oder die Auflockerung der Chromatinstruktur zu verstehen. Beide Mechanismen werden nachfolgend diskutiert.

3.2.2 Die Repressorhypothese

Der Repressor, der den Anforderungen entsprechen würde, müßte durch ein, auf den aktivierenden Reiz hin neu synthetisiertes oder proteinsyntheseabhängig aktiviertes Protein ("Antirepressor") von seiner DNA-Bindestelle abgelöst werden und den Promotor für die Bindung transkriptionsaktivierender Proteine öffnen. Alternativ könnte der Repressor in einer von Proteinsynthese abhängigen Reaktion so modifiziert werden, daß er seine DNA-Bindungsfähigkeit verliert. Eine dritte Möglichkeit wäre der Ersatz des Repressor durch einen proteinsyntheseabhängig aktivierten Transkriptionsfaktor. Die Repressorbindestelle könnte deletiert oder intern mutiert werden, ohne daß die TPA-Induzierbarkeit des Promotors beeinflusst würde. Weiterhin sollte die Repressorbindestelle zwischen Position -231 und -151 zu finden sein, da die Aktivierung des -231/+63-Promotorfragments und längerer Fragmente einheitlich gut durch Anisomycin gehemmt wird (und diese Promotoren folglich die Repressorbindestelle enthalten) und kürzere Promotoren als -151/+63 additiv oder synergistisch durch TPA und Anisomycin induziert werden (und nicht mehr reprimierbar sind). Mit Vorbehalt des oben genannten, dritten Mechanismus (dessen Zutreffen schwierig zu untersuchen ist) kann ausgeschlossen werden, daß die Bindestelle des Repressors in der IMS4/IMS3-Region (-182/-163) liegt, weil die Deletionen oder internen Mutationen dieser Sequenzen die TPA-Induzierbarkeit hemmen. Damit bleibt der Abschnitt zwischen Position -231 und -182 übrig, in der die hypothetische Repressorbindestelle zu suchen wäre. Als Repressorbindestelle käme die NIP-Sequenz (-223/-209) in Frage, weil diese Sequenz im Interleukin 3-Promotor als Repressorbindestelle beschrieben ist und weil die Deletion der NIP-Sequenz die negative Interferenz zwischen Anisomycin und TPA verringert. Allerdings gibt es drei kürzere Promotorfragmente, die nicht die NIP-Sequenz enthalten, aber deutlich proteinsyntheseabhängig induziert werden (-207/+63, -193/+63 und -182/+63). Darüber hinaus ist ein langes Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt mit intern mutierter NIP-Sequenz (-518 m223) in Gegenwart von Anisomycin durch TPA kaum aktivierbar. Es ist also unwahrscheinlich, daß die NIP-Sequenz die Bindestelle eines Repressorproteins ist. Andere Sequenzen zwischen Position -231 und -151 erfüllen ebenfalls nicht die genannten Kriterien.

3.2.3 Der Einfluß der Chromatinstruktur auf die Transkription

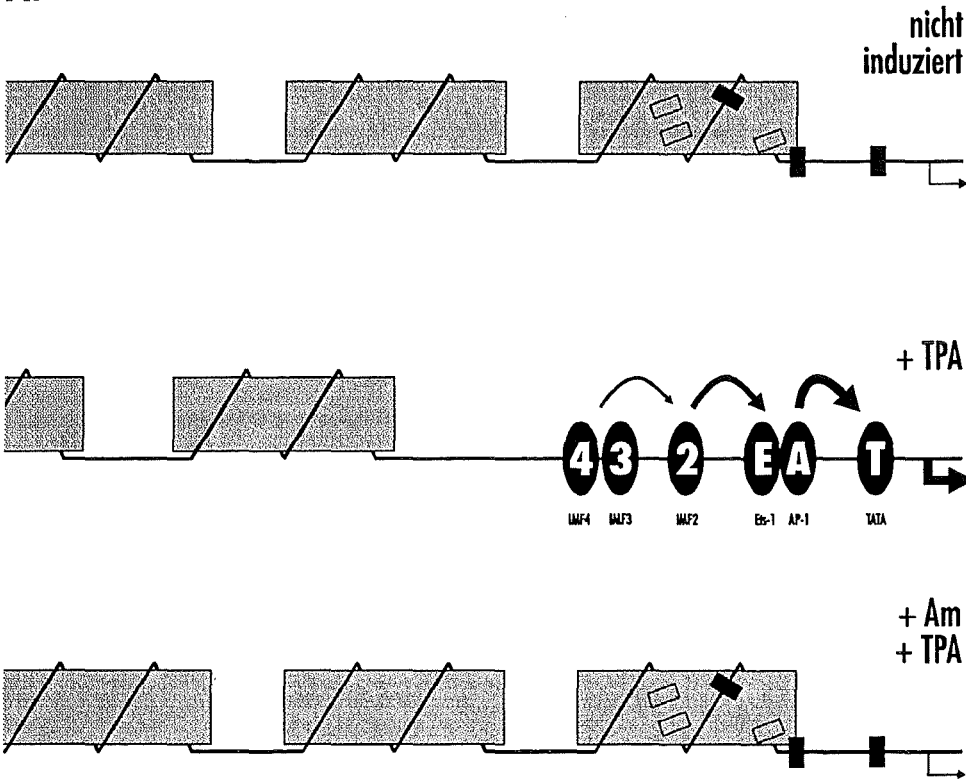
Die Chromatinorganisation eukaryontischer Promotoren wird zunehmend als wichtiger Faktor für die Regulation der Transkription *in vivo* erkannt. Das Konzept der "Gendomäne" beschreibt eine autonom funktionierende Einheit, die den Transkriptionsstatus des Gens reguliert und beinhaltet die Interaktion zwischen einem Set von Transkriptionsfaktoren mit der Chromatinstruktur und strukturbildenden Komponenten, wie z.B. Nukleosomen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und *footprinting*-Analysen haben schon früh gezeigt, daß die Sequenzen in und um aktiv

transkribierte Gene in einer ausgedehnteren, offeneren Form vorliegen und zugänglicher für DNA-spaltende Enzyme oder DNA-modifizierende Chemikalien sind, als inaktive Gene. Solche und weitergehende Studien führten zu der Vorstellung, daß die Aktivierung eines Gens mit der Öffnung der Region um dieses Gen, der Gendomäne, einhergeht. Das Öffnungsereignis erlaubt den Transkriptionsfaktoren und dem basalen Transkriptionskomplex die Bindung an ihre spezifische DNA-Elemente und die Initiation der Transkription. Zur Ausbildung der Chromatinstruktur tragen sowohl die Eigenschaften bestimmter DNA-Regionen, als auch *trans*-wirkende Faktoren bei, die die Fähigkeit haben, Nukleosomen zu positionieren. Die Öffnung des Chromatin/Histon-Komplexes ist ein aktiver Vorgang, der u.a. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Acetylierung von Histonen und/oder Anlagerung von Nicht-Histon-Proteinen an die DNA voraussetzt (Übersicht u. Literatur in Dillon u. Grosveld, 1994; Wolffe, 1994 a, b). Derartige Mechanismen wurden aus methodischen Gründen vor allem an den weniger komplexen Genomen von Hefen und *Drosophila* untersucht (Loo u. Rine, 1994; Renaud et al., 1993), aber auch für integrierte Viren (Verdin et al., 1993) und für Vertebratengene, wie dem IgH-Enhancer (Jenuwein, et al., 1993) beschrieben. Eine sehr interessante *in vitro*-Studie beschreibt das Histon H1 als generellen Repressor, dessen transkriptionshemmende Wirkung durch sequenzspezifisch bindende Transkriptionsfaktoren aufgehoben wird (Croston et al., 1991).

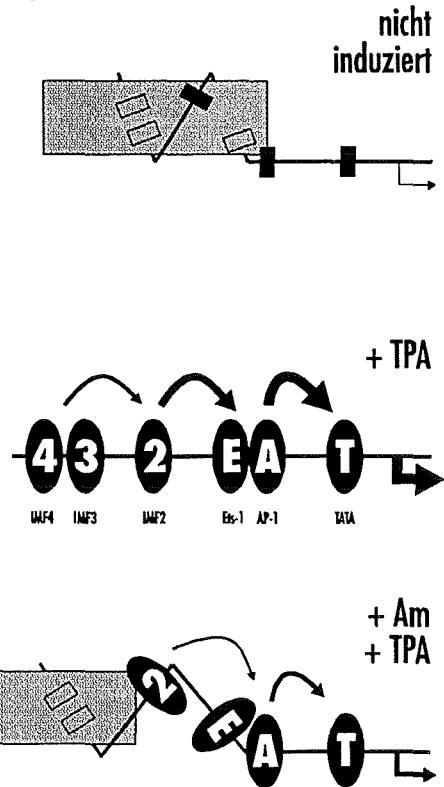
Das Kollagenasegen könnte ebenfalls durch seine Chromatinstruktur im inaktiven Status gehalten werden. Die TPA-induzierte transkriptionelle Aktivierung des Gens würde dann die Synthese oder die proteinsyntheseabhängige Modifikation von Proteinen voraussetzen, die die Chromatinstruktur öffnen und die Bindung von AP-1 und weiteren Faktoren erlauben. Die proteinsynthesesensitiven Faktoren, die mit Chromatinstruktur-ausbildenden Komponenten interagieren, könnten die Faktoren sein, die an die IMS4 und die IMS3 binden. Die proteinsyntheseabhängige Aktivierung und die Bindung von IMF4 und IMF3 an die Promotorregion -182/-163 ist nach dieser Hypothese der erste Schritt zur Genese eines transkriptionell aktiven Kollagenasepromotors.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, werden transient transfizierte Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukte in HeLa-Zellen ähnlich wie das endogene Gen reguliert: Sie haben im nicht-induzierten Zustand eine außerordentlich niedrige Basalaktivität (verschlossener Zustand) und die transkriptionelle Aktivierung (Öffnung des Promotors) benötigt *de novo* Proteinsynthese (Abb. 48 a). Mit dem fortschreitenden Verlust von 5'-Promotorsequenzen kann der Kollagenasepromotor immer schlechter den verschlossenen Zustand erhalten (Abb. 48 b). Das führt dazu, daß TPA auch in Gegenwart von Anisomycin zu einem bestimmten Maß die Transkription des Genkonstrukts induzieren kann. Die Deletion der -182/-151-Promotorregion ist aus zwei Gründen kritisch: Erstens, weil diese Sequenzen für den Aufbau der Chromatinstruktur wichtig sein könnten und zweitens, weil die Faktoren IMF4 und IMF3 zur TPA-Induzierbarkeit beitragen. Ein kurzes Kollagenasepromotor-CAT-Konstrukt, das wenige oder keine strukturgebenden Kollagenasesequenzen enthält, ist beständig offen für die Bindung von TPA-aktivierten Transkriptionsfaktoren (Abb. 48 c). Zusätzlich verstärkt Anisomycin die *trans*-wirkende Aktivität von AP-1.

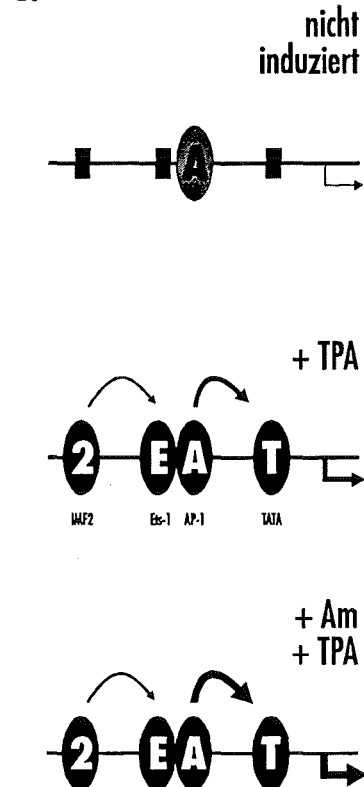
A.



B.



C.



← **Abb. 48: Modell für die Repression der Kollagenasetranskription durch die Chromatinstruktur.** (A.) Das endogene Kollagenasegen wird ebenso wie ein transient transfiziertes Kollagenasepromotor-Konstrukt (-1200 bis -231/+63) durch die Chromatinstruktur des Promotors im inaktiven Zustand gehalten. Zur Öffnung des Promotors ist Proteinsynthese und die Bindung der proteinsyntheseabhängig aktivierten Faktoren IMF4 (4) und IMF3 (3) notwendig. Diese tragen ebenfalls zur maximalen Induzierbarkeit des Kollagenasepromotors durch Phorboltester (TPA) bei. (B.) Die Deletion von 5'-Sequenzen beeinträchtigt den Aufbau einer stabilen, reprimierenden Chromatinstruktur (Promotorfragmente der Längen -207 bis -171/+63). Im nicht induzierten Zustand ist der Promotor inaktiv, weil die Kollagenase-Transkriptionsfaktoren nicht binden. Nach TPA-Induktion können die Faktoren in einer geordneten Weise interagieren und stimulieren maximal die Transkription. Bei gleichzeitiger Proteinsynthese-Hemmung ist die Interaktion der Faktoren IMF2 (2), Ets (E), AP-1 (A) und den Faktoren des basalen Transkriptionskomplexes (T) durch nicht vollständig entfernte Nukleosomen gestört. Außerdem tragen die Proteinsynthese-sensitiven Faktoren IMF4 und IMF3 nicht zur Aktivität bei. (C.) Kurzen, AP-1 abhängigen Promotoren (-140 bis -74/+63) fehlen die Sequenzen, die notwendig sind, um eine regulierende Chromatinstruktur aufzubauen, vollständig. Die Transkriptionsfaktoren IMF2, Ets und AP-1 sind auch in Gegenwart von Anisomycin (Am) durch TPA aktivierbar. AP-1 bindet schon im nicht induzierten Zustand an das TRE-Element eines kurzen Kollagenasepromotor-Konstrukts und wird außerdem durch Anisomycin aktiviert.

Das in Abbildung 49 gezeigte Modell für die Kollagenaseregulation setzt voraus, daß transient transfizierte Genkonstrukte im Zellkern in Chromatin verpackt werden. Ob das tatsächlich der Fall ist, ist unbekannt. Allerdings gibt es klare Aussagen darüber, daß ringförmige DNA-Moleküle sowohl innerhalb der Zelle, als auch *in vitro* Chromatinstrukturen ausbilden können: Transkriptionskomplexe von Histon-besetzten SV40-Minichromosomen können aus infizierten Zellen isoliert und mit Hilfe des Elektronenmikroskops fotografiert werden (Lewin, 1990). Eines der kleinsten, ringförmigen, autonom replizierenden Hefe-Plasmide (TRP1ARS1, 1453 bp) ist mit sieben Nukleosomen besetzt und wird verwendet, um den Einfluß von DNA-Sequenzen auf die Nukleosomen-Plazierung zu untersuchen (Smerdon et al., 1990). Für die *in vitro* Rekonstitution von Chromatin werden ungereinigte oder aufgereinigte Zellkernextrakte und Plasmid-DNA benutzt. In solch einem Ansatz wurde gezeigt, daß die Bindung des GAGA-Faktor an seine Erkennungssequenz im *Drosophila hsp70*-Promotor, die Chromatinstruktur des Promotors in einer ATP-abhängigen Reaktion so verändert, daß Transkription ermöglicht wird (Tsukiyama et al., 1994). Es ist also nicht unwahrscheinlich, daß ein transient transfiziertes Plasmid geordnete Chromatinstrukturen aufbauen kann, sofern es genügend Strukturelemente enthält, die den Zusammenritt von Nukleosomen dirigieren. Die Tatsache, daß sich ein langes Kollagenasepromotor-Konstrukt funktionell wie das endogene Gen verhält, deutet ebenfalls auf sehr ähnliche Regulationsmechanismen hin.

3.3 Anisomycin aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal beschrieben, daß ein AP-1 abhängiges, kurzes Kollagenasepromotor-Konstrukt durch Anisomycin transkriptionell aktiviert wird. Die auf Anisomycin reagierende Promotorsequenz ist das Kollagenase-TRE und der durch Anisomycin

aktivierte Faktor ist AP-1 (c-Jun/c-Fos). Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von AP-1 an ein TRE-Oligonukleotid *in vitro* durch Anisomycin nicht verstärkt wird. Die Anisomycin-Behandlung von HeLa-Zellen führt aber zu einer posttranslationalen Modifikation des endogenen c-Jun, die sich als verändertes Laufverhalten von metabolisch markiertem und immunpräzipitiertem c-Jun in der Gelelektrophorese äußert. Wie der tryptische Verdau von ^{32}P -markiertem c-Jun zeigte, wird nach Anisomycin-Behandlung von HeLa-Zellen intensiv das x-Peptid und das y-Peptid phosphoryliert, was gleichbedeutend mit der Phosphorylierung von Ser-63 und Ser-73 ist. Zusätzlich wird das v-Peptid phosphoryliert (Thr-91 und/oder Thr-93), das wie die zuvor genannten Peptide in der N-terminalen Region lokalisiert ist. Diese, für das Transaktivierungspotential von c-Jun wichtigen Modifikationen der c-Jun-Transaktivierungsdomänen, beobachtet man ebenso, wenngleich in schwächerer Form, bei der Bestrahlung von HeLa-Zellen mit UVC, einem gut untersuchten Induktor der AP-1-Aktivität. Anisomycin aktiviert c-Jun nicht über den zu p42^{MAPK} führenden Signaltransduktionsweg, sondern ist ein äußerst potenter Aktivator von Jun-spezifischen Proteinkinasen (JNK). Weitere Komponenten des Anisomycin-induzierten Signalwegs werden sicherlich in der nahen Zukunft charakterisiert werden (Abb. 49).

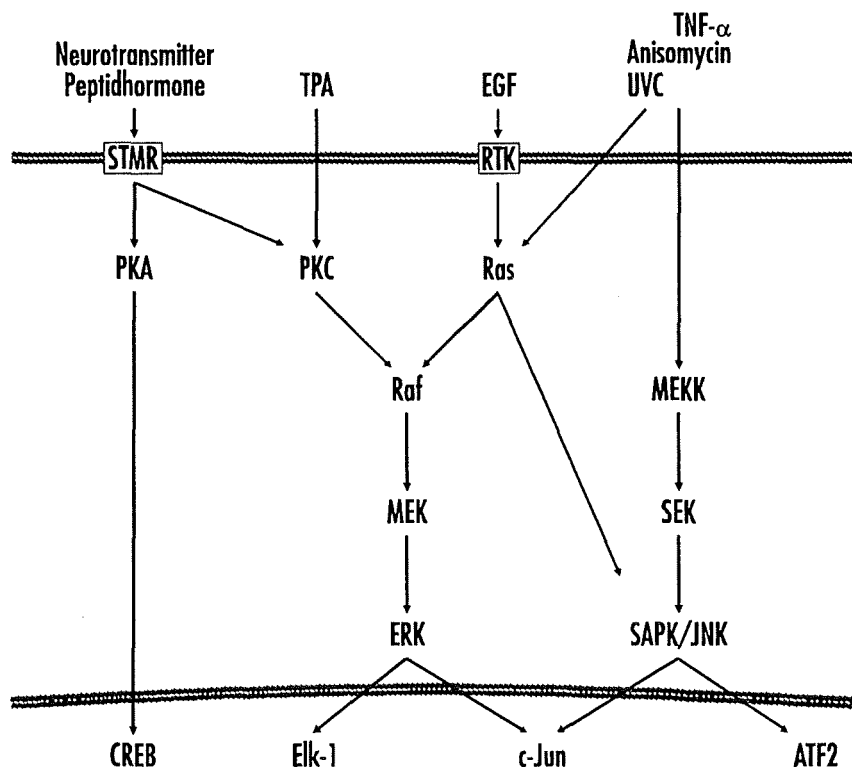


Abb. 49: Aktiviert Anisomycin Jun N-terminale Kinasen über MEKK und SEK? MEKK (MEK-Kinase 1) und SEK (SAPK-Kinase 1) sind neu identifizierte Komponenten des zum Transkriptionsfaktor c-Jun führenden Signaltransduktionswegs (Sánchez et al., 1994; Yan et al, 1994; Minden et al., 1994; Dérijard et al. (1995). ATF2 ist ein weiteres Substrat für JNK (Gupta et al., 1995).

3.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert, die für die maximale Induktion der Kollagenasetranskription durch PKC-aktivierende Phorbolster notwendig sind (IMS4, -182/-176; IMS3, -171/-163 und IMS2, -137/-128). Die Wichtigkeit des PEA3-Motivs (-91/-83) für die Kollagenasetranskription wurde zum ersten Mal für die Situation des authentischen Kollagenasepromotors bewiesen. Für die Abhängigkeit der Kollagenaseexpression von Proteinsynthese wurde ein Modell entwickelt, das die Interaktion zwischen proteinsyntheseabhängig aktivierten Transkriptionsfaktoren (IMF4 und IMF3) und der Chromatinstruktur des Kollagenasepromotors voraussetzt. Das Modell verknüpft Erkenntnisse über die Proteinbesetzung des Promotors im inaktiven und aktiven Zustand mit funktionellen Daten. Wesentlich für das Modell ist der Befund, daß die TPA-Induktion von transient transfizierten CAT-Konstrukten, die von Kollagenasepromotoren der Längen -1200/+63 bis -171/+63 kontrolliert werden, ebenfalls durch den Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin gehemmt wird. Kürzere Promotoren (-151/+63 bis -74/+63) werden dagegen proteinsyntheseunabhängig aktiviert. Anisomycin ist zudem ein sehr wirkungsvoller Aktivator von c-Jun-spezifischen Proteinkinasen (JNK) und AP-1 (c-Jun/c-Fos).

Strittig ist, ob Anisomycin die Expression von Kollagenasepromotor-Konstrukten über zwei unterschiedliche Mechanismen reguliert: Die TPA-Induktion langer Promotoren wird mit Sicherheit dadurch gehemmt, daß Anisomycin (in der Eigenschaft als Proteinsynthese-Inhibitor) die Synthese oder die proteinsyntheseabhängige Modifikation der aktivierenden Transkriptionsfaktoren verhindert, die an die IMS4 und IMS3 binden. Als Induktor der Transkription von *c-jun*, *c-fos*, des α -Globinpromotors, von AP-1-abhängigen Konstrukten (und wahrscheinlich auch des RSV-LTR), sowie als Aktivator von JNK, wirkt Anisomycin dagegen schon in einer Konzentration, die die generelle Proteinsynthese nicht meßbar hemmt (50 ng/ml). Es ist aber durchaus möglich, daß die Verfügbarkeit eines labilen oder nur in kleinen Mengen vorhandenen Proteins auch durch geringe Anisomycinkonzentrationen beeinträchtigt wird. Für einen Anisomycin-unspezifischen Mechanismus spricht, daß andere Proteinsynthese-Hemmstoffe, nämlich Puromycin und Cycloheximid, ebenfalls eine c-Jun-Phosphorylierung und eine Aktivierung AP-1-abhängiger Genkonstrukte bewirken.

In vielen Fällen haben sich neue Fragen gestellt. (1.) Es ist notwendig, die Faktoren IMF4, IMF3 und IMF2 zu identifizieren, um herauszufinden, ob sie neu synthetisiert oder proteinsyntheseabhängig modifiziert werden (IMF4, IMF3) und wie sie aktiviert werden (IMF2). Die Sequenzen der Bindestellen dieser Faktoren deuten darauf hin, daß IMF4 und IMF2 Proteine der AP-1-Familie sind und IMF3 ein Mitglied der C/EBP-Transaktivatorfamilie ist. (2.) Mit der internen Deletion der -231/-171-Sequenz in einem langen Kollagenasepromotorfragment sollte eindeutig gezeigt werden, ob an diese Region ein Repressorprotein bindet, das durch TPA proteinsyntheseabhängig inaktiviert wird. Wenn kein spezifischer Effekt nachgewiesen werden kann, sollte die Interaktion zwischen der Chromatinstruktur und Transkriptionsfaktoren bei der Kollagenasetranskription näher untersucht werden. (3.) Von großem Nutzen für die Aufklärung von

intrazellulären Signalwegen ist es auch, herauszufinden, wie Anisomycin zur Aktivierung der Jun-Kinasen führt.

"In der Welt ist es sehr selten mit dem Entweder-Oder getan"

Goethe, Die Leiden des jungen Werther (1774)

4. Material

4.1 Geräte und Hersteller

Beckman J2-HS Kühlzentrifuge mit Rotor JS-13.1 ¹ und JA-14 ²	Beckman Instruments GmbH, Stuttgart
BETAmatic Basic Liquid Scintillation Counter Computer:	Kontron Analytical, Schweiz
Macintosh Quadra 700	Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA
PS/2 Model 55 SX	IBM UK Ltd., Greenock, Scotland, UK
VAXstation 3100	Digital Equipment Corporation, Nashua, NH, USA
Eppendorf Tischzentrifugen Typ 5410 und 5415 C ³	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Forma Scientific Brutschrank	Labotect GmbH, Göttingen
Omnifuge 2.0 RS Kühlzentrifuge Rotor Typ 2250 ⁴	Heraeus Holding GmbH, Stuttgart
Perkin Elmer Cetus 9600 Thermocycler	Perkin Elmer
PhosphoImager Fujix BAS 1000	Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan
Spektralphotometer SPEKOL UV VIS	Carl Zeiss, Jena
Titertek Multiskan PLUS MKII Elisa-Reader	Labsystems, Finnland
Ultrazentrifugen (L7-65, L8-55, L8-70) Rotor SW40 ⁵ und VTi65 ⁶	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA
Ultrascan XL Laser Densitometer	LKB-Produkten AB, Bromma, Schweden
UV Stratalinker 2400	Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA

4.2 Wasser

Karlsruher Stadtwasser wurde durch einen Ionenaustauscher entsalzt, über ein *Milli-Q_{Plus}* Reinstwassersystem (*Millipore Corporation, Bedford, MA, USA*) gereinigt und autoklaviert. Zur Verwendung bei der RNA-Präparation und RNA-Analyse wurde das Wasser zusätzlich mit 0.002 Vol. Diethylpyrocarbonat heftig geschüttelt, 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert. *Hinweis:* DEPC ist karzinogen.

4.3 Chemikalien, Membranen und Bezugsquellen

12-O-tetradecanoyl-phorbol-acetat, TPA	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
3 mm Whatman Papier	Whatman Int. LTD, Maidstone, UK
Acetyl-Coenzym A (Lithiumsalz)	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Acrylamid/Bisacrylamid (30/0.8)	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Agarose (SeaKem LE)	Biozym Diagnostik, Hameln

¹ Ausschwingrotor, Radius = 140 mm

² Festwinkelrotor, Radius = 140 mm

³ Festwinkelrotor, Radius = 60 mm

⁴ Ausschwingrotor, Radius = 200 mm

⁵ Ausschwingrotor, Radius = 165 mm

⁶ Vertikalrotor, Radius = 90 mm

Ammoniumperoxodisulfat, APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin, Amp	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Anisomycin, Am	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bakterien-Petrischalen	Greiner Labor Technik, Frickenhausen
Cäsiumchlorid, CsCl	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Cycloheximid, Cx	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
DEAE-Dextran	Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden
DEAE-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
desoxy-Nukleosidtriphosphate	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
didesoxy-Nukleosidtriphosphate	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Aldrich-Chemie, Steinheim
Dimethyldichlorosilan	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfat, DMS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid, DMSO	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol, DTT	Boehringer Mannheim GmbH
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco BRL Life Tech. LTD, Paisley, UK
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99,6%	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid, EtBr	Sigma Chemie GmbH, St. Louis, MO, USA
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum, FCS	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein-Leopoldshafen
Glucose	Boehringer Mannheim GmbH
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glyoxal, 30% (6 M)	Merck, Darmstadt
Haftsilan GF31 (# 3249 QB)	Wacker-Chemie GmbH, München
Harnstoff	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
MES	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
MOPS	Millipore Products Division, Bedford, MA, USA
NaDOC	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Nutrient Broth	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Parafilm	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung	American National Can, Greenwich, CT, USA
Phenol, redestilliert, TE-gepuffert	Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA
PIPES	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
PMSF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Serva, Heidelberg
poly [dIdC], 2 µg/µl	Merck, Darmstadt
Puromycin, Pm	Boehringer Mannheim
PVP 360	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Qiagen-tip 500	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Quarzsand	Diagen GmbH, Hilden
Rinderserumalbumin, BSA	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Röntgenfilme (<i>Hyperfilm-MP</i>)	Serva, Heidelberg
Scintillationsflüssigkeit (Emulsifier-Safet)	Amersham Buchler, Braunschweig
SDS, Natriumdodecylsulfat	Packard Instr. Comp., Inc., Meriden, CT, USA
	Serva, Heidelberg

Sephadex G-25, G-50	Pharmacia, Freiburg
Spermidin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Sterilfilter	Renner GmbH, Dannstadt
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris-Base	Serva, Heidelberg
Trishydrochlorid, Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
tRNA, aus Hefe oder E. coli	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypsin	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Tween 20	Serva, Heidelberg
Zellkulturartikel	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Merck, Darmstadt und Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen in p.a.-Qualität bezogen.

4.4 Induktoren und Inhibitoren

4.4.1 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA, MG = 616.8 g/mol)

Das Lösungsmittel für TPA ist DMSO. Von einer Stammlösung (5 mg/ml) wurde die Arbeitslösung (200 µg/ml, 0.324 mM) hergestellt und im Dunkeln bei -20 °C aufbewahrt. Experimente wurden mit 3 µl TPA-Arbeitslösung (200 µg/ml) in 10 ml Zellkulturmedium durchgeführt (bzw. 6 µl TPA-Arbeitslösung in 20 ml Medium). Das entspricht einer Endkonzentration von 60 ng/ml (9.73×10^{-8} M). *Hinweis:* TPA ist ein sehr potenter Tumorpromotor und karzinogen.

4.4.2 Actinomycin D

10 mg Actinomycin D wurden in 2 ml Wasser gelöst (5 mg/ml Stammlösung). Davon wurden 40 µl zu 20 ml Zellkulturmedium gegeben, was eine Endkonzentration von 10 µg/ml Actinomycin ergibt. *Hinweis:* Actinomycin D hemmt die eukaryontische RNA-Polymerase II durch Einlagerung in die DNA und Verhinderung der Elongation.

4.4.3 Ampicillin (MG = 371.4 g/mol)

Ampicillin ist gut in Wasser löslich. Die Stammlösung (100 mg/ml) wurde bei -20 °C gelagert. Ampicillin wurde autoklavierten Bakterienmedien und Bakterienagar, nachdem diese auf 50 °C abgekühlt waren, in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. *Hinweis:* Das Bakteriocid inhibiert die bakterielle Zellwandsynthese durch Störung der Peptidoglycanbrückenbildung. Durch das bakterielle, plasmidcodierte Enzym β-Lactamase wird Ampicillin außerhalb der Zelle hydrolysiert.

4.4.4 Anisomycin (MG = 265.3 g/mol)

25 mg Anisomycin wurden über Nacht bei 4 °C in 5 ml 20% Ethanol gelöst. Die Anisomycin-Stammlösung (5 mg/ml, 0.019 M) wurde bei -20 °C gelagert; das Arbeitsaliquot war ca. 8 Wochen bei 4 °C haltbar. In der Regel wurde Anisomycin 10 - 15 min vor der TPA-Induktion eingesetzt: 40 µl Anisomycin-Stammlösung (5 mg/ml) wurden in 20 ml Zellkulturmedium gegeben; die

Endkonzentration war somit 10 µg/ml (3.77×10^{-8} M). *Hinweis:* Das aus *Streptomyces griseolus* gewonnene Antibiotikum Anisomycin inhibiert die Peptidyltransferase-Reaktion bei der eukaryontischen Proteinsynthese.

4.4.5 Cycloheximid (MG = 281.4 g/mol)

10 mg Cycloheximid wurden in 1 ml Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert (Stammlösung: 10 mg/ml, 0.0355 M). 10 - 15 min vor der Behandlung der Zellen mit dem Induktor wurden 20 µl Cycloheximid in 20 ml Zellkulturmedium gegeben. Das entspricht einer Endkonzentration von 10 µg/ml Cycloheximid. *Hinweis:* Cycloheximid blockiert die Ausbildung der Peptidbindung bei der eukaryontischen Proteinsynthese.

4.4.6 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol (DBR)

10 mg DBR wurden in 500 µl DMSO gelöst (20 mg/ml Stammlösung) und bei -20 °C gelagert. Um die zelluläre mRNA-Synthese zu hemmen wurden 25 µl DBR in 20 ml Zellmedium gegeben, entsprechend einer Endkonzentration von 25 µg/ml. *Hinweis:* DBR ist ein Nukleotid-Analogen und vergiftet die RNA-Polymerase II (Laub et al., 1980; Zandomeni et al., 1982; 1986)

4.4.7 Puromycin (Pm, MG = 544.4)

25 mg Puromycin wurden in 2.5 ml Wasser gelöst und mehrere Wochen lang bei 4 °C gelagert. 100 µl Puromycin-Stammlösung (10 mg/ml, 0.0184 M) wurden 10 - 15 min vor der TPA-Induktion in 20 ml Zellkulturmedium pipettiert, was einer Endkonzentration von 50 µg/ml (1.83×10^{-4} M) entspricht. *Hinweis:* Puromycin ist ein Analogon zum Aminoacyladenyl-Terminus der Transfer-RNA und inhibiert die Elongation bei der Proteinsynthese in Pro- und Eukaryonten.

4.4.8 Ultraviolette Strahlung (UVC, 256 nm)

Vor der Bestrahlung adherenter Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen, in einem sterilen Röhrchen aufbewahrt und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Der Waschpuffer wurde vollständig von der schräggestellten Kulturschale abgezogen. Zur Bestrahlung wurde eine 15 W Quecksilberdampf Lampe (Philips TUV 15 W, bezogen von *Vetter, Wiesloch*) verwendet, die in 32 cm Abstand zur Kulturschale montiert wurde. Die Zellen wurden 21 s lang mit monochromatischem ultraviolettem Licht der Wellenlänge 256 nm (UVC, halbmaximale Bandbreite 2.3 nm) bestrahlt, entsprechend einer Dosis von 40 J/m². Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in ihrem alten Medium weiterinkubiert. Mit den Kontrollzellen wurde, abgesehen von der UV-Bestrahlung, ebenso verfahren. *Hinweis:* Die eingesetzte Strahlendosis ist einer zweistündigen Sonnenexposition der Haut in 2000 m Höhe äquivalent (Herrlich u. Rahmsdorf, 1994).

4.5 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig erworben. Angegeben sind der Name der Substanz, die Katalognummer und die spezifische Aktivität.

D-Threo[dichloroacetyl- ¹⁴ C]-		
Chloramphenicol	CFA 754	2.07 GBq/mmol (56 mCi/mmol), 7.4 MBq/ml (200 µCi/ml)
[³⁵ S] dATPαS	SJ 1304	37 TBq/mmol (1000 Ci/mmol), 370 MBq/ml (10 mCi/ml)

[γ - ³² P] rATP	AA 0018	185 TBq/mmol (5000 Ci/mmol), 370 MBq/ml (10 mCi/ml)
[α - ³² P] dCTP	AA 0005	110 TBq/mmol (3000 Ci/mmol), 370 MBq/ml (10 mCi/ml)
[α - ³² P] rCTP	PB 20382	30 TBq/mmol (800 Ci/mmol), 740 MBq/ml (20 mCi/ml)

4.6 Gele

4.6.1 Präparative und analytische Agarose-Gele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für ein 0.6%-iges bis 2.0%-iges Agarose-Gel wurden 0.3 bis 1.0 g Agarose in 50 ml 0.5 x TBE-Laufpuffer pH 8.3 (0.5 x TBE: 45 mM Tris-Base, 45 mM Borat, 1.25 mM EDTA) durch 1 min kochen in der Mikrowelle gelöst, das verkochte Wasser aufgefüllt und 1.5 μ l 10 mg/ml Ethidiumbromid (0.3 μ g/ml f.c.) zugegeben. Die flüssige Agarose wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Verfestigen mit 0.5 x TBE-Laufpuffer bedeckt. Die Spannung für den Gellauf betrug im allgemeinen 100 V bei 40 mA Stromstärke. Die aufgetrennten DNA-Fragmente fluoreszieren im UV-Durchlicht ($\lambda = 302$ nm).

4.6.2 Analytisches Agarose-Gel für die Auftrennung von denaturierter RNA (sog. *Northern*-Gel)

Zwischen zwei saubere, autoklavierte Glasplatten (14 x 16 cm) wurde ein Acrylamid-Kissen (4 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 50 μ l 10% APS und 20 μ l TEMED) vorgelegt. 1.0 g Agarose wurde in 95 ml Wasser und 5 ml 20 x Phosphat-Puffer (20 x PP: 0.2 M NaH₂PO₄, 0.2 M Na₂HPO₄, pH 6.85) gelöst, das Volumen ergänzt und auf das Acrylamid-Kissen gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 x Phosphat-Puffer (10 mM f.c.) verwendet. Die vor dem Auftragen denaturierten RNA-Proben wurden im Kühlraum (4 °C) ca. 3 h lang mit 100 V aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-bande des Ladepuffers eine Laufstrecke von etwa 8 cm zurückgelegt hatte.

4.6.3 Denaturierendes, 8%-iges Polyacrylamid-Gel (sog. Sequenziergel)

Die Glasplatten (40 x 20 cm) für ein Sequenziergel wurden mit Spülmittel gewaschen und sorgfältig mit dest. Wasser gespült. Nach dem Trocknen wurde eine Platte mit 3 ml Haftsilan (300 μ l Silan GF31 und 3 ml konz. Essigsäure in 100 ml Ethanol), die andere mit 3 ml 5% Dimethyldichlorsilan (in Tetrachlorkohlenstoff) beschichtet, poliert und zusammengesetzt (0.5 mm "spacer"). Für ein 8%-iges Sequenziergel wurden 30 ml PAAH-Lösung (8 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0.8), 19 ml Wasser, 15 g Harnstoff (8 M f.c.) und 3 ml 10 x TBE⁷) hergestellt, filtriert und nach Zusatz der Polymerisationsstarter (250 μ l 10% APS und 15 μ l TEMED) zwischen die Glasplatten gegossen. Die Polymerisationszeit beträgt 30 Minuten. Das Gel lief ohne Proben 30 min bei 1800 V und 15 mA (20 Watt) vor, bis ungefähr 50 °C Wärme erreicht waren. Nach der Probenauftrennung (1.5 bis 2 h) wurden die Glasplatten getrennt, diejenige mit dem anhaftenden Gel 10 min in 5% Essigsäure fixiert und nach sorgfältigem Spülen unter laufendem Wasser 45 min bei 80 °C getrocknet. *Hinweis:* Acrylamid ist als Monomerlösung neurotoxisch.

4.6.4 Aufreinigung von Oligonukleotiden über ein präparatives 17%-Polyacrylamid-Gel

Beide Glasplatten (40 x 20 cm) wurden mit je 3 ml 5% Dimethyldichlorsilan in CCl₄ beschichtet, poliert und zusammengebaut (2 mm "spacer"). 38.4 g Harnstoff wurden in 52 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:0.8) und 9 ml 10 x TBE gelöst, filtriert und mit 400 μ l 10% APS und 40 μ l TEMED polymerisiert. 100 μ g Oligonukleotid wurde eingetrocknet, in 30 μ l Formamid-Ladepuffer (80% umkristallisiertes Formamid, 1 mM EDTA, 0.04% Bromphenolblau/ Xylencyanol) gelöst, 2

⁷ 1 L 10 x TBE pH 8.3: 109 g Tris-Base, 55.6 g Borsäure, 9.3 g EDTA

min lang bei 98 °C denaturiert, schnell auf Eis abgekühlt und in eine Geltasche (25 x 15 mm) geladen. Die Elektrophorese erfolgte 4 h bei 1000 V (30 mA) in 1 x TBE Laufpuffer. Die im Gel aufgetrennten Syntheseprodukte wurden 10 min lang mit 70 µl 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung in 700 ml Wasser gefärbt, das längste Oligomer auf dem UV-Leuchttisch ($\lambda = 302 \text{ nm}$) ausgeschnitten, zerkleinert und mit 5 ml Wasser über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Das Eluat wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und durch wiederholtes Ausschütteln mit gleichen Volumina *n*-Butanol auf 300 µl eingengt. Nach Zugabe von 30 µl 3 M Natriumacetat pH 4.8 (300 mM f.c.), 3 µl 1 M Magnesiumacetat (10 mM f.c.) und 1.800 µl Ethanol (6 x Vol.) wurde das Oligonukleotid bei -80 °C ausgefällt.

4.6.5 Denaturierendes, 10%-iges Protein-Gel (sog. *SDS-PAGE* nach Laemmli, 1970)

Die Glasplatten (28 x 20 cm) wurden mit Abstandshaltern (1 mm *spacer*) und Kamm zusammengebaut und rundherum mit Klebeband und 2%-iger Agarose abgedichtet. Das 10%-ige Trenngel (16.5 ml Wasser, 13.3 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 10 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.2 ml 20% SDS, 250 µl 10% APS und 25 µl TEMED) wurde eingegossen (ca. 4/5 des Gesamtgels) und mit 2 ml 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol abgegossen, die Geloberfläche vorsichtig mit Wasser gespült und das 5%-ige Sammelgel (8.7 ml Wasser, 2.5 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 3.75 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 75 µl 20% SDS, 100 µl 10% APS und 10 µl TEMED) auf das Trenngel gegossen (ca. 1/5 des Gesamtgels). Die Elektrophorese der denaturierten Protein-Proben erfolgte in 1 x Laemmli-Puffer pH 8.3 (2.32 g/L Tris-Base, 0.91 g/L Tris-HCl, 14.42 g/L Glycin, 1 g/L SDS) für 16 h bei 140 V.

Gele mit ^{35}S -markierten Proteinen wurden vor dem Trocknen mit PPO aktiviert. Dazu wurden sie dreimal 30 min in je 1 L DMSO zur Entwässerung geschüttelt und dann 4 h in einer Lösung von 22.2 g PPO in 100 ml DMSO gebadet. Das geschrumpfte Gel wurde unter fließendem, entionisiertem Wasser bis zur Normalgröße hydriert, getrocknet und bei -80 °C mit einer Verstärkerfolie 24 h bis 3 Tage exponiert.

4.6.6 4%-iges *Bandshift*-Gel

Für 30 ml der 4%-igen Acrylamid-Lösung wurden 4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:0.8), 1.5 ml 5 x TBE⁸, 24.5 ml Wasser, 250 µl 10% APS und 25 µl TEMED gemischt und zwischen zwei Glasplatten (16 x 14 cm, 1.5 mm Spacer) gegossen. Die Elektrophorese der Proben erfolgte mit 100 V in 0.5 x TBE für etwa 90 min. Das Gel wurde dann auf ein Whatman-Papier aufgebracht, im Vakuum bei 80 °C getrocknet und für mehrere Stunden autoradiographiert.

4.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen TIB-Molbiol, Berlin und MWG-Biotech, Ebersbach nach Auftrag synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden entweder FPLC-gereinigt erworben oder zur Abtrennung kürzerer Syntheseprodukte gelelektrophoretisch gereinigt (siehe 4.6.4).

4.7.1 Primer zur DNA-Sequenzierung und PCR-Klonierung

puc/M13 Primer	5' -GTTTCCAGTCACGAC-3'	17 nt
reverser CAT Primer	3' -CTCGATTCCCTTCGATTTAC-5'	20 nt
SP6 Prom. Primer	5' -GATTTAGGTGACACTATAG-3'	19 nt

⁸ 1 L 5 x TBE: 54.5 g Tris Base, 27.8 g Borsäure, 4.65 g EDTA (*Titriplex III*).

4.7.2 Kollagenaseprimer für die PCR-Klonierung von 5'-Promotordeletionsmutanten

-91, Coll.	-91 5'-GGAAGCTTAGAGGATGTTATAAA-3' Hind3	23 nt
-107, Coll.	-107 5'-GGAAGCTTTATTTCATAGCTAATC-3' Hind3	23 nt
-127, Coll.	-127 5'-GGAAGCTTTCTAATGATTGCC-3' Hind3	21 nt
-136, Coll.	-136 5'-GGAAGCTTGAGTCACCATTTCTA-3' Hind3	23 nt
-140, Coll.	-140 5'-GGAAGCTTCTAGGAGTCACCATTTTC-3' Hind3	24 nt
-151, Coll.	-151 5'-GGAAGCTTCAAATAATCTGCTAG-3' Hind3	23 nt
-161, Coll.	-161 5'-GGAAGCTTCAAGTGATTCCAAT-3' Hind3	23 nt
-171, Coll.	-171 5'-GGAAGCTTATTGCAACACCAAGT-3' Hind3	23 nt
-182, Coll.	-181 5'-GGAAGCTTTAATCATGACATTGC-3' Hind3	23 nt
-193, Coll.	-193 5'-GGAAGCTTGTGTTGAAGTTAATC-3' Hind3	22 nt
-207, Coll.	-206 5'-GGAAGCTTCCTTCGCACACATCT-3' Hind3	23 nt
-231, Coll.	-231 5'-GGAAGCTTACTGTTTACATGGCA-3' Hind3	23 nt
-300, Coll.	-300 5'-GGAAGCTTAGTACTCTTTGACCT-3' Hind3	23 nt

4.7.3 Kollagenaseprimer zur Einführung von Punktmutationen in den Kollagenasepromotor

m74 (mTRE)	wt	-86			-57	
	A	5'-ATGTTATAAAGCAGTACTCAGACAGCCTCT-3'		TG G		
	B	3'-TACAATATTTCCGTCATGAGTCTGTCGGAGA-5'				30 bp
				ScaI		
m88 (mPEA3)	wt	-100			-71	
	A	5'-AGCTAATCAAGAACATGTTATAAAGCATGA-3'		GG		
	B	3'-TCGATTAGTTCTTGTCACAATATTTTCGTACT-5'				30 bp
				Afl3		

m132 (mIMS2)	wt	-144		CACCA		-115	
	A	5'	-TCTGCTAGGAGTACATGTTTCTAATGATTG-3'				
	B	3'	-AGACGATCCTCATGTACAAAGATTACTAAC-5'				30 bp
Afl3							
m137 (mIMS2)	wt	-151		GGAG		-119	
	A	5'	-CAAATAATCTGCTATCGATCACCATTCTAATG-3'				
	B	3'	-GTTTATTAGACGATAGCTAGTGGTAAAGATTAC-5'				33 bp
Cla1							
m148 (mUEF2)	wt	-161		ATAA		-132	
	A	5'	-CAAGTGATTCCAACATGTCTGCTAGGAGTC-3'				
	B	3'	-GTTCACTAAGGTTGTACAGACGATCCTCAG-5'				30 bp
Afl3							
m167 (mIMS3)	wt	-177		CA CAC		-151	
	A	5'	-CATGACATTGACATGTCAAGTGATTCC-3'				
	B	3'	-GTACTGTAACGTACAGTTCACTAAGG-5'				27 bp
Afl3							
m181 (mIMS4)	wt	-		TA CA		-	
	A	5'	-CTTGTTTGAAGTACATGTTGACATGCAAC-3'				
	B	3'	-GAACAACTTCATGTACAACGTACGTTG-5'				30 bp
Afl3							
m223 (mNIP)	wt	-235		C T C		-206	
	A	5'	-AACCAGTGTTTAAACGGGAGAGTGTGTCTC-3'				
	B	3'	-TTGGTGACAAATTTGCCCTCTCACACAGAG-5'				30 bp
Dra1							

4.7.4 Kollagenasepromotor-Primer für genomische *in vivo footprints* (H. König, 1992)

kodierender Strang	Primer 1:	5'-TCCCAGCCTCTTGCTGCTCCAATAT-3'	
	Primer 2:	5'-GCTGCTCCAATATCCCAGCTAGGAA-3'	(62.5 °C)
	Primer 3:	5'-CTCCAATATCCCAGCTAGGAAGCTCCC-3'	(65.5 °C)
nicht-kodierender Strang	Primer 1:	5'-ACCACTGTTTACATGGCAGAGTGTG-3'	
	Primer 2:	5'-ATGGCAGAGTGTGTCTCCTTCGCAC-3'	(62.5 °C)
	Primer 3:	5'-CAGAGTGTGTCTCCTTCGCACACATCT-3'	(65.5 °C)

4.8 DNAs für die Transkription von Riboproben

Col.CAT SP6 Ein 330 bp großes *Hind3/Pvu2*-Fragment von -73/+63 CAT3 (Angel et al., 1987) wurde von Bernd Stein, Institut für Genetik, Karlsruhe in den *Hinc2/Hind3*-geöffneten Vektor pSP65 (*Promega*) ligiert. Zur *in vitro* Transkription der Probe wurde Col.CAT SP6 mit *Hind3* linearisiert. Das Proben-Transkript hat eine Größe von 347 nt. Korrekt initiierte Col.CAT-mRNA schützt die Probe über eine Länge von 244 nt, CAT-mRNA schützt 154 nt und das endogene Kollagenase-Transkript schützt 63 nt der Probe. Mit Kollagenase-CAT Plasmid DNA hybridisieren 318 nt der Probe.

TATA CAT SP6 Die Probe für TATA CAT6-Transkripte entstand durch die Ligation eines 317 bp langen *Hind3/EcoRI*-Fragmentes aus pTATA CAT6 in den *EcoRI/Hind3*-geschnittenen Vektor pSP65. Vor der Synthese der Proben-RNA wurde TATA CAT SP6 durch einen *Hind3*-Verdau linearisiert. Die 327 nt lange Probe hybridisiert mit TATA CAT-mRNA über eine Länge von 232 bp.

4.9 Proben für die Northern-Hybridisierung

- GAPDH (Ratte) pGAPDH-13 (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Fort et al., 1985) wurde mit *Pst*I verdaut, das 1.3 kb-Fragment isoliert und markiert.
- c-jun* (Mensch) Verwendet wurde das 1.4 kb-Fragment aus *Sma*I/*Hind*III-verdaulichem ph-cJ-1 (Angel et al., 1988 a)
- v-fos* (viral) Das 1.0 kb-Fragment von *Pst*I-geschnittenem puc9/*v-fos* (murines Osteosarcoma-Virus) wurde isoliert und radioaktiv markiert (Curran u. Teich, 1982; Rahmsdorf et al., 1987).

4.10 Plasmidkonstruktionen

Die Konstrukte -1200/+63 CAT3, -518/+63 CAT5, -74/+63 CAT5, -60/+63 CAT5, -517/-42 tkCAT4 und 5xTRE TATA CAT6 sind beschrieben (Angel et al., 1987 a; Schorpp et al., 1988; Brenner et al., 1989; Stein et al., 1989; Jonat et al., 1990). Der parentale Vektor ist pBLCAT2, ein Derivat des puc18-Vektor, der aus Teilen der pBR322- und m13mp18-Vektoren besteht (Luckow und Schütz, 1987). Die Vektoren pBL CAT4, pBL CAT5 und pTATA CAT6 unterscheiden sich lediglich durch ihre inserierten Promotoren: pBL CAT4 enthält einen Teil des Thymidinkinasepromotors (-105/+56; McKnight et al., 1984) von *Herpes simplex*, pBL CAT5 hat keine Promotorsequenzen und pTATA CAT6 (pL-T) nutzt eine künstliche TATA-Box (TATAAAA) als Determinante für den Transkriptionsstart (Ryffel et al., 1989; Jonat et al., 1990). Weitere funktionelle Elemente der Vektoren sind die Replikationsstartstelle (*colE1 ori*) und die codierenden Regionen für das prokaryontische β -Lactamase-Gen (*amp^R*, 860 bp), sowie das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT, 689 bp) mit anschließender *SV40 small T antigen*-Region (*polyA*, 853 bp). Die Insertion von Promotor- und Enhancersequenzen in die Restriktionsschnittstellen oberhalb des CAT-Reportergens führt zur erhöhten Expression des Gens in transfizierten eukaryontischen Zellen.

Über eine spezielle Klonierungstechnik (siehe 5.4.1) und mit den oben aufgeführten PCR-Primern wurden, ausgehend vom Konstrukt -518/+63 CAT5 bzw. -300/+63 CAT5, Deletionsmutanten und Punktmutanten des Kollagenasepromotors hergestellt (siehe Tab. 13 und 14). Die Endpunkte der Deletionen und die Basensubstitutionen in den Punktmutanten gehen aus den verwendeten PCR-Primern hervor (siehe 4.7.2 und 4.7.3). Die Numerierung unterscheidet sich aufgrund eines zusätzlichen Guanins an der Position -62 von derjenigen in Angel et al. (1987 a) um ein Nukleotid. Dieses Guanin ist auch im endogenen Kollagenasegen vorhanden (Angel et al., 1987 b; H.P. Auer, 1990; H. König, 1992). Auf die gleiche Weise wurde das TRE bzw. die PEA3-Erkennungssequenz im Konstrukt -518/-42 tk CAT4 mutiert. Für die Kollagenasepromotor-CAT B-Konstrukte wurde das *Hind*III/*Bam*HI-Kollagenasefragment in den *Hind*III/*Bam*HI-geöffneten pCAT-Basic Vektor (*Promega*; EMBL Accession Nr. X65322) ligiert. Im Genkonstrukt -136/+63 CAT5 wurde durch die Klonierung ein zweites Kollagenase-TRE an der Position -137/-129 gebildet. Das 3'-Nukleotid des *Hind*III-Linkers konvertiert die im Kollagenasepromotor an dieser Stelle vorkommende TRE-ähnliche Sequenz in ein TRE.

Wildtyp-Sequenz:

-136
|
5'-AAATAATCTGCTAG**GGAGT**CACCATTCTAA-3'
TRE-ähnliche Sequenz

→

-136/+63 CAT5:

-136
|
5'-GTGCCAAGCTT**TGAGT**CACCATTCTAA-3'
TRE

Tab. 13: Deletionsmutanten des Kollagenasepromotors

-300/+63 CAT5	-161/+63 CAT5	-91/+63 CAT5
-231/+63 CAT5	-151/+63 CAT5	
-206/+63 CAT5	-140/+63 CAT5	
-193/+63 CAT5	-136/+63 CAT5	-300/+63 CAT B
-181/+63 CAT5	-127/+63 CAT5	-207/+63 CAT B
-171/+63 CAT5	-107/+63 CAT5	-136/+63 CAT B

Tab. 14: Punktmutanten des Kollagenasepromotors mit Erläuterung der mutierten Sequenz *)

-518 m223	Mutation der NIP(I)-homologen Sequenz in -518/+63 CAT5
-300 m223	Mutation der NIP(I)-homologen Sequenz in -300/+63 CAT5
-518 m181	Mutation der distalen AP-1 Erkennungssequenz (IMS4) in -518/+63 CAT5
-518 m167	Mutation der C/EBP-Konsensussequenz (IMS3) in -518/+63 CAT5
-518 m148	Mutation der UEF2-ähnlichen Sequenz in -518/+63 CAT5
-300 m137	Mutation der GCN4-Erkennungssequenz (IMS2) in -300/+63 CAT5
-518 m132	Mutation der GCN4/Hinf-A-Erkennungssequenz (IMS2) in -518/+63 CAT5
-518 m88	Mutation der PEA3-Erkennungssequenz in -518/+63 CAT5
-518 m73	Mutation der TRE-Sequenz in -518/+63 CAT5
-518/-42 m88 tk	Mutation der PEA3-Erkennungssequenz in -518/-42 tk CAT4
-518/-42 m73 tk	Mutation der TRE-Sequenz in -518/-42 tk CAT4

*) Die Bezeichnung der internen Mutanten erfolgte nach dem ersten veränderten 5'-Basenpaar.

4.11 Enzyme und Hersteller

Klenow-DNA Polymerase I (5 U/μl)	Promega (Serva), Heidelberg
Restriktionsendonukleasen (8-20 U/μl)	Boehringer Mannheim New England Biolabs GmbH, Schwalbach Promega (Serva), Heidelberg
RNase A (10 mg/ml)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
RNase T1 (1.4 mg/ml, 550.500 U/mg)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
RNase Inhibitor (RNAguard, 1 U/μl)	Pharmacia, Freiburg
RQ1 DNase (1 U/μl)	Promega (Serva), Heidelberg
SP6 RNA Polymerase (10 U/μl)	Promega (Serva), Heidelberg
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	Promega (Serva), Heidelberg
T7 DNA Polymerase (13 U/μl)	USB GmbH, Bad Homburg
T4 Polynukleotid Kinase (8 U/μl)	Promega (Serva), Heidelberg
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	USB GmbH, Bad Homburg

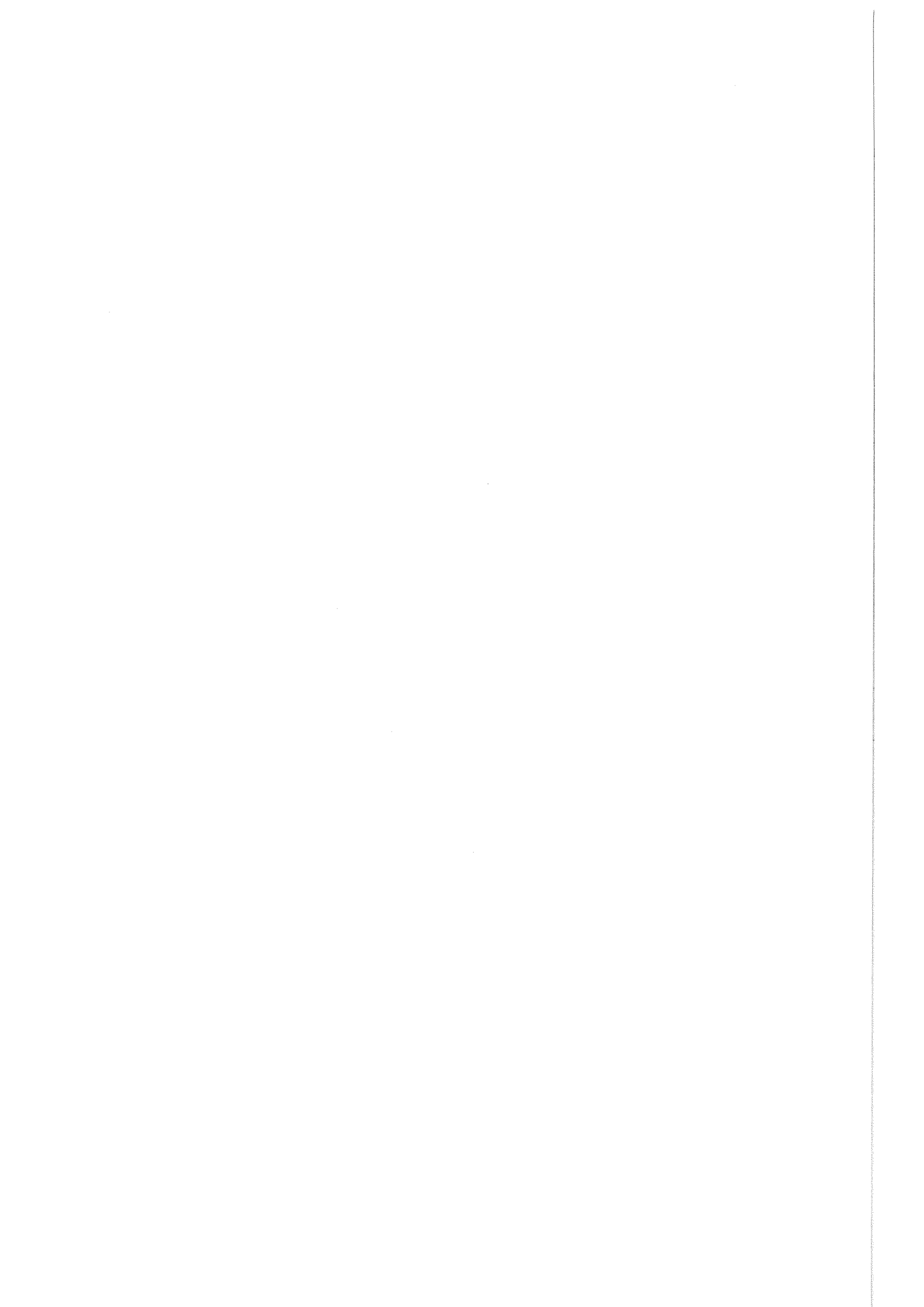
4.12 Antikörper

FosX-Ab	Antikörper gegen humanes c-Fos, 4. boost. Hergestellt von Frau Gisela Schütz, Institut für Genetik, Karlsruhe in Kaninchen.
c-Jun/AP1 (Ab-1)	Antikörper gegen humanes c-Jun, (0.1 mg/ml). Erworben von Oncogene Science, Inc., Uniondale, NY, USA.
ERK2-Ab	Antikörper gegen ERK2 (<i>anti Erk-2 rabbit #121</i>). Hergestellt von C. Marshall, ICRF, London, England.

4.13 Bakterien und Zellen

Bakterien und Zellen stammen aus der Zellbank des Institut für Genetik, Karlsruhe.

- E. coli DH5 α Genotyp: F⁻, ϕ 80 Δ lacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (lacZYA-argF)U169.
- HeLa tk⁻ Epithelial-ähnliche, aneuploide, menschliche Zelllinie. Ursprünglich Adenokarzinom. Subklon der parentalen HeLa-Linie mit Defizienz im Thymidinkinase-Gen. Die Zellen erhielt das Institut von Dr. Yung-Chi Cheng, Buffalo, NY, USA.
- F9 Undifferenzierte Zellen aus einem Testis-Teratokarzinom einer Maus des Stammes 129. Erhalten von Peter Angel, Institut für Genetik, Karlsruhe.



5. Methoden

5.1 Präparation von Nucleinsäuren

5.1.1 Reinigung und Fällung von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die wässrige Nucleinsäurelösung wurde mit 1/15 Vol. 3 M Natriumacetat pH 4.8 auf eine Endkonzentration von 0.2 M Natriumsalz eingestellt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 Vol.) etwa 1 Minute lang heftig geschüttelt und dann für 1 - 5 Minuten in einem geeigneten Rotor mit höchster Leistung zentrifugiert. Proteine sammeln sich z.T. in der Interphase, z.T. lösen sie sich zusammen mit anderen Verunreinigungen in der unteren, organischen Phase. Die obere, wässrige Phase wurde in einem neuen Zentrifugenröhrchen ein zweites Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1 Vol.) extrahiert und wiederum zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2.5 Vol. Ethanol (99.6%) vermischt. Nach 15 minütiger Fällung der Nucleinsäure bei -20 °C wurde die Nucleinsäure mit maximaler Drehzahl in einem geeigneten Rotor bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde zügig abgeschüttet und das Sediment sowie das Zentrifugenröhrchen vorsichtig mit 70% Ethanol gewaschen. Die Nucleinsäure wurde im Vakuum (*Savant SpeedVac* Evaporator oder Exiccator mit Wasserstrahlpumpe) bei Raumtemperatur getrocknet, in einem geeigneten Volumen Wasser bei 4 °C gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Ein größeres Volumen wässriger Nucleinsäurelösung wurde vor der Fällung durch wiederholtes Ausschütteln mit demselben Volumen *n*-Butanol eingeengt. Für die Fällung von Nucleinsäuren aus stark verdünnten Nucleinsäuren-Lösungen (< 0.5 µg/ml) wurde als Fällungshilfe 1 - 5 µg HefetRNA zugegeben und die Präzipitationszeit auf 30 min bei -80 °C verlängert. Zur Fällung von Nucleinsäuren aus SDS-haltigen Lösungen wurde an Stelle von Natriumacetat Natriumchlorid (0.2 M f.c.) verwendet. Kurze DNA-Stücke (< 100 bp) und Oligonucleotide wurden in Gegenwart von 0.3 M Natriumacetat und 10 mM Magnesiumchlorid mit dem 6-fachen Volumen Ethanol präzipitiert und mit 95% Ethanol gewaschen. Um nicht eingebaute Radionucleotide von markierter DNA oder RNA abzutrennen wurde mit Ammoniumacetat (2.5 M f.c.) gefällt. Die Radionucleotide verbleiben dabei im Überstand.

5.1.2 Schnelle Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus 1.5 ml-Bakterienkulturen

3 ml Luria-Bertani-Medium (LB: 10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 1 g/L Glucose) mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer ampicillinresistenten Bakterienkolonie (mit dem Plasmid der Wahl transformierte *E. coli* DH5α auf Selektionsagar) angeimpft und 16 h bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Präparation der Plasmid-DNA wurde in 1.5ml-*Eppendorf*-Reaktionsgefäßen durchgeführt. 1.5 ml Übernachtskultur wurden in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß überführt und 30 s bei 10.000 upm in der *Eppendorf*-Zentrifuge sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0 resuspendiert. Mit 200 µl 0.2 M NaOH, 1% SDS wurden die Bakterienzellen 5 min bei Raumtemperatur aufgeschlossen (Alkalische Lyse nach Birnboim und Doly, 1979; modifiziert). Proteine, Zellwand und genomische DNA wurden durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 4.8 koaguliert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Aufschluß mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 1 min lang heftig geschüttelt und das Koagulat bei Raumtemperatur mit maximaler Leistung der *Eppendorf*-Zentrifuge von der wässrigen Phase getrennt. Aus dem Überstand (400 µl) wurde mit 1 ml Ethanol die Plasmid-DNA präzipitiert (5 min, Raumtemperatur) und durch 10 min Zentrifugation bei 14.000 upm in der *Eppendorf*-Zentrifuge sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die

Plasmid-DNA getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen. 10 µl der Plasmidpräparation wurden zum Restriktionsverdau oder zur Sequenzierung eingesetzt.

5.1.3 Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus *E. coli* durch Ionenaustauscher-Säulenchromatographie

E. coli DH5α wurde mit Plasmid-DNA transformiert, auf Selektionsagar ausgestrichen und ein resistenter Klon etwa 20 h in 250 ml Selektionsmedium (LB, 100 µg/ml Ampicillin) kultiviert. Ein 900 µl-Aliquot der Bakterienkultur wurde sofort nach Zusatz von 100 µl DMSO bei -80 °C für unbestimmte Zeit eingefroren. Die Bakterienkultur wurde durch Zentrifugation (5 min mit 5.000 upm bei 4 °C im *Beckman JA-14* Rotor) und Aufnehmen in 10 ml 50 mM Tris-HCl, 10 ml EDTA, 2 mg RNaseA (pH 8.0) konzentriert und mit 10 ml 0.2 M NaOH, 1% SDS durch alkalische Lyse (Birboim und Doly, 1979; modifiziert) aufgeschlossen (5 min bei Raumtemperatur). Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml 3 M Kaliumacetat, pH 5.5 neutralisiert (5 min bei Raumtemperatur und 5 min auf Eis) und die denaturierte, unlösliche genomische DNA zusammen mit dem Protein-SDS-Komplex durch 20 minütige Zentrifugation im *Beckman JA-14* Rotor mit 10.000 upm bei 4 °C abgetrennt. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von *Qiagen-tip 500*-Säulen (*Qiagen Inc.*) nach dem Herstellerprotokoll. Die *Qiagen* Anionenaustauscher-Matrix ist ein makroporöses Silicagel mit einer hydrophilen Beschichtung. PH-Wert und Ionenstärke der Lösungen bestimmen das Bindeverhalten von Nukleinsäuren und Proteinen an das Säulenmaterial. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0 equilibriert. Das nach der Zentrifugation klare Zellysate wurde auf die Säule gegeben, wobei die DNA an die Säulenmatrix bindet. Verunreinigungen wie RNA, Proteine, Polysaccharide und Farbstoffe wurden mit 30 ml 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0 ausgewaschen. Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml 1.25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8.5 von der Säule eluiert, mit dem 0.75-fachen Volumen 2-Propanol bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation gewonnen (30 min mit 9.000 upm bei 4 °C, *Beckman JS-13.1* Rotor). Die DNA wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und über Nacht bei 4 °C in 800 µl Wasser gelöst. Auf diese Weise wurden ca. 1 mg Plasmid-DNA (der geschlossen zirkuläre Anteil betrug 90 - 95%) gewonnen.

5.1.4 Gesamt-RNA Präparation aus eukaryontischen Zellen über einen CsCl-Stufengradienten

$1.0 - 2.0 \times 10^7$ adherente HeLa tk⁻-Zellen wurden mit 10 ml 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 ml EDTA, 0.5% SDS und 0.33 mg/ml Proteinase K in der 14.5cm-Kulturschale lysiert. Das Zellysate wurde in 50ml-Greiner-Röhrchen geschabt, die genomische DNA durch Scheren im Ultraturax (10 s, 50% Leistung) zerkleinert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion mit jeweils 10 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol wurde der Überstand in ein *Beckman Ultraclear* (14 x 89 mm) Ultrazentrifugenröhrchen überführt, 0.4 g Cäsiumchlorid/ml eingewogen und vorsichtig mit 2 ml 5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA pH 8.0 unterschichtet. Der präparative Lauf erfolgte in einer *L8-55* Ultrazentrifuge im *SW40* Rotor der *Fa. Beckmann* für 15 h mit 32.000 upm bei 20 °C. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgezogen, die Röhrchenwände mit Kleenex getrocknet, das Sediment in 1.870 µl Wasser (DEPC-behandelt) gelöst (15 min auf Eis) und in ein 12 ml *Greiner* Zentrifugenröhrchen überführt. Die RNA wurde mit 130 µl 3 M Natriumacetat pH 4.8 (DEPC-behandelt) und 5 ml Ethanol 15 min bei -20 °C gefällt und mit 10.000 upm bei 4 °C im *Beckmann* Ausschwing-Rotor abzentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 373 µl Wasser (DEPC-behandelt) gelöst, in ein *Eppendorf*-Röhrchen pipettiert, mit Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt, mit 27 µl 3 M Natriumacetat sowie 1 ml Ethanol erneut präzipitiert, zentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Letztendlich wurde die Gesamt-RNA in 100 µl Wasser (DEPC-behandelt) aufgenommen, die Konzentration bestimmt und bei -80 °C

gelagert. Die Ausbeute betrug je nach Zelldichte und Behandlung 100-150 µg Gesamt-RNA. Etwa 1/3 der Ausbeute, d.h. 30-50 µg mRNA wurden für die Ribonukleaseschutz-Analyse eingetrocknet.

5.1.5 Präparation von Restriktionsfragmenten aus einem Agarose-Gel

Durch Restriktionsendonukleasen geschnittene oder durch die PCR-Methode vervielfältigte DNA wurde auf einem geeigneten Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei 302 nm fluoreszieren die DNA-Banden im UV-Durchlicht. Das Gel wurde unterhalb des zu isolierenden DNA-Fragments mit dem Skalpell horizontal eingeschnitten, in den Schlitz ein Stück DEAE-Membran (NA 45, 0.45 µm, *Schleicher & Schuell*) gesteckt und die Elektrophorese fortgesetzt, bis das Fragment vollständig an die Membran gebunden war. Das DNA-Fragment wurde in einem Mikroreaktionsgefäß mit 400 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0 von der Membran eluiert (30 min bei 65 °C), durch zweimaliges Ausschütteln mit Phenol/Chloroform gereinigt und mit 1 ml Ethanol präzipitiert.

5.1.6 Abtrennung freier Radionukleotide von markierter DNA durch Gelfiltration

Im Boden eines Mikrozentrifugenröhrchens wurde mit einer heißen 21G-Nadel ein Loch angebracht. Etwa 3 mm³ silikonisierter Quarzsand wurden eingefüllt, dieser mit 1.5 ml Sephadex G-50 oder G-25 Gel (*Pharmacia*, gesättigte Lösung in 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5) überschichtet und zentrifugiert. Alle Zentrifugationen wurden in einer *Heraeus Omnifuge* unter Verwendung eines Adaptorröhrchens für 2 min bei 4.000 upm durchgeführt. Die Säule wurde mit 30 µl 1 mg/ml sd DNA (zerkleinerte und denaturierte Lachssperma-DNA) beladen, zentrifugiert, mit 1 ml 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5 gewaschen und wiederum zentrifugiert. Unter dem Säulenröhrchen wurde nun ein Mikroreaktionsgefäß zum Auffangen der radioaktiven Probe angebracht, die Säule mit der markierten DNA beladen (Probenvolumen 20 bis 100 µl) und zentrifugiert. Freie Radionukleotide verbleiben in der Gelmatrix, die markierte DNA befindet sich im Durchfluss (sog. Größenausschluß-Chromatography). Die Aktivität der markierten Probe wurde im *Kontron-Scintillationszähler* bestimmt (Cerenkov-cpm).

5.1.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von DNA oder RNA in wässriger Lösung wurde spektrometrisch bestimmt. Dazu wurde die optischen Dichte einer 1:100 verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer *Spekol UV VIS (Carl Zeiss Jena)* gemessen. Die optische Dichte $OD_{260nm} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA, 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide oder 20 µg/ml singulärer Nukleotide.

5.2 Präparation von Proteinen

5.2.1 Gesamtprotein-Präparation für CAT-Analysen

Mit PBS gewaschene, adherente Zellen wurden von der 8.4cm-Kulturschale mit Hilfe eines Gummispatels und 1 ml PBS abgeschabt, in ein 1.5ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5000 upm 5 min lang sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment in 100 bis 200 µl 250 mM Tris-HCl pH 7.5 resuspendiert und die Zellen durch 3-maliges Gefrieren im Trockeneis-Ethanolbad (10 min) und Auftauen bei 37 °C (5 min) mit anschließendem Vortexen (30 s) aufgebrochen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer (10 min Zentrifugation mit 10.000 upm) wurde der Überstand in ein neues 1.5ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

5.2.2 Präparation von Zellkernextrakten aus HeLa-Zellen (Dignam et al., 1983; Andrews und Faller, 1991).

Mit eiskaltem PBS gewaschene adherente Zellen wurden mit einem Gummischaber und 2 ml PBS von der 13.3cm-Kulturschale abgelöst und in ein 14ml-Zentrifugenröhrchen transferiert. Die Zellen wurden 5 min mit 1000 upm bei 4 °C sedimentiert, in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert, in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt, 10 s in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert und in 400 µl (etwa 3-faches Volumen des Sediments) kaltem Puffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)¹ aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension 10 s lang gevortext und 8 x durch eine 27G-Kanüle (ø = 0.40 mm) gedrückt. Die Zellkerne wurden 10 s mit 13.000 upm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellkerne in 20-100 µl (etwa 1.5-faches Sedimentvolumen) kaltem Puffer C (200 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF und 25 Vol.% Glycerol) aufgenommen und die Kernproteine durch 20 min Inkubation auf dem Rotationsmischer bei 4 °C extrahiert. Die Membranbruchstücke wurden durch Zentrifugation abgetrennt (3 min, 13.000 upm bei 4 °C), der Überstand aliquotiert, rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry et al. (1951).

5.2.3 Präparation von Proteinextrakten zum Nachweis der p42^{MAPK} (Leevers u. Marshall, 1992)

In einer 8.4cm-Kulturschale adherent wachsende Zellen wurden mit ca. 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und mit 500 µl eiskaltem MAPK-Zellysis-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM Na-Pyrophosphat, 50 mM NaF, 5 mM MgCl₂, 100 µM Na₃VO₄, 10 mM EGTA, 1 Vol% Triton X-100, 0.5 Vol.% NaDOC, 0.1 Vol.% SDS) 30 min lang auf Eis inkubiert. Das Zellysate wurde zusammengeschaßt und in einem 1.5ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Unlösliche Bestandteile wurden 10 min lang mit 12.000 upm im Kühlraum abzentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Lowry-Methode bestimmt.

5.2.4. Präparation von metabolisch markierten Proteinen (RIPA-Zellysate)

Nach der metabolischen Markierung neusynthetisierter Proteine (siehe 5.5.4) wurde das radioaktive Medium mit der Pipette abgenommen. Die Zellen wurden mit 1.5 ml PBS gewaschen, mit 800 µl RIPA² lysiert und zusammengeschaßt. Die zelluläre DNA wurde durch sechsmaliges Pipettieren mit einer blauen Pipettenspitze geschert. Dann wurde das Zellysate in ein *Beckman* UZ-Röhrchen transferiert und 30 min lang mit 50.000 upm bei 2 °C zentrifugiert (*Beckman TL-100* Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, bei -80 °C eingefroren oder geteilt und in neue 1.5ml-Eppendorfröhrchen zu vorgelegten 20 µl ProteinA-Sepharose (vorgekoppelt) gegeben und zur Immupräzipitation (siehe 5.9.3) eingesetzt. *Hinweis:* Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, alle Puffer waren eisgekühlt. Proteinase-Inhibitoren wurden dem RIPA-Lysispuffer direkt vor Gebrauch aus Stammlösungen zugegeben.

¹ DTT und PMSF wurden den Dignam-Puffern vor Arbeitsbeginn frisch zugegeben. Die Stammlösungen (1M DTT und 100 mM PMSF in Ethanol) wurden bei -20 °C gelagert, die Dignam-Puffer bei 4 °C.

² RIPA: 50 mM Tris-HCl pH 8, 125 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5% NaDOC, 0.1% SDS. Endkonzentrationen der Protease-Inhibitoren in RIPA+: 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Aprotinin A, 0.5 mM PMSF.

5.3 Enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren

5.3.1 DNase-Behandlung von RNA

RNA-Präparationen aus transient transfizierten Zellen können mit Plasmid-DNA verunreinigt sein, die unter Umständen den Nachweis der spezifischen RNA stört. War dies der Fall, so wurden 30-50 µg Gesamt-RNA in 42 µl Wasser resuspendiert und mit 5 µl 10 x DNase Puffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂), 1 µl RNase-Inhibitor (1 U/µl), 1 µl Hefe-tRNA (10 µg/µl) und 1 µl RQ1-DNase (1 U/µl, RNase-frei) 15 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 323 µl Wasser und 27 µl 3 M Natriumacetat verdünnt und die RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Nach der Fällung mit 1 ml Ethanol wurde die RNA in Hybridisierungspuffer aufgenommen.

5.3.2 Fragmentierung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Im allgemeinen wurde 1 µg DNA in einer 20µl-Reaktion in dem vom Hersteller des Enzyms vorgeschlagenen Verdauopuffer mit 2.5 Einheiten des Restriktionsenzym bei 37 °C für 3 h inkubiert.

5.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Zur Verbindung von kohäsiven DNA-Enden wurden 1 µg DNA-Fragmente (jeweils gleiche Molaritäten freie Enden³) und 1.5 Einheiten T4-DNA-Ligase in einer 20µl-Reaktion (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 1 mM rATP) auf Eis gemischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Zur Ligation von stumpfen DNA-Enden wurde eine 5- bis 10-fach höhere Enzymkonzentration verwendet. Als Kontrolligation diente ein Ansatz ohne Insertfragment (Kontrolle der Religationseffizienz des Vektorfragments) und ein Ansatz ohne Ligase (Kontrolle der Verunreinigung der DNA-Fragmente durch intaktes Plasmid). Die Hälfte der Ligationsreaktion wurde zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

5.3.4 Kinasierung von Oligonukleotiden mit T4-PNK (sog. 5' end labeling)

T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) katalysiert den Transfer des ATP-γ-Phosphats auf das 5'-OH Ende von einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA. Zur Markierung des 3. Primers bei genomischen *footprint*-Analysen wurden 20 pmol Primer mit 15 µl [γ-³²P] rATP (10 mCi/ml) und 10 Einheiten T4-PNK in einer 20µl-Reaktion (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT f.c.) für 60 min bei 37 °C inkubiert. 2 µg *puc9/Hae3*-Fragmente wurden mit 5 µl [γ-³²P] rATP radioaktiv markiert und dienten als Größenmarker bei SP6-Analysen. Für die Polynukleotidkinasierung bei *bandshifts* wurden 5 pmol doppelsträngiges Oligonukleotid und 3 µl [γ-³²P] rATP eingesetzt. Die markierten Produkte wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt (*footprint*-Primer) oder 10 min auf 65 °C erhitzt und durch Gelfiltration (*Sephadex G-25* Matrix) gereinigt (Marker und *bandshift*-Oligonukleotide).

5.3.5 Markierung von Oligonukleotiden mit Klenow-DNA-Polymerase I (sog. *filling-in*)

Dem Klenow-Fragment (76 kDa) der DNA Polymerase I fehlt die 5'-3' Exonukleaseaktivität der intakten DNA Polymerase I. Das Enzym besitzt jedoch weiterhin 5'-3' Polymeraseaktivität und 3'-5' Exonukleaseaktivität, weshalb es zur Radiomarkierung von Nukleinsäuren mit überhängenden 5' Enden verwendet werden kann. Für Gelretardations-Experimente wurden 5 pmol Oligonukleotid in

³ 1 µg 1.000 bp ds DNA = 1.52 pmol (3.03 pmol Enden); 1 pmol 1.000 bp ds DNA = 0.66 µg

einer 20 µl-Reaktion (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT und je 25 µM dGTP, dATP, dTTP) mit 2 µl [α -³²P] dCTP (10 µCi/µl) und 5 Einheiten *Klenow*-DNA Polymerase I für 30 min bei 37 °C inkubiert und nach dem Zusatz von 1 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 und 59 µl Wasser durch Gelfiltration (*Sephadex G-25 Matrix*) gereinigt.

5.3.6 *in vitro* Transkription der Probe für Ribonukleaseschutz Analysen (Melton et al., 1984)

In einer 20 µl-Reaktion wurden 5 µl [α -³²P] rCTP (20 mCi/ml), 5 µl Wasser, 4 µl 5 x Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM Spermidin), 1 µl 100 mM DTT, 2 µl 10 x rNTPs (5 mM rGTP, 5 mM rATP, 5 mM UTP und 0.5 mM rCTP), 1 µl RNase Inhibitor (1 U/µl), 1 µl Matrizen-DNA (100-500 ng/µl, siehe 4.6.6) und 1 µl SP6 RNA Polymerase (10 Einheiten/µl) gemischt und 45 min lang bei 40 °C inkubiert. Zum Transkriptionsmix wurden 8 µl Wasser, 1 µl 10 x DNase Puffer (400 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) und 1 µl RQ1 DNase (1 U/µl) gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Zufügen von 1 µl tRNA (5 µg/µl), 69 µl Wasser und 50 µl 7.5 M Ammoniumacetat (2.5 M f.c.) wurde die Reaktion mit jeweils 150 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und der Überstand mit dem 2.5-fachen Volumen (375 µl) Ethanol versetzt. Die Fällung der transkribierten RNA erfolgte für 30 min bei -20 °C. Die RNA wurde durch Zentrifugation (15 min mit 12.000 upm bei 4 °C) gewonnen, mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und nach Abschütten des Überstands im Rotationsverdampfer getrocknet. Die Riboprobe wurde in 100 µl Formamid-Hybridisierungspuffer (80% Formamid, 40 mM PIPES pH 6.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) gelöst. 1 µl der Probe hatte im allgemeinen eine Aktivität von > 600.000 Cerenkov-cpm.

5.3.7 Markierung von DNA-Proben für *Northern*-Analysen (sog. *random primed labeling*)

1 µl (25-100 ng) der DNA-Probe wurde mit 24 µl Wasser und 10 µl 9-mer Primermischung (mit zufälliger Sequenz; *Amersham Megaprime DNA labeling system*) 5 min lang bei 95 °C gekocht und nach der Zugabe von 10 µl 5-fach konzentrierter Pufferlösung (*Amersham*), 3 µl [α -³²P] dCTP und 2 µl T7 DNA Polymerase (1 U/µl) 10 bis 15 min lang bei 37 °C inkubiert. Nicht polymerisierte Nukleotide wurden durch Gelfiltration (*Sephadex G-50 Matrix*) abgetrennt.

5.4 PCR-Klonierungstechniken

5.4.1 5'-Deletion des Kollagenasepromotors

In 100 µl Gesamtvolumen wurden 50 ng DNA (-518/+63 CAT5), 50 µl 2 x PCR_K⁴-Puffer, 10 µl 2 mM dNTP-Mix, 25 pmol Kollagenaseprimer (siehe 4.6.2), 25 pmol reverser CAT-Primer (siehe 4.6.1) und 2.5 Einheiten Taq Polymerase gemischt und 25 Zyklen der folgenden Polymerase-Kettenreaktion unterworfen: 45 s bei 94 °C (Denaturierung), 45 s bei 50 - 65 °C (Hybridisierung der Primer) und 60 s bei 74 °C (Synthese). Zweimal 10 µl der PCR-Reaktion wurden mit je 2.5 µl Probenpuffer gemischt und dienen als Kontrollen für die PCR bzw. für den nachfolgenden Verdau. 80 µl der PCR wurden mit 13.4 µl 3 M Na-Acetat und 106.6 µl Wasser versetzt, durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform gereinigt, mit 500 µl Ethanol gefällt (15 min, -20 °C), abzentrifugiert (15 min, 13.000 upm, 4 °C), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl Wasser gelöst. Dazu wurden 3 µl 10 x Verdaupuffer B (*Boehringer Mannheim*), 1 µl *Hind3* (10 U/µl) und 1 µl *BamHI* (10 U/µl) gegeben und 4 bis 16 h lang bei 37 °C inkubiert. Das *Hind3/BamHI*-geschnittene PCR-Fragment wurde, abhängig von der Produktgröße, in einem 1.2 bis

⁴ 2 x PCR_K: 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.5, 3 mM MgCl₂, 0.02 Vol.% Gelatine.

1.8%-igen Agarosegel aufgetrennt, mit einem Stück DEAE-Membran (5.1.5) isoliert und mit *Hind3/BamH1*-verdautem pBLCAT5 ligiert.

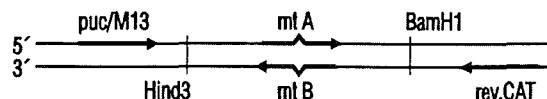
5.4.2 Einführung von Punktmutationen in den Kollagenasepromotor

Die PCR-Ansätze A und B wurden wie in Tab. 15 angegeben gebildet. Die Skizze veranschaulicht die Lage der Primer. Als Matrizen-DNAs wurden die ungeschnittenen Plasmide -517/+63 CAT5 oder -300/+63 CAT5 verwendet. Die benutzten Kollagenaseprimer sind in 4.7.3 aufgeführt. Mit beiden Ansätzen wurden 25 Zyklen der ersten Polymerase Kettenreaktion durchgeführt: 45 s bei 94 °C (Denaturierung), 45 s bei 50 °C (Primerhybridisierung) und 60 s bei 74 °C (Synthese). Nach der PCR wurden die Reaktionen im Rotationsverdampfer nahezu vollständig eingetrocknet. Die PCR-Produkte wurden in einem 1.6%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe eines Stücks DEAE-Membran isoliert (siehe 5.1.5). Jeweils 50 - 100 ng der Produkte A und B wurden für die zweite Polymerase-Kettenreaktion mit 50 µl 2 x PCR_K-Puffer, 10 µl 2 mM dNTP-Mix, 25 pmol puc/M13-Primer, 25 pmol reverser CAT-Primer und 2.5 Einheiten Taq Polymerase gemischt (100 µl Gesamtvolumen). Die Parameter für die zweite PCR waren: 25 Zyklen zu je 1 min bei 94 °C, 1 min bei 50 °C und 2 min bei 74 °C. Die Produkte der zweiten PCR wurden wie oben beschrieben (5.4.1) gereinigt, präzipitiert und über Nacht mit *Hind3* und *BamH1* verdaut, bevor sie in die *Hind3/BamH1*-geschnittenen und gelgereinigten Ausgangsvektoren kloniert wurden.

Tab. 15: Reaktionsansätze für die 1. PCR

	Ansatz A	Ansatz B
Matrizen-DNA	50 ng	50 ng
2 x PCR _K -Puffer	50 µl	50 µl
2 mM dNTP-Mix	10 µl	10 µl
Kollagenaseprimer	25 pmol mt A	25 pmol mt B
Sequenzierprimer	25 pmol rev.CAT	25 pmol puc/M13
Taq Polymerase	2.5 Einheiten	2.5 Einheiten
Reaktionsvolumen	100 µl	100 µl

Lage der Primer



5.5 Zellkultur und Transfektion

5.5.1 Zellkultur

HeLa tk Zellen wurden in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM), supplementiert mit 8% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% PS-Lösung (PS-Lösung: 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) bei 37 °C und 6% CO₂ kultiviert. Zum Hungern der Zellen wurde DMEM mit 1% PS ohne FCS verwendet. Alle 2-3 Tage wurden nahezu konfluente HeLa-Zellen mit 2 ml 0.25% Trypsin-Lösung gespült und mit 1 ml 0.25% Trypsin durch 3 min Inkubation bei 37 °C von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium gut resuspendiert, zur weiteren Kultur ausreichend verdünnt (1:4 bis 1:8) oder für ein Experiment verwendet. Die Zellzahl wurde aus einer 1:10 verdünnten Probe mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

F9 Maus Teratokarzinoma Stammzellen wurden in DMEM und F12-Medium (1:1), supplementiert mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamat, 170 µM β-Mercaptoethanol und 100 U/ml

Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 6% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde täglich erneuert. Jeden 2. Tag wurden die Zellen trypsiniert und 1:6 verdünnt passagiert.

Zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff wurden 5 x 10⁶ Zellen/ml in eiskaltem DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert, in einem Styroporbehälter langsam auf -80 °C abgekühlt (über Nacht) und schließlich bei -192 °C (N₂-Tank) eingefroren. Das Auftauen tiefgefrorener Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium suspendiert, zentrifugiert (5 min, 900 upm, *Omnifuge*), erneut in Medium aufgenommen und kultiviert.

5.5.2 Transiente Transfektion von HeLa tk⁻ mit DEAE-Dextran (nach Kawai und Nishizawa, 1987)

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende HeLa tk⁻ Zellen trypsiniert und in einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen pro 10 ml Medium in eine 8.4cm-Kulturschale (für CAT-Bestimmung) bzw. in einer Dichte von 3 x 10⁶ Zellen pro 20 ml Medium in eine 13.3cm-Kulturschale (für Ribonukleaseschutz-Analyse) eingesät. Zur Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit ca. 10 ml PBS⁵ (isotonischer Puffer) gewaschen. Das Schrägstellen der Petrischalen gewährleistete die nahezu vollständige Entfernung des Mediums und des Waschpuffers. Der Transfektionsmix bestand aus 5.0 - 7.5 µg/ml DNA in 1 x TBS⁶ und 0.5 µg/ml DEAE-Dextran (siehe Tab. 16) Die Zellen wurden mit dem Transfektionsmix 30 min lang bei RT inkubiert, wobei die Kulturschale alle 10 min geschwenkt wurde, um den Transfektionsmix gleichmäßig zu verteilen. Dann wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 ml bzw. 20 ml frischem DMEM, 8% FCS, 1% PS im Brutschrank bei 37 °C und 6% CO₂ inkubiert. Nach 18 bis 22 h wurden die Zellen mit dem Induktor behandelt.

Tab. 16: Lösungen für die DEAE-Dextran Transfektion

CAT-Bestimmung: 1 ml Transfektionsmix für eine 8.4cm-Kulturschale (Transfektion mit 980 µl)		
Plasmid-DNA 5.0 µg	1 x TBS 950 µl	10 mg/ml DEAE-Dextran in 1 x TBS 50 µl
RNaseschutz-Experiment: 2 ml Transfektionsmix für eine 13.3cm-Kulturschale (Transfektion mit 1.9 ml)		
Plasmid-DNA 15.0 µg	1 x TBS 1900 µl	10 mg/ml DEAE-Dextran in 1 x TBS 100 µl

5.5.3 Calciumphosphat-Transfektion von HeLa tk⁻ und F9-Zellen (Graham und van der Eb, 1973; mod. nach Chen und Okayama, 1987)

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen (HeLa tk⁻, undifferenzierte F9 Teratokarzinoma Stammzellen) trypsiniert und in einer Dichte von 3 x 10⁶ Zellen pro 20 ml Medium in eine 13.3cm-Kulturschale eingesät. Für den Transfektionsmix wurden 7.5 µg/ml DNA in 250 mM CaCl₂ gelöst und dann Tropfen für Tropfen zum doppelten Volumen 2 x HBS⁷ (HeLa) bzw. 2 x

⁵ 1 L PBS: 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0.2 g KH₂PO₄ x 2 H₂O, 0.13 g MgCl₂ x 6 H₂O, 0.2 g CaCl₂

⁶ 1 L 20 x TBS pH 7.5: 60.6 g Tris-Base, 160 g NaCl, 7.6 g KCl, 2 g CaCl₂, 2 g MgCl₂. Steril filtriert und autoklaviert. 500 ml 1 x TBS: 475 ml steriles Wasser, 25 ml 20 x TBS, 600 µl 0.5 M Na₂HPO₄.

⁷ 100 ml 2 x HBS pH 7.05 (Raumtemperatur): 5.6 ml 5 M NaCl (280 mM f.c.), 300 µl 0.5 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O (1.5 mM f.c.), 1.19 g HEPES (50 mM f.c.). Steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

BBS⁸ (F9) gemischt (Tab. 17). Nach 20 min wurde das Calciumphosphat/DNA-Präzipitat tropfenweise über die Kulturschale verteilt ins Medium gegeben. Die Zellen wurden 8 bis 14 h lang im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO₂ (HeLa) oder bei 35 °C und 3% CO₂ (F9) inkubiert und nach dem Absaugen des Transfektionsmediums mit ca. 10 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml DMEM, 10 % FCS, 1% PS (HeLa) bzw. 20 ml DMEM/F12-Medium (1:1), supplementiert mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamat, 170 µM β-Mercaptoethanol und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (F9) wurden die Zellen weitere 8 bis 14 h im Brutschrank (37 °C und 6% CO₂) kultiviert, bevor der Induktor zugegeben wurde.

Tab. 17: Lösungen für die CaP-Transfektion nach Chen und Okayama

2 ml Transfektionsmix für eine 13.3cm-Kulturschale (Transfektion mit 1900 µl)			
Plasmid-DNA 15.0 µg	steriles Wasser 900 µl	2.5 M CaCl ₂ 100 µl	2 x HBS oder 2 x BBS 1 ml

5.5.4 Metabolische Markierung von Proteinen (sog. *in vivo labeling*)

Zur Markierung zellulärer Proteine mit ³⁵S-Methionin wurden 5 x 10⁵ HeLatk⁻ Zellen in eine Zellkulturschale (ø = 5 cm) eingesetzt, nach 24 h Wachstum in Vollmedium für weitere 24 h in DMEM, 0% FCS, 1% PS inkubiert und dann zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend 3 h lang in 1.3 ml RPMI-Medium⁹ incl. 15 µl ³⁵S-Methionin in einer geschlossenen Kiste im Brutschrank des Isotopenlabors (37 °C, 6% CO₂) inkubiert. Ein Aktivkohlebett, auf das die Zellkulturschalen gestellt wurden, absorbierte flüchtige, radioaktive Produkte, die beim Stoffwechsel und beim radiochemischen Zerfall der ³⁵S-Aminosäure entstehen. Im Anschluß daran wurde der Induktor zugegeben (z.B. 60 ng/ml TPA). 20 min später wurden die Zellen in RIPA lysiert (siehe 5.2.4).

Zur Markierung mit ³²P-Orthophosphat wurden 2 x 10⁶ Zellen pro 8.4cm-Kulturschale eingesetzt, die nach 24 h Wachstum in Vollmedium für weitere 24 h mit DMEM, 0% FCS, 1% PS gehungert und dann mit phosphatfreiem TBS gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Zellen 3 h lang in 1.5 ml phosphatfreiem Medium ("*DMEM deficient*", ohne FCS, ohne PS) inkubiert, das mit 100 µl ³²P-Orthophosphat (1 mCi) versetzt wurde. Augen, Hände und Körper wurden so gut wie möglich vor der Strahlung geschützt. Nach 3 h wurden die Zellen mit den Induktoren behandelt und später in RIPA lysiert.

5.5.5 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1986)

E. coli DH5α wurden über Nacht in 10 ml 1 x NB-Medium (10 g/L Nutrient Broth und 5 g/L Hefeextrakt) kultiviert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml SOB⁺-Medium (20 g/L Bacto Trypton, 2 g/L Hefeextrakt, 0.5 g/L NaCl, 0.186 g/L KCl, ~100 µl 10 N NaOH, 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄, pH 7.0)¹⁰ angeimpft und im Warmluft-Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.3-0.4 erreicht war (ca. 2 H). Die Bakterienkultur wurde geteilt (2 x 50ml), 10 min auf Eis abgekühlt und sedimentiert (10 min mit 3000 upm bei 4 °C in der *Omnifuge*). Die Bakterien wurden vorsichtig in je 10 ml eiskaltem STB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂ x 4H₂O, 10 mM CaCl₂ x 2H₂O, 3 mM Hexamin-CoCl₃, 10 mM MES, 15 Vol.% Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert.

⁸ 100 ml 2 x BBS pH 6.95 (Raumtemperatur): 5.6 ml 5 M NaCl (280 mM f.c.), 150 µl 1 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O (1.5 mM f.c.), 1.067 g BES (N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminosulfoxidsäure, 50 mM f.c.). Steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

⁹ Sigma RPMI 1640 No. R7130 (L-Leucin-, L-Lysin-, L-Glutamin-, Na₂CO₃-defizient). 10 ml RPMI wurden mit 50 µl 200 x L-Leucin (Sigma), 50 µl 200 x L-Lysin (Sigma) und 100 µl 200 mM L-Glutamin angereichert.

¹⁰ Die Magnesiumsalze wurden nach dem Autoklavieren des Mediums aus sterilen Stammlösungen zugegeben.

Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert, in je 4 ml eiskaltem STB resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

200 µl kompetente Bakterien wurden mit 5-10 µl Ligationsansatz (oder 5 ng *supercoiled* Plasmid-DNA) gemischt, 45 min auf Eis inkubiert, dann 3 min lang auf 37 °C erwärmt (Hitzeschock) und wieder auf Eis abgekühlt, bevor sie 10 min mit 3000 upm bei 4 °C sedimentiert wurden. Die transformierten Bakterien wurden in 3 ml SOC (SOB⁺ mit 20 mM Glucose) schonend aufgenommen und 45 min im 37 °C-Inkubator geschüttelt. Von der Bakteriensuspension wurden 200 µl auf Selektiv-Agarplatten (10 g/L Nutrient Broth, 5 g/L Hefeextrakt, 15 g/L Bacto Agar und 100 mg/L Ampicillin) ausgestrichen, der Rest abzentrifugiert, in 200 µl SOC resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, die Einzelkolonien am nächsten Tag ausgezählt und mit dem Ergebnis der Kontrolligationen verglichen. Die Transformationseffizienz lag bei etwa 600-1000 Kolonien/ng *supercoiled* pBLCAT5.

5.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA mit der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977; Chen und Seeburg, 1985)

10 µl (ca. 4 µg) Minipräp-DNA (siehe 5.1.2) wurden in 100 µl 1 x TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 1.5 µl RNase A (10 mg/ml, hitzebehandelt) 15 min bei RT inkubiert, mit 250 µl Wasser und 40 µl 3 M Na-Acetat pH 4.8 verdünnt, durch Ausschütteln mit je 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol gereinigt und mit 1 ml Ethanol präzipitiert.

Die getrocknete Minipräp-DNA oder 3 µg säulenpräparierte Plasmid-DNA (siehe 5.1.3) wurden mit 40 µl 0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA denaturiert (5 min bei RT), mit 4 µl 2 M Ammoniumacetat neutralisiert, mit 100 µl Ethanol präzipitiert (15 min bei -20 °C), abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 6 µl Wasser gelöst, mit 3.25 µl 5 x Sequenzierpuffer¹¹ und 1 µl Primer (1 pmol/µl, siehe 4.6.1) gemischt, 3 min auf 65 °C erwärmt und im Wasserbad langsam auf RT abgekühlt. Indessen wurden 4 *Eppendorf*-Reaktionsgefäße (für die "G"-, die "A"-, die "T"- und die "C"-Reaktion) mit jeweils 2.5 µl der ddGTP-, ddATP-, ddTTP- oder ddCTP-Terminationsmischung (siehe Tab. 18) auf Eis vorbereitet.

Tab. 18: Zusammensetzung der Terminationsmischungen

	G	A	T	C
dGTP (µM)	80	80	80	80
dATP (µM)	80	80	80	80
dTTP (µM)	80	80	80	80
dCTP (µM)	80	80	80	80
ddGTP (µM)	8	-	-	-
ddATP (µM)	-	8	-	-
ddTTP (µM)	-	-	8	-
ddCTP (µM)	-	-	-	8

in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl

Zur abgekühlten Reaktion wurden 1 µl 0.1 M DTT, 1 µl [³⁵S]dATPαS, 2 µl 1 x LM¹² und 2 µl T7 DNA Polymerase (1.5 U/µl) pipettiert. Während die Reaktion 5 min bei RT inkubierte, wurden die Terminationsmischungen bei 37 °C erwärmt. Je 3.5 µl aus der Reaktion wurden im zeitlichen Abstand von 30 s zu den Terminationsmischungen gegeben und weitere 5 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Sequenzierungsreaktion mit 4 µl Formamid-Ladepuffer (80 Vol.% Formamid, 1 mM

¹¹ 175 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM EDTA pH 8.0.

¹² 5 x LM: 7.5 µM dGTP, 7.5 µM dTTP, 7.5 µM dCTP in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA.

EDTA, 0.02% Bromphenolblau, 0.02% Xylencyanol) abgestoppt wurde. Nach dem Kochen der Proben (2 min bei 95 °C) und Abschrecken auf Eis wurden die Proben in einem 8%-igen Sequenziergel (siehe 4.5.3) aufgetrennt.

Zur vollständigen Überprüfung der Sequenz wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte sowohl als "Minipräp"-DNA, als auch in der Form von "Großpräp"-DNA sequenziert. Von der letztgenannten Plasmidpräparation wurde mit dem puc/M13-Primer (siehe 4.6.1) der Sinnstrang (*coding strand*) und mit dem reversen CAT-Primer (siehe 4.6.1.) der Gegenstrang (*antisense strand*) sequenziert. Klone, die zufällige und nicht gewünschte Mutationen enthielten, wurden verworfen.

5.7 Analyse von mRNA

5.7.1 Ribonukleaseschutz-Nachweis (sog. *RNase protection assay*; Melton et al., 1984; Gilman et al., 1987)

10-50 µg Gesamt-RNA (siehe 5.1.4) wurden im Evaporator eingetrocknet, 2 h lang bei RT in 29 µl Formamid-Hybridisierungspuffer (80 Vol.% umkristallisiertes Formamid, 40 mM PIPES pH 6.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) gelöst und mit 1 µl (250.000-500.000 cpm) der Riboprobe (siehe 5.3.6) gemischt. Die Hybridisierungsreaktion wurde 5 min lang auf 85 °C erhitzt und für 10 - 16 h bei 45 °C inkubiert. Danach wurden die Hybride 45 - 60 min lang bei 30 °C mit 350 µl RNase-Mix (300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.5 und 230 Einheiten RNaseT1) verdaut. Die Verdaureaktion wurde mit 7.5 µl 20% SDS gestoppt, mit 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) behandelt (15 min bei 37 °C) und durch Ausschütteln mit je 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol gereinigt. Nach der Zugabe von 1 µg Hefe-tRNA wurden die Nukleinsäuren mit 1 ml Ethanol gefällt (15 min bei -20 °C), sedimentiert (15 min, 13.000 upm, 4 °C) und mit 70% Ethanol gewaschen. Die Proben wurden im Evaporator getrocknet, in 3 µl Formamid-Ladepuffer (siehe 5.7) gelöst und in einem 8%-igen Sequenziergel (siehe 4.6.3) aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 2000 cpm endmarkierter puc9/*Hae3*-Marker verwendet (siehe 5.3.4). Das getrocknete Gel wurde im allgemeinen über Nacht (ca. 14 h) bei -80 °C unter Verwendung einer Verstärkerfolie autoradiographiert.

5.7.2 Übertragung von größengetrennter mRNA auf eine Membran (*Northern blot*) u. Nachweis der spezifischen mRNA mit einer DNA-Probe (Denhardt, 1966; Alwine et al., 1977)

10 µg Gesamt-mRNA wurden im Evaporator eingetrocknet, sorgfältig in 20 µl Denaturierungspuffer (1 ml: 50 µl 20 x PB¹³, 195 µl 30 Vol.% deionisiertes Glyoxal, 500 µl DMSO, 255 µl Wasser) gelöst, bei 55 °C 10 min lang denaturiert, auf Eis abgeschreckt, mit 4 µl Ladepuffer (5 ml Glycerin, 3.27 ml Wasser, 0.43 ml 20 x PB, einige Kristalle Bromphenolblau) versetzt und in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.5.2). Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min lang mit 500 ml 1 x PB + 500 µl Acridinorange (30 mg/ml) gefärbt, 3 Mal 15 min lang mit 500 ml 1 x PB entfärbt und im UV-Durchlicht photographiert.

Anschließend wurde die RNA auf eine *Hybond-N*⁺-Nylonmembran übertragen (14-stündiger Kapillarblot mit 20 x SSC¹⁴-Transferpuffer) und fixiert (35 s UV-Bestrahlung im *Stratalinker 2400* (volle Leistung), danach 2 h bei 80 °C). Die Membran wurde 1 h lang im 60 °C-Schüttelwasserbad in 200 ml Vorhybridisierungslösung (40 ml 20 x SSC, 2 ml 100 x Denhardts' Lösung¹⁵, 6.6 ml PiPPi¹⁶, 1 ml 20% SDS, 150 ml Wasser) gebadet; dann wurden 20 µg/ml sd DNA zugegeben und die Vorbehandlung für 1 weitere Stunde fortgesetzt. Währenddessen wurde die DNA-Probe radioaktiv markiert (siehe 5.3.7) und 5 ml Hybridisierungsmix hergestellt; 40 ng/ml Probe +

¹³ 1 L 20 x PB pH 6.85 (0.2 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄): 27.6 g NaH₂PO₄ x H₂O, 35.6 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O.

¹⁴ 1 L 20 x SSC: 174 g NaCl (3 M.f.c.), 88.2 g Na₃-Citrat x 2 H₂O (0.3 M.f.c.). Die Lösung wurde filtriert.

¹⁵ 100 x Denhardts' Lösung (Denhardt, 1966): 2 Gew.% BSA, 2 Gew.% Ficoll und 2 Gew.% PVP. Gelagert bei -80 °C.

¹⁶ 1 L PiPPi pH 7.3: 27.6 g NaH₂PO₄ x H₂O, 53.4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 15 g Na-Pyrophosphat.

20 µg/ml sd DNA wurden 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und mit 4 x SSC, 10 mM EDTA, 0.1% SDS gemischt. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und mit der Hybridisierungs-Lösung 14 h lang im 65 °C-Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran je 30 min lang bei 65 °C mit den folgenden Lösungen gewaschen: einmal mit 200 ml Lösung A (20 ml 20 x SSC, 6.6 ml PiPPi, 1 ml 20 % SDS, 172.4 ml Wasser), zweimal mit je 200 ml Lösung B (20 ml 20 x SSC, 13.2 ml PiPPi, 2 ml 20 % SDS und 364.8 ml Wasser) und einmal mit 200 ml Lösung C (5 ml 20 x SSC, 6.6 ml PiPPi, 1 ml 20% SDS und 187.4 ml Wasser). Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht autoradiographiert.

Vor der Hybridisierung mit einer anderen Probe wurde die Membran 15 min lang in 0.1 x SSC, 0.1% SDS gekocht und die Vorhybridisierung wiederholt.

5.8 Protein-Nachweismethoden

5.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al. (1951)

Parallel zur Proteinbestimmung der Proben wurden Eichkurvenwerte mit Serumalbumin (BSA) angelegt (siehe Tab. 19). 5 µl Probe (Proteinlösung in Puffer X) wurde mit 145 µl Lowry-I (2% Na₂CO₃, 0.1 N NaOH) gemischt. Zu den Proben und den Standardwerten wurde 250 µl Lowry-IV (0.02% Na-K-Tartrat und 0.01% CuSO₄ in Lowry-I) pipettiert. Nach 5 min wurden 30 µl 50%-iges Folin-Ciocalteus-Reagenz (mit Wasser verdünnt) zugegeben, die Reaktionen gut gemischt und 10 min lang bei 37 °C inkubiert. 100 µl der Proben bzw. der Standardwerte wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und die OD der Farbreaktion bestimmt (660 nm-Filter, *Multiskan PLUS MK II*). Die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

Tab. 19: Pipettierschema für die Lowry-Standardwerte

0	5	10	20	30	40	µg Protein
5	5	5	5	5	5	µl Puffer X
145	140	135	125	115	105	µl Lowry-I
0	5	10	20	30	40	µl BSA (1 mg/ml in Lowry-I)

5.8.2 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität (Gorman et al., 1982)

Mit CAT-Expressionskonstrukten transfizierte HeLa tk⁻ Zellen wurden aufgebrochen, die Gesamtproteinfraktion präpariert (siehe 5.2.1) und die Proteinkonzentration gemessen (siehe 5.2.4). Die spezifische Enzymaktivität wurde bestimmt, indem 20 bis 200 µg Gesamtprotein in 80 µl 250 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 µl D-Threo-(dichloroacetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (2 µl ¹⁴C-CA = 7400 pmol) als Substrat und 20 µl 4 mM Acetyl-Coenzym A als Acetylgruppen-Donor 2 h lang bei 37 °C inkubiert wurden. Danach wurde das nicht-umgesetzte Substrat und die acetylierten Produkte durch 1 min Ausschütteln mit 1 ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert. Zur Phasentrennung wurde 5 min mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde die organische, obere Phase in ein neues 1.5ml-Reaktionsgefäß überführt, im Evaporator eingetrocknet, in 18 µl Ethylacetat aufgenommen und punktförmig auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 45 min in Chloroform/Methanol (9:1). Anschließend wurde die DC-Platte getrocknet und 24 bis 72 h autoradiographiert bzw. 45 min lang eine Platte des PhosphoImager-Auswertungsgerätes exponiert.

Die acetylierten Formen des Chloramphenicols (CA) und das nicht-acetylierte Substrat wurden aus der DC-Platte ausgeschnitten und in separaten Scintillationsröhrchen mit 5 ml Quickscent (*Packard*)

überschichtet. Im Scintillationszähler wurde die Radioaktivität (cpm, *counts per minute*) der Proben gemessen. Die spezifische CAT-Aktivität des Proteinextrakts (*pmol acetyliertes Chloramphenicol pro µg Protein und Stunde*) wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{pmol eingesetztes } ^{14}\text{C-CA} \times \text{cpm acetyliertes } ^{14}\text{C-CA}}{\text{Stunden Reaktionszeit} \times \mu\text{g Proteinextrakt} \times \text{cpm eingesetztes } ^{14}\text{C-CA}}$$

5.8.3 Nachweis von DNA-bindenden Proteinen durch Gelretardationsanalyse (sog. *Bandshift*)

Die *Bandshift*-Reaktionen enthielten: 5 µg Kernprotein, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 5% Glycerol, 84 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 µg poly[dIdC], 0 - 3 pmol Kompetitor-DNA und 10 fmol ³²P-Oligonukleotid. Der Versuch wurde so durchgeführt, daß in 7 µl Reaktionsvolumen 1 µl 10 × BP10¹⁷, 0.5 µl poly[dIdC] (2 µg/µl), und 0 - 3 µl Kompetitor-DNA (1 pmol/µl) auf Eis gemischt wurden. Dazu wurden 2 µl Kernextrakt (2.5 µg/µl in Dignam C) gegeben, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl ³²P-Oligonukleotid (10 fmol/µl; ca. 10.000 cpm/µl) wurde die Reaktion für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 9 µl der Reaktion in einem 4%-igen, nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

5.8.4 Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose (sog. *Western blot*)

Die Proteine wurden in 1 × Laemmli Proben-Puffer¹⁸ 5 min bei 95 °C denaturiert und in einem SDS-10% PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (16 h mit 140 V in 1 × Laemmli-Laufpuffer, siehe 4.5.5). Als Größenmarker wurden 25 µl Proteinstandardmarker für SDS PAGE (*Sigma, SDS-7B*) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde der gewünschte Gelbereich ausgeschnitten und die Proteine auf PVDF-Membran (*Amersham Immobilon-P Transfer Membrane*, Porengröße = 0.45 µm) oder Nitrozellulose-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde vorher 30 s in Methanol hydrophilisiert und anschließend 10 min gewässert. Die Nitrozellulose wurde mit 1 × Western Blot Puffer äquilibriert. In einer Wanne voll Blotpuffer wurde die Transfereinheit wie folgt zusammengebaut: Kathodenplatte des Blothalters, Schwamm, 2 Stk. 3 MM Papier, Gel, PVDF-Membran, 2 Stk. 3 mm Papier, Schwamm, Anodenplatte des Blothalters. Die Transferelektrophorese erfolgte 4 h lang mit 50 V und 500 mA bei 4 °C mit 1 × Western Blot Puffer¹⁹ in einer Vertikalkammer (Gel an der Kathodenseite, Membran zur Anode gerichtet) der *Fa. Biorad*.

5.8.5 Hybridisierung von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern gegen p42^{MAPK}

Nach der SDS-Gelelektrophorese von 30 µg Gesamt-Zellextrakt (siehe 5.2.3) und dem Transfer der gelgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde die Membran 1 h lang bei 37 °C in PBS, 5% Magermilchpulver geschwenkt (Absättigung unspezifischer Bindestellen mit Lactalbumin) und in Folie eingeschweißt. Zur eingeschweißten Membran wurden 5 ml ERK2-Antikörper (1:7500 verdünnt in PBS, 0.3% Tween 20, 5% Magermilchpulver) pipettiert und die Membran 1 h bei RT geschwenkt. Nach der Antikörperbindung wurde die Membran 3 mal 5 min lang mit PBS,

¹⁷ 10 × BP10 für eine 10 µl-bandshift-Reaktion mit undialysiertem Dignam C-Kernextrakt: 60 mM HEPES pH 7.5, 20 mM MgCl₂ × 6 H₂O, 10 mM EDTA, 10 mM DTT und 5 mM PMSF (in 20 µl -Aliquots bei -20 °C gelagert).

¹⁸ 10 ml 5 × Laemmli Proben-Puffer: 2 ml 2 M Tris-HCl pH 6.8 (0.4 M f.c.), 1 g SDS (10% f.c.), 5.7 ml 87% Glycerol (50% f.c.), 1 ml β-Mercaptoethanol (10% f.c.), 0.02 g Bromphenolblau (0.2% f.c.).

¹⁹ 5 L 10 × Western Blot Puffer "LMW": 145 g Tris-Base (25 mM f.c.), 725 g Glycin (250 mM f.c.), 10 g SDS (0.1% f.c.). 5 L 1 × Western Blot Puffer "LMW": 500 ml 10 × Puffer, 1 L Methanol, 3.5 L Wasser.

0.3% Tween 20 gewaschen, bevor die Membran 1 h lang mit 5 ml Meerrettichperoxidase-markierter Antikörper gegen Kaninchenproteine (*Amersham*, nach Herstellerangabe mit PBS, 0.3% Tween 20, 5% Magermilchpulver verdünnt) bei RT inkubiert wurde. Erneut wurde die Membran 3-malig mit PBS, 0.3% Tween 20 gewaschen. Dann wurde die Membran mit 3 ml ECL Western Blot Nachweisreagenz (*Amersham*, RPN 2106) beschichtet und in Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde Hyperfilm-ECL (*Amersham*) 10 s bis 10 min lang belichtet.

5.8.6 Immunpräzipitation von metabolisch markierten Proteinen

Die *Kopplung der Antikörper an ProteinA-Sepharose* erfolgte im Batch-Verfahren: Pro Zellextrakt und Antikörper bzw. Präimmunsereum (PIS; Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen) wurden 20 µl ProteinA-Sepharose (50%-ige Suspension in PBS) verwendet, die zunächst 2 x mit RIPA gewaschen, 15 s mit 12.000 upm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und dann mit RIPA+ auf 600 µl Volumen eingestellt wurden. Zur Abnahme der Überstände wurde hierbei und bei allen weiteren Zentrifugationsschritten eine 1ml-Spritze mit 23G-Kanüle ($\varnothing = 0.6$ mm) verwendet. Die ProteinA-Sepharose wurde geteilt: Zu einem Teil wurden pro Zellextrakt 4 µl FosX-Antikörper gegeben, zum anderen Teil pro Zellextrakt 3 µl c-Jun/AP-1-Antikörper und die dritte Teilmenge wurde mit 3 µl PIS pro Zellextrakt versetzt. Die Kopplung erfolgte für 1 h bei 4 °C auf dem Rotationsmischer. Anschließend wurde die ProteinA-Sepharose- 2 min bei 12.000 upm zentrifugiert, 4 x mit je 1 ml RIPA gewaschen, mit RIPA+ auf eine 50%-ige Suspension eingestellt und auf Eppendorf-Probenröhrchen verteilt.

Immunpräzipitation: Die radioaktiven RIPA-Zellextrakte (siehe 5.2.4) wurden 2 - 4 h lang bei 4° C auf dem Rotationsmischer mit der PIS-behandelten ProteinA-Sepharose inkubiert. Danach wurde die ProteinA-Sepharose durch 2 min Zentrifugation mit 12.000 upm sedimentiert und das Sediment wie unten beschrieben verarbeitet. Dieser Schritt dient bei der späteren Auftrennung der Immunpräzipitate als Kontrolle für die Spezifität der Antikörperbindung. Mit dem Überstand und den ProteinA-Sepharose-gebundenen FosX-Antikörpern wurde die spezifische Immunpräzipitation durchgeführt. Nach dem erneuten Abzentrifugieren der ProteinA-Sepharose wurde der Überstand mit den ProteinA-Sepharose/c-Jun-Antikörpern einer zweiten Immunpräzipitation unterzogen.

Die ProteinA-Sepharose-gebundenen Antikörper-Proteinkomplexe wurden 4 x mit je 1 ml eiskaltem RIPA und nachfolgend 1 x mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer 27G Kanüle ($\varnothing = 0.4$ mm) restlos abgezogen, das Sediment in 20 µl SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, 5 min gekocht und auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3 h bei 80 V, dann über Nacht bei 120 V).

5.8.7 Peptidanalyse (Hunter u. Sefton, 1980; Scheidtmann et al., 1982; Boyle et al., 1991 b)

Hela tk⁻ Zellen wurden mit ³²P-Orthophosphat *in vivo* markiert, lysiert, c-Jun aus dem Zellysat mit ProteinA-Sepharose-gekoppeltem c-Jun-Antikörper immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE separiert und auf Nitrozellulose-Membran übertragen (vgl. 5.8.2). Die Membran wurde autoradiographiert, wobei die Lage der Membran auf dem Röntgenfilm genau markiert wurde. Aus der Membran wurde die spezifische Proteinbande ausgeschnitten und im Eppendorf-Reaktionsgefäß 30 min lang bei 37° C mit 200 µl 0.5% PVP-360 / 100 mM Essigsäure inkubiert. Danach wurde das Nitrozellulose-Stück zur Neutralisation in Wasser und in frisch angesetzter 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung kurz geschwenkt und in ein neues Reaktionsgefäß mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ überführt.

Die spezifische Spaltung der Proteine in Peptide erfolgte mit 5 µl 1 µg/µl Trypsin (*Serva*) für 5 h bei 37° C und mit weiteren 5 µg Trypsin über Nacht. Dabei gingen die Spaltstücke in Lösung und konnten in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Membran wurde mit 1 ml Wasser gewaschen, die Waschlösung mit der Peptidlösung vereinigt und im Vakuum-Rotationsverdampfer eingetrocknet. Die Peptide wurden in 1 ml Wasser gelöst und abermals eingetrocknet. Das

Lösen/Lyophilisieren wurde noch zweimal wiederholt, um das Ammoniumhydrogencarbonat vollständig aus der Lösung zu entfernen.

Nachdem kein weißes Sediment mehr erkennbar war, wurden die Peptide mit Perameisensäure oxidiert. Ohne die vollständige Überführung der Cysteine in Cysteinsäuren liegen die SH-Gruppen der Cysteine in unterschiedlichen Oxidationsstufen vor, was ein uneinheitliches Laufverhalten bei der elektrophoretischen Auftrennung bewirken würde. Perameisensäure wurde hergestellt, indem 900 µl 100% CHOOH p.a. mit 100 µl 30% H₂O₂ gemischt und 1 h bei RT inkubiert wurden. 50 µl eiskalte Perameisensäure wurde zu dem kaltgestellten Peptidlyophilisat gegeben und nach kurzem Vortexen 1 h lang bei 0 °C inkubiert. Die Oxidationsreaktion wurde mit 1 ml eiskaltem Bidest gestoppt, gemischt, im Trockeneis/Ethanolbad eingefroren und erneut lyophilisiert. Dann wurden die Peptide in 500 µl Elektrophoresepuffer pH 1.9²⁰ gelöst, 10 min bei 14.000 upm zentrifugiert um unlösliche Verunreinigungen zu sedimentieren und die Überstände in einem neuen Reaktionsgefäß eingetrocknet.

Zur Elektrophorese wurden die Peptide in 6 µl Elektrophoresepuffer pH 1.9 aufgenommen. 1 µl wurde in 3 ml Scintillationsflüssigkeit im Scintillationszähler ausgezählt. 800 cpm wurden punktförmig auf eine *Schleicher & Schuell* TLC-Platte 3 cm vom unteren Rand entfernt in die Mitte der Platte aufgetragen. Um den Verlauf der Elektrophorese beobachten zu können wurden 2 µl einer Färbelösung (1 mg/ml Xylencyanol, 5 mg/ml N-Dinitrophenyllysin) 3 cm vom oberen Rand entfernt in die Mitte aufgebracht. Die zellulosebeschichtete Platte wurde mit Elektrophoresepuffergetränktem 3MM Filterpapier befeuchtet, aus dem an der Stelle der Auftragspunkte Löcher ($\varnothing = 1$ cm) ausgeschnitten waren, um die Proben zusätzlich zu konzentrieren. Die Elektrophorese erfolgte in einer Apparatur der Firma Camay gemäß der Herstelleranleitung für 25 min bei einer konstanten Spannung von 1000 V in Elektrophoresepuffer pH 1.9. Anschließend wurde die TLC-Platte waagrecht getrocknet und senkrecht zur Elektrophoreserichtung in eine Chromatographiekammer gestellt. Die chromatographische Auftrennung in der zweiten Dimension wurde in 37.5% Butanol, 25% Pyridin, 7.5% Essigsäure und 30% Wasser solange durchgeführt, bis die Laufmittelfront $\frac{3}{4}$ der Platte zurückgelegt hatte. Die trockene Platte wurde 4 Wochen bei -80° C mit einer Verstärkerfolie autoradiographiert.

5.8.8 Nachweis von c-Jun N-terminalen Proteinkinasen (JNK, Hibi et al., 1993)

Mit den zu untersuchenden Agentien behandelte HeLa tk⁻ Zellen wurden auf Eis gestellt und 3 Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 700 µl Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 30 mM Na-Pyrophosphat, 100 µM Na-Vanadat, 2 mM Jodessigsäure, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 µM ZnCl₂, 1 % Triton X-100) aufgeschlossen, in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß überführt und 60 s lang heftig geschüttelt. Der Zellextrakt wurde 30 min bei 4 °C in einer *Eppendorf*-Zentrifuge bei 14.000 upm zentrifugiert und der Überstand für den JNK-Nachweis verwendet. GST-c-Jun (Aminosäuren 1-166) wurde, wie in Smith und Johnson (1988) beschrieben, hergestellt.

Die Zellextrakte wurden mit GST-c-Jun-Fusionsproteinen (50 µg/Ansatz) 3 h lang bei 4 °C inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit HBIB (20 mM HEPES pH 7.0, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100) wurden die GST-c-Jun-gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und in einem 12.5 % SDS-Polyacrylamidgel, das ohne oder mit beigegebenen GST-c-Jun-Fusionsproteinen (140 mg/ml) polymerisierte, aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zweimal 10 min lang in Puffer W (50 mM HEPES pH 7.4, 5 mM 2-Mercaptoethanol) mit 2% Propanol gewaschen, dann in Puffer W ohne Alkohol äquilibriert (2 x 30 min) und 3 Mal für jeweils 30 min in Puffer W mit 6 M Guanidin-HCl inkubiert. Zur Renaturierung der Proteine wurde das Gel mehrere Mal in Puffer W mit 0.04 % Tween 20 bei 4 °C inkubiert (zusammen etwa 16 h). Nach der Äquilibration des Gels in Puffer K (25 mM HEPES pH 7.4, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂, 90 µM Na₃VO₄; 30 min bei 30 °C) wurde die Kinase-Reaktion in 20 ml Puffer K mit 9 µCi/ml [γ -³²P] ATP durchgeführt. Letztmals wurde das Gel

²⁰ 1 L Elektrophoresepuffer pH 1.9 enthält 55 ml Ameisensäure, 12.5 ml Essigsäure und 2.5 ml Pyridin.

mehrere Mal sorgfältig bei 25 °C mit 5 % Trichloressigsäure und 10 mM Na-Pyrophosphat gewaschen (zusammen etwa 24 h), getrocknet und autoradiographiert.

5.9 Statistische Auswertung

Der verwendete Taschenrechner HP-11C (*Hewlett-Packard*) errechnete den Mittelwert \bar{x} (das arithmetische Mittel) mit der Formel:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Die zur Berechnung der Standardabweichung s benutzte Formel lautet:

$$s_x = \frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}$$

A. Abkürzungen und fremdsprachige Begriffe

°C	Grad Celsius
µl	mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
µM	mikromolar (10 ⁻⁶ Molar)
10 x	zehnfach konzentrierte Lösung
2 x HBS	283 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.05 (2 x konzentriert)
9-mer	Oligonukleotid mit 9 Monomeren
A ₂₆₀	Absorption der Lösung bei 260 nm
Abb.	Abbildung
<i>annealing</i>	Hybridisierung eines Primers an einzelsträngige DNA (engl.)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bandshift</i>	durch Proteinbindung veränderte Mobilität des DNA-Moleküls (engl.)
<i>blot</i>	Übertragung von gelgetrennten Nukleinsäuren oder Proteinen auf eine Membran
bp	Basenpaar
Bq	Bequerel (Aktivität pro sec.; 1 Bq = 2.7 x 10 ⁻¹¹ Ci)
BSA	Albumin aus Rinderserum (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
c	zellulär
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie (Aktivität pro sec.; 1 Ci = 3.7 x 10 ¹⁰ Bq)
<i>coding strand</i>	der transkribierte, obere DNA-Einzelstrang (engl.)
Col.	Kollagenase
COOH-	Carboxygruppe
cpm	<i>counts per minute</i> (engl.)
CTP	Cytidintriphosphat
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
distal	weiter von der Mitte entfernt liegend
DMEM	Zellkulturmedium nach Dulbecco und Eagle (<i>Dulbeccos' modified Eagle medium</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease (Desoxyribonukleinsäure-spaltendes Enzym)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminomethylether)-N,N-tetraacetat
engl.	englisch
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
f.c.	Endkonzentration (engl. <i>final concentration</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
<i>filling-in</i>	Auffüllen von kohäsiven DNA-Enden mit Nukleotiden
FLP	80% Formamid, 1 mM EDTA, 0.04% Bromphenolblau/Xylenxyanol
fmol	femtomol (10 ⁻¹⁵ M)
<i>footprint</i>	Nachweis eines DNA-bindenden Proteins
FPLC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>fast performance liquid chromatography</i>)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9.18 m/sec. ²)
GBq	Gigabequerel (10 ⁹)
Gew. %	Gewichtsprozent
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde (lat. <i>hora</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	menschliches Immunschwäche Virus (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
Hrsg.	Herausgeber
hsp	Hitzeschock-Protein
hu	menschlich (engl. <i>human</i>)
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas untersucht
<i>in vivo</i>	an der lebenden Zelle, Organ oder Organismus beobachtet
inkl.	inklusiv
J	Joule
kb	Kilobasen (1 kb = 1000 bp)
kDa	kilo Dalton (10^3 Dalton)
L	Liter
<i>labeling</i>	Markierung von Nukleinsäuren und Proteinen
LB	10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 1 g/L Glucose
LMPCR	ligationsvermittelte Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>ligation mediated PCR</i>)
LMW	niedriges Molgewicht (engl. <i>low molecular weight</i>)
m	mutiert, Mutation
M	Molar
mA	Milliampère
MBq	Megabequerel (10^6 Bq)
MCS	DNA-Stück mit mehreren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	milliliter (10^{-3} L)
mM	millimolar (10^{-3} M)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaDOC	Natriumdeoxycholat
n	normals
ng	nanogramm (10^{-9} g)
NH ₂ -	Aminogruppe
nm	nanometer (10^{-9} m)
<i>northern blot</i>	Kapillartransfer von gelgetrennter RNA auf eine Membran
nt	Nukleotid
<i>nuclear run-on</i>	Methode zur Transkriptionsratenbestimmung eines Gens
ø	Durchmesser
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsstartstelle (engl. <i>origin of replication</i>)
p.a.	analyserein
PAAH	Polyacrylamid-Harnstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PB	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄
PBS	123 mM NaCl, 17 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.5 mM KH ₂ PO ₄
PEA3	an den Polyomaenhancer A bindendes Protein 3
pH	pH-Wert
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PiPpi	0.5 M NaH ₂ PO ₄ , 0.5 M Na ₂ HPO ₄ , 1.5 Gew.% Na-Pyrophosphat, pH 7.3
pmol	picomol (10^{-12} M)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>primer</i>	kurzes, ca. 6 bis 50 bp langes Oligonukleotid

proximal	dem zentralen Teil zu gelegen
PS	Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r	ribo
rabbit	Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease (Ribonukleinsäure-spaltendes Enzym)
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sd DNA	gescherte und denaturierte DNA aus Lachssperma (engl. <i>small denatured DNA</i>)
SOB ⁺	2% Bacto Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC	SOB ⁺ mit 20 mM Glucose
sog.	sogenannt
ss DNA	einzelsträngige DNA (engl. <i>single stranded DNA</i>)
SSC	3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0 (20 x)
STB	100 mM KCl, 45 mM MnCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 3 mM Hexamin-CoCl ₃ , 10 mM Ka-MES, 15% Glycerin
STE	100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS
<i>supercoiled</i>	geschlossen ringförmig (engl.)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TBE	90 mM Tris-Base, 90 mM Borat, 2.5 mM EDTA
TBq	Tera Bequerel (10 ¹² Bq)
TBS	25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl ₂ , 0.5 mM MgCl ₂ , 0.6 mM Na ₂ HPO ₄
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
tk	Thymidinkinase
TLC	Dünnschichtchromatographie (engl. <i>thin layer chromatography</i>)
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TTP	Thymidintriphosphat
U	Enzymeinheit (engl. <i>unit</i>)
u.	und
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolette Strahlung (190 - 320 nm)
v	viral
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
Vol.%	Volumenprozent
W	Watt
<i>western blot</i>	Elektrolytischer Transfer von gelgetrennten Proteinen auf eine Membran (engl.)
z.T	zum Teil

Abkürzungen, die im Text erläutert oder bei "Material, 4.3" beschrieben wurden, sind hier nicht aufgeführt.

B. Sequenzen

pBLCAT2

Hinweis: pBLCAT4 entstand aus pBLCAT2 durch Deletion der *Eco0109/Nde1*-Sequenz (C. Jonat, 1990).

M13mp18 MCS (<i>Hind3</i> , <i>Sph1</i> , <i>Pst1</i> , <i>Sall</i> , <i>Acc1</i> , <i>Hinc2</i> , <i>Xba1</i> , <i>BamH1</i>)	94	-	129
Herpes simplex tk Promotor (-105/+56)	132	-	302
CAT Reportergen (340 = ATG, 995 = TAA)	308	-	997
SV40 <i>small T</i> antigen-Region (Signale für die Polyadenylierung: AATAAA)	1084	-	1937
M13mp18 MCS (<i>Cla1</i> , <i>Sma1</i> , <i>Kpn1</i> , <i>Sst1</i> , <i>EcoR1</i>)	1935	-	1963
Reverse Sequenz von pEMBL8P	1964	-	131
β -Lactamase (amp^R) codierende Sequenz	3137	-	4125

```

1  CAGCTGGCGA AAGGGGGATG TGCTGCAAGG CGATTAAGTT GGGTAACGCC
   Pvu2
51  AGGGTTTTTC CAGTCACGAC GTTGTA AAC GACGGCCAGT GCCAAGCTTG
   Hind3
101 CATGCCTGCA GGTCGACTCT AGAGGATCCG GCCCGCCCA GCGTCTTGTC
151 ATTGGCGAAT TCGAACACGC AGATGCAGTC GGGGCGCCGG GGTCCGAGGT
   EcoR1
201 CCACTTCGCA TATTAAGGTG ACGCGTGTGG CCTCGAACAC CGAGCGACCC
251 TGCAGCGACC CGCTTAACAG CGTCAACAGC GTGCCG CAGA TCAGATCTCG
   Bgl2
301 AGGAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA TGGAGAAAA
   M E K K
351 AATCACTGGA TATAACCACG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
401 ATTTTGAGGC ATTTTCAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT
451 CAGCTGGATA TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA
   Pvu2
501 GTTTTATCCG GCCTTTATTC ACATTCTTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC
551 CGGAATTCCG TATGGCAATG AAAGACGGTG AGCTGGTGAT ATGGGATAGT
   EcoR1
601 GTTCACCCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA CGTTTTTCATC
651 GCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTTCCG GCAGTTTCTA CACATATATT
701 CGCAAGATGT GGCGTGTTAC GGTGAAAACC TGCCTATTTT CCTAAAGGGT
751 TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT GAGTTTCACC
801 AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCC CCCC GTTTTC
851 ACCATGGGCA AATATTATAC GCAAGGCGAC AAGGTGCTGA TGCCGCTGGC
   Nco1
901 GATTCAGGTT CATCATGCCG TCTGTGATGG CTTCCATGTC GGCAGAATGC
951 TTAATGAATT ACAACAGTAC TCGGATGAGT GGCAGGGCGG GGC GTAATTT
   Stop
1001 TTTTAAGGCA GTTATTGGTG CCCTTAAACG CCTGGTGCTA CGCCTGAATA

```


1051 AGTGATAATA AGCGGATGAA TGGCAGAAAT TCGCCGGATC TTTGTGAAGG
1101 AACCTTACTT CTGTGGTGTG ACATAATGTG ACAAACCTACC TACAGAGATT
1151 TAAAGCTCTA AGGTAAATAT AAAATTTTTA AGTGTATAAT GTGTTAAACT
1201 ACTGATTCTA ATTGTTTGTG TATTTTAGAT TCCAACCTAT GGAACCTGATG
1251 AATGGGAGCA GTGGTGGAAAT GCCTTTAATG AGGAAAACCT GTTTTGCTCA
1301 GAAGAAATGC CATCTAGTGA TGATGAGGCT ACTGCTGACT CTCAACATTC
1351 TACTCCTCCA AAAAGAAGA GAAAGGTAGA AGACCCAAG GACTTTCCTT
1401 CAGAATTGCT AAGTTTTTTG AGTCATGCTG TGTTAGTAA TAGAACTCTT
1451 GCTTGCTTTG CTATTTACAC CACAAAGGAA AAAGCTGCAC TGCTATACAA
1501 GAAAATTATG GAAAAATATT CTGTAACCTT TATAAGTAGG CATAACAGTT
1551 ATAATCATAA CATACTGTTT TTTCTTACTC CACACAGGCA TAGAGTGTCT
1601 GCTATTAATA ACTATGCTCA AAAATTGTGT ACCTTTAGCT TTTTAATTTG
1651 TAAAGGGGTT AATAAGGAAT ATTTGATGTA TAGTGCCTTG ACTAGAGATC
1701 ATAATCAGCC ATACCACATT TGTAGAGGTT TTACTIONGCTT TAAAAACCT
1751 CCCACACCTC CCCCTGAACC TGAAACATAA AATGAATGCA ATTGTTGTTG
1801 TTACTIONGTT TATTGCAGCT TATAATGGTT ACAAATAAAG CAATAGCATC
polyA
1851 ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTTCA CTGCATTCTA GTTGTGGTTT
polyA
1901 GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGGATCGAT CCCC GGGTAC
Clal
1951 CGAGCTCGAA TTCGTAATCA TGGTCATAGC TGTTTCCTGT GTGAAATTGT
2001 TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTA
2051 AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT
2101 CACTGCCCCG TTTCCAGTCG GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA
2151 ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGGC GCTCTTCCGC
2201 TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG
2251 TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
2301 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG
2351 TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG
2401 AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA
2451 CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC

2501 TGTTCGGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG
2551 GAAGCGTGGC GCTTTCATCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
2601 TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC
2651 CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA
2701 GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA
2751 GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
2801 CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG
2851 TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
2901 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA
2951 AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC
3001 AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA
3051 AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
3101 CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTGGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA
3151 GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC
3201 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG
3251 CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT
3301 TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT
3351 GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG
3401 AGTAAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA
3451 CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
3501 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA
3551 AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG
3601 CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC
3651 ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
Sca1
3701 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA
3751 TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GTCATCATT
3801 GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG
Xmn1
3851 ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT
3901 TTACTIONTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAAATGCC

3951 GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGAATAC TCATACTCTT
 4001 CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
 4051 GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
 4101 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT
 4151 GACATTAACC TATAAAAATA GCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTCGCGC
Eco109
 4201 GTTTCGGTGA TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG
 TRE-ähnliche Sequenz
 4251 GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG
 4301 CGCGTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CTGGCTTAAC TATGCGGCAT
 4351 CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TCGGGTGTGA AATACCGCAC
Nde1
 4401 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCCATTTCG CATTTCAGGCT
 4451 GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGCTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGC 4499

Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstellen (bp)	Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstellen (bp)
AatII	G_ACGTC	4129	FspI	TGC'GCA	3429, 4452,
AccI	GTmk_AC	113	GdiII	y'GGCC_G	83, 2153, 3595,
AflIII	A'CryG_T	221, 2314	HasI	wG'CCw	230, 819, 2329,
Alw44I	G'TGCA_C	2628, 3874, 4371			2340, 2792
AlwNI	CAG_nnn'CTG	2730	HasII	r_GCGC'y	187, 2192, 2562, 4433
ApaBI	GCA_nnnn'TGC	4380	HgiAI	G_wGCw'C	1956, 2632, 3793,
AseI	ATTA_AT	1605, 2085, 2144, 3379			3878, 4375
AvaI	C'yCGr_G	297, 1942	HgiEII	ACCnnnnnGGT	2900, 4380
AvaII	G'GwC_C	191, 198, 3345, 3567	HinII	GTy'rAC	114, 274, 1802,
BamHI	G'GATC_C	124	HindIII	A'AGCT_T	94,
BanII	G_rGCy'C	1956	HpaI	GTT'AAc	1802
BbsI	GAAGACnn'nnnn_	1386	KpnI	G_GTAC'C	1950
BccI	CCATC	928, 1311, 3244,	MluI	A'CGCG_T	221
		3368, 3655	MmeI	TCCrAC(n)18_nn'	1256, 2529, 2713,
Bce83I	CTTGAG(n)14_nn'	2405, 2703, 2944, 3812	MscI	TGG'CCA	819,
BceII	ACGGC(n)12_n'	98, 479, 903, 2816	MslI	CAynn'nrrTG	170, 3459, 3618, 3977,
BcgI	CGA(n)6TGC(n)14_nn'	3712, 3746	MunI	CAATT_G	1789,
BglI	GCCn_nnn'nGGC	3327, 4445	NarI	GG'CG_CC	184, 4430
BglII	A'GATC_T	293	NcoI	C'CATG_G	852, 852
BpmI	CTGGAG(n)14_nn'	675, 3277	NdeI	CATA_TG	4378, 4378
Bpu10I	CC'TnA_GC	326	NspI	r_CATG'y	104, 2318, 4235,
BsaI	GGTCTCn'nnnn_	3268	NspV	TT'CG_AA	161
BsaBI	GATnn'nnATC	1701	Pfl1108I	TCGTAG	3225,
BsaHI	Gr'CG_yC	184, 3744, 4126, 4430	PfIMI	CCAn_nnn'nTGG	784, 1238
BsaWI	w'CCGG_w	549, 2520, 2667, 3498	Psp1406I	AA'CG_TT	640, 3433, 3806,
BseRI	GAGGAG	302, 1355	PstI	C_TGCA'G	110, 254,
BsgI	GTGCAG(n)14_nn'	1470	PvuI	CG_AT'CG	3577, 4473,
BsiI	C'TCGT_G	2487, 3871, 4178	PvuII	CAG'CTG	3, 453, 2138,
BsiEI	CG_ry'CG	2230, 2654, 3577,	RleAI	CCCACA(n)9_nnn'	1768
		3726, 4473	SalI	G'TCGA_C	112
BsmI	GAATG_Cn'	546, 951, 1273,	SapI	GCTCTTCn'nnn_	2198,
		1790, 1883			
BsmAI	GTCTCn'nnnn_	776, 3268, 4044,			
		4197, 4239			
BspEI	T'CCGG_A	549			
BspHI	T'CATG_A	3034, 4042, 4147			
BspMI	ACCTGCnnnn'nnnn_	99, 737			
BsrBI	GAG'CGG	2006, 2247, 4048			
BsrDI	GCAATG_nn'	572, 3268, 3442			

BsrFI	r'CCGG_y	3287	ScaI	AGTACT	968, 3687,
Clal	ATCG_AT	1936	SmaI	CCC'GGG	1944,
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	2422, 4291	SphI	G_CATG'C	104,
DsaI	C'CryG_G	852	Sse8387I	CC_TGCA'GG	110
EaeI	y'GGCC_r	83, 817, 2153, 3595	SspI	AAT'ATT	863, 1517, 1670, 4011,
Eam1105I	GACnn_n'nnGTC	3207	SstI	G_AGCT'C	1956
EarI	CTCTTCn'nnn_	1361, 2198, 4002, 4490	StyI	C'CwwG_G	852, 1386
EciI	TCCGCC	2388, 2534, 3362	TaqII	CACCCA(n)9_nn'	776, 3893, 3910
Eco57I	CTGAAG(n)14_nn'	1383, 2862, 3874,	TfiI	G'AwT_C	901, 1204, 1228,
EcoO109I	rG'GnC_Cy	4183,	Tth111II	CAArCA(n)9_nn'	2149, 2289
EcoRI	G'AATT_C	157, 553, 1958,	XbaI	TCTAG_A	118,
Esp3I	CGTCTCn'nnn_	776, 4197, 4239	XhoI	C'TCGA_G	297
			XmnI	GAAnn'nnTTC	3806

pBLCAT5

Hinweis: pBLCAT5 entstand aus pBLCAT3 durch Deletion der *Eco0109/Nde1*-Sequenz (C. Jonat, 1990).

M13mp18 MCS (<i>Hind3, Sph1, Pst1, Sal1, Acc1, Hinc2, Xba1, BamHI</i>)	94	-	139
CAT Reporter gen (340 = ATG, 995 = TAA)	145	-	834
SV40 <i>small T antigen</i> -Region (Signale für die Polyadenylierung: AATAAA)	921	-	1774
M13mp18 MCS (<i>Clal, SmaI, Kpn1, Sst1, EcoRI</i>)	1772	-	1800
Reverse Sequenz von pEMBL8P	1801	-	93
β -Lactamase (amp^R) codierende Sequenz	2974	-	3962

```

1  CAGCTGGCGA AAGGGGGATG TGCTGCAAGG CGATTAAGTT GGGTAACGCC
   Pvu2
51  AGGGTTTTTCC CAGTCACGAC GTTGTA AAC GACGGCCAGT GCCAAGCTTG
   Hind3
101 CATGCCTGCA GGTCGACTCT AGAGGATCCA GATCTCGAGG AGCTTGGCGA
   Sph1 Pst1 Sal1 Xba1 BamHI Bgl2 Xho1
151 GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAAATGG AGAAAAAAT CACTGGATAT
   M E K K I T G Y
201 ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT TTGAGGCATT
251 TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA
   Pvu2
301 CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC
351 TTTATTCACA TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GTCATCCGG AATTCCGTAT
   EcoRI
401 GGCAATGAAA GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT
451 ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA
501 TACCACGACG AATTCCGGCA GTTCTACAC ATATATTCGC AAGATGTGGC
551 GTGTTACGGT GAAAACCTGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TTGAGAATAT
601 GTTTTTTCGTC TCAGCCAATC CCTGGGTGAG TTCACCAGT TTTGATTTAA
651 ACGTGGCCAA TATGGACAAC TTCTTCCCCC CGTTTTTACC ATGGGCAAAT
   NcoI

```

701 ATTATACGCA AGGCGACAAG GTGCTGATGC CGCTGGCGAT TCAGGTTTCAT
751 CATGCCGTCT GTGATGGCTT CCATGTCGGC AGAATGCTTA ATGAATTACA
801 ACAGTACTGC GATGAGTGGC AGGGCGGGGC GTAATTTTTT TAAGGCAGTT
851 ATTGGTGCCC TTAAACGCCT GGTGCTACGC CTGAATAAGT GATAATAAGC
901 GGATGAATGG CAGAAATTCG CCGGATCTTT GTGAAGGAAC CTTACTTCTG
951 TGGTGTGACA TAATGTGACA AACTACCTAC AGAGATTTAA AGCTCTAAGG
1001 TAAATATAAA ATTTTTAAGT GTATAATGTG TTAAACTACT GATTCTAATT
1051 GTTTGTGTAT TTTAGATTCC AACCTATGGA ACTGATGAAT GGGAGCAGTG
1101 GTGGAATGCC TTTAATGAGG AAAACCTGTT TTGCTCAGAA GAAATGCCAT
1151 CTAGTGATGA TGAGGCTACT GCTGACTCTC AACATTCTAC TCCTCCAAAA
1201 AAGAAGAGAA AGGTAGAAGA CCCCAAGGAC TTTCTTCAG AATTGCTAAG
1251 TTTTTTGAGT CATGCTGTGT TTAGTAATAG AACTCTTGCT TGCTTTGCTA
1301 TTTACACCAC AAAGGAAAAA GCTGCACTGC TATACAAGAA AATTATGGAA
1351 AAATATTCTG TAACCTTTAT AAGTAGGCAT AACAGTTATA ATCATAACAT
1401 ACTGTTTTTT CTTACTCCAC ACAGGCATAG AGTGTCTGCT ATTAATAACT
1451 ATGCTCAAAA ATTGTGTACC TTTAGCTTTT TAATTTGTAA AGGGGTAAAT
1501 AAGGAATATT TGATGTATAG TGCCTTGACT AGAGATCATA ATCAGCCATA
1551 CCACATTTGT AGAGGTTTAA CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC
1601 CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTGTGTA ACTTGTTTAT
1651 TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTCACAA
1701 ATAAAGCATT TTTTTCACTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC CAAACTCATC
1751 AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTC
Clal SmaI KpnI SstI EcoRI
1801 GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACAA
1851 TTCCACACAA CACACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC CTGGGGTGCC
1901 TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCCGCTTT
1951 CCAGTCGGGA AACCTGTTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACGCG
Pvu2
2001 CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT
2051 GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC
2101 AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA

2151 ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
Af13

2201 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA

2251 TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATAAC

2301 AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCCTG

2351 CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT

2401 TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCGT

2451 CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC

2501 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGTAAGAC ACGACTTATC

2551 GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG

2601 GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA

2651 AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA

2701 AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG

2751 GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA

2801 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA

2851 CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT

2901 AGATCCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT

2951 GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT

3001 CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCTG

3051 TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA

3101 ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA

3151 CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG

3201 CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCTG

3251 CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT

3301 GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT

3351 CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTAGCTCC

3401 TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT

3451 CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA

3501 GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG
Sca1

3551 TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCC GCGTCAATAC GGGATAATAC

3601 CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT
XmnI

3651 CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG

3701 TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG

3751 CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA

3801 TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT

3851 TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA

3901 ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA

3951 AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT

4001 AAAAATAGGC GTATCACGAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA

4051 AGGAGAAAAT ACCGCATCAG GCGCCATTCG CCATTCAGGC TGCGCAACTG

4101 TTGGGAAGGG CGATCGCTGC GGGCCTCTTC GCTATTACGC 4140

Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstellen (bp)	Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstellen (bp)
AatII	G ₁ ACGTC	3966	GdiII	y'GGCC_G	83, 1990, 3432
AccI	GTmk_AC	113	HaeII	r_GCGCy	2029, 2399, 4074
AflIII	A'CryG_T	2151	HgaI	GACGCnnnnn'nnnnn_	2262, 2840, 3570
Alw44I	GTGCA_C	2465, 3711	HgiEII	ACCnnnnnGGT	2737
AlwNI	CAG_nnn'CTG	2567	HincII	G'TyrAC	114, 1639
AvaI	C'yCGr_G	134, 1779	HindIII	A'AGCT_T	94
AvaII	G'GwC_C	3182, 3404	HpaI	GTTAAC	1639
BamHI	G'GATC_C	124	KpnI	G_GTACC	1787
BanII	G_rGCyC	1793	MmeI	TCCrAC(n)18_nn'	1093, 2366, 2550
BbsI	GAAGACnn'nnnn_	1223	MscI	TGG'CCA	656
BcgI	CGA(n)6TGC(n10)_nn'	3549, 3583	MslI	CAynn'nnrTG	3296, 3455, 3814
BglI	GCCn_nnn'nGGC	3164, 4086	MunI	C'AATT_G	1626
BglII	A'GATC_T	130	NarI	GG'CG_CC	4071
BpmI	CTGGAG(n)14_nn'	512	NcoI	C'CATG_G	689
Bpu10I	CC'TnA_GC	163	NspI	r_CATG'y	104, 2155
BsaI	GGTCTCn'nnnn_	3105	Pfi1108I	TCGTAG	3062
BsaBI	GATnn'nnATC_	129, 1538	PfiMI	CCAn_nnn'nTGG	621, 1075
BsaHI	Gr'CG_yC	3581, 3963, 4071	Psp1406I	AA'CG_TT	477, 3270, 3643
BseRI	GAGGAG	139, 1192	PstI	C_TGCA'G	110
BsgI	GTGCAG(n)14_nn'	1307	PvuI	CG_ATCG	3414, 4114
Bsil	C'TCGT_G	2324, 3708	PvuII	CAG'CTG	3, 290, 1975
BsmAI	GTCTCn'nnnn_	613, 3105	RleAI	CCCACA(n)9_nnn'	1605
BspEI	T'CCGG_A	386	SalI	G'TCGA_C	112
BspHI	T'CATG_A	2871, 3879, 3984	SapI	GCTCTCn'nnn_	2035
BspMI	ACCTGCnnnn'nnnn_	99, 574	ScaI	AGT'ACT	805, 3524
BsrBI	GAG'CGG	1843, 2084, 3885	SmaI	CCC'GGG	1781
BsrDI	GCAATG_nn'	409, 3105, 3279	SphI	G_CATG'C	104
BsrFI	r'CCGG_y	3124	Sse8387I	CC_TGCA'GG	110
Clal	ATCG_AT	1773	SstI	G_ÄGCTC	1793
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	2259	StyI	C'CwwG_G	689, 1223
DsaI	C'CryG_G	689	TaqII	CACCCA(n)9_nn'	613, 3730, 3747
Eam1105I	GACnn_n'nnGTC	3044	XbaI	T'CTAG_A	118
EciI	TCCGCC	2225, 2371, 3199	XhoI	C'TCGA_G	134
Eco57I	CTGAAG(n)14_nn'	1220, 2699, 3711	XmnI	GAAnn'nnTTC	3643
EcoRI	G'AATT_C	390, 1795			
Esp3I	CGTCTCn'nnnn_	613			
FspI	TGC'GCA	3266, 4093			

Kollagenase I-Promotorsequenzen (-518/+63) im Vektor pBL CAT5

puc/M13 Primer -518
Hind3 |
 1 TTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCAGGCAGCTTAACAA
 AAAGGGTCAGTGTCTGCAACATTTTGTCTGCCGGTACAGGTTTCGAACGTCGGTCCAATTTGTT

61 AGGCAGAAGGGAACCTCAGAGAACCCGAAGAGCCACCGTAAAGTGAGTGC TGGGGGAGC
 TCCGTCTTCCCTTGGAGTCTCTTGGGGCTTCTCGGTGGCATTTCACCTCAGACCCCTCG

121 TGAACCTCAGTCAGTACAGGAGCCGAACAGCCATCAGGTGCGCAGTGT TAGTAATTCAC
 ACTTGAAGTCAGTCATGTCTCGGCTTGTCTGGTAGTCCACGCGTCACAATCATTAAAGGTG

181 CCTCTGCCCTGGGAGCAAGGTGTGTGGAGAAACCTGTAGCACTTTATGACCATCAGAACC
 GGAGACGGGACCCCTCGTTCACACACCTCTTTGGACATCGTGAATACTGGTAGTCTTGG

-300
Nco1 | *Sca1*

241 AGCCTTTTTCAAAAAGACCATGGAGTACTCTTTGACCTGTGTATATAACAAGAACCCTTTC
 TCGGAAAAAGTTTTTCTGGTACCTCATGAGAAACTGGACACATATATTGTTCTTGGAAAG

-231 -207

301 TCAAATAGGAAAGAAATGAATTGGAGAAAACCACTGTTTACATGGCAGAGTGTGTCTCCT
 AGTTTATCCTTTCTTTACTTAACTCTTTTGGTGACAAATGTACCGTCTCACACAGAGGA

-193 -182 -171 -161 -151

361 TCGCACACATCTTGTGTTGAAGTTAATCATGACATGCAACACCAAGTGATTCCAAATAAT
 AGCGTGTGTAGAACAAACTTCAATTAGTACTGTAACGTTGTGGTTCACCTAAGGTTTATTA

-140 -136 -127 -107 -91

421 CTGCTAGGAGTCACCATTTCTAATGATTGCCTAGTCTATTTCATAGCTAATCAAGAGGATG
 GACGATCCTCAGTGGTAAAGATTACTAACGGATCAGATAAGTATCGATTAGTTCTCCTAC
PEA3

-74 -60 -30

481 TTATAAAGCATGAGTCAGACAGCCTCTGGCTTTCTGGAAGGGCAAGGACTCTATATATAC
AATATTTTCGTACTCAGTCTGTCTGGAGACCGAAAGACCTTCCCCTGCTGAGATATATATG
TRE

(+1) +1

541 AGAGGGAGCTTCCCTAGCTGGGATATTGGAGCAGCAAGAGGCTGGGAAGCCATCATTACC
 TCTCCCTCGAAGGATCGACCTATAACCTCGTCTCTCCGACCTTCGGTAGTGAATGG

+63
| *Xba1* *BamH1* *Bgl2* *Xho1*

601 TTGCACTGAGAAAGAAGACAAAGGCCCAAGCTGACTCTAGAGGATCCAGATCTCGAGGAG
 AACGTGACTCTTTCTTCTGTTTCCGGGTTGACTGAGATCTCCTAGGCTAGAGCTCCTC

661 CTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATAC
 GAACCGCTCTAAAAGTCCCTCGATTCTTTCGATTTTACCTCTTTTTTTAGTGACCTATATG
rev. CAT primer

5xTRE TATA CAT6

Wiedergegeben ist die 5xTRE TATA-Region des Konstrukts, sowie das Kollagenase-TRE Oligonukleotid, das zur Klonierung verwendet wurde (C. Jonat, 1990). Die übrige Sequenz ist identisch mit pBLCAT5.

```
5' -TTCCCAGTCACGAACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGCCAAGCTTGATGAGTCAGCC
3' -AAGGGTCAGTGCTTGCAACATTTTGCTGCCGGTCACCGGTTCGAACTACTCAGTCGG
      Hind3
```

```
GGATCCGGCTGACTCATCAAGCTTAGATGAGATTAGCCGGATCCGGCTGACTCATCAAGC
CCTAGGCCGACTGAGTAGTTCGAATCTACTCTAATCGGCC TAGGCCGACTGAGTAGTTCG
BamH1           Hind3           BamH1           Hind3
```

```
TTGATGAGTCAGCCGGATCTCTCTGAGNNATAGTATAAACTCGAGGAGCTTGGCGAG-3'
AACTACTCAGTCGGCCTAGAGAGACTCNNTATCATATTTTGAGCTCCTCGAACCGCTC-5'
      (BamH1/Bgl2)           Xho1
```

```

      -74      -66
      |        |
5' -AGCTTGATGAGTCAGCCG
      ACTACTCAGTCGGCCTAG-5'
      Hind3           BamH1
```


C. Literatur

- Abdel-Hafiz, H.A.M., Heasley, L.E., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Kroll, D.J., Johnson, G.L. und Hoeffler, J.P. (1992). Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol. Endocrinol.* 6, 2079-2089.
- Ahn, N.G., Seger, R. und Krebs, E.G. (1992). The mitogen-activation protein kinase activator. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4, 992-999.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York.
- 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. *PNAS* 74, 5350-5354.
- Andrews N.C. und Faller, D.V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *NAR* 19, 2499.
- Andrews, H.J., Bunning, R.A.D., Plumpton, T.A., Clark, I.M., Russell, R.G.G. und Cawston, T.E. (1990). Inhibition of interleukin-1-induced collagenase production in human articular chondrocytes in vitro by recombinant human interferon-gamma. *Arthritis. Rheum.* 33, 1733-1738.
- Angel, P. (1987). Struktur der menschlichen Kollagenase und ihre Regulation durch Karzinogene und Tumorpromotoren. Dissertation am Institut für Genetik (Kernforschungszentrum Karlsruhe), ISSN 0303-4003, KfK 4269.
- Angel, P. und Herrlich, P. (1994). General structure of AP-1 subunits and characteristics of the Jun proteins. In: *The FOS and JUN families of transcription factors*, S. 3-14, Angel, P. und Herrlich, P. (Hrsg). CRC Press, Inc.
- Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-157.
- Angel, P. und Karin, M. (1992). Specific members of the Jun protein family regulate collagenase expression in response to various extracellular stimuli. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors*. Matrix Supplement No. 1, 156-164, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Angel, P., Allegretto, E.A., Okino, S., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T. and Karin, M. (1988 a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332, 166-171.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1987a). 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-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., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988 b). The jun protooncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875-885.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987 b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
- Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. und Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370, 226-229.
- Arndt, K. und Fink, G.R. (1986). GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *PNAS* 83, 8516-8520.
- Auble, D.T., und Brinckerhoff, C.E. (1991). The AP-1 sequence is necessary but not sufficient for phorbol induction of collagenase in fibroblasts. *Biochemistry* 30, 4629-4635.

- Auer, H.P. (1990). Die Beeinflussung des auf Phorboldiester reagierenden Elements im Kollagenase-Gen durch umgebende Promotorsequenzen. Diplomarbeit am Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.
- Auer, H.P., König, H., Litfin, H., Stein, B. und Rahmsdorf, H.J. (1994). Ultraviolett irradiation, although it activates the transcription factor AP-1 in F9 teratocarcinoma stem cells, does not induce the full complement of differentiation-associated genes. *Exp. Cell Res.* 214, 131-138.
- Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1991). IP-1: A dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* 64, 983-993.
- Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1992). AP-1 (Fos-Jun) regulation by IP-1: effect of signal transduction pathways and cell growth. *Oncogene* 7, 2271-2280.
- Avruch, J., Zhang, X. und Kyriakis, J.M. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *TIBS* 19, 279-283.
- Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C. und Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699-704.
- 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. *PNAS* 82, 4132-4136.
- Baumann, I. (1986). Diplomarbeit am Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.
- Binétruy, B., Smeal, T. und Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351, 122-127.
- Birnboim, P.M. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR* 7, 1513-1523.
- Blenis J. (1993). Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *PNAS* 90, 5889-5892.
- Blumer, K.J. und Johnson, G.L. (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *TIBS* 19, 236-239.
- Bohmann, D., Bos, T., Admaon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. und Tjian, R. (1987). Human proto-onkogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238, 1386-1392.
- Boone T.C., Johnson, J.M., DeClerck, Y.A. und Langley, K.E. (1990). cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *PNAS* 87, 2800-2804.
- Bornstein, P., Duskin, D., Balian, G., Davidson, J.M., Crouch, E. (1978). Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312, 93-105.
- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H.K., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M. and Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573-584.
- Boyle, W.J., van der Geer, P. and Hunter, T. (1991 b). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin layer cellulose plates. *Meth. Enzymol.* 201, 110-149.
- Brännström, M., Woessner, J.F., Koos, R.D., Sear, C.H.J. und LeMairre, W.J. (1988). Inhibitors of mammalian tissue collagenase and metalloproteinase suppress ovulation in the perfused rat ovary. *Endocrinology* 122, 1715-1721.
- Bravo, R. (1990). Growth factor-responsive genes in fibroblasts. *Cell Growth & Differentiation* 1, 305-309.
- Brenner, D.A., Adler, R.R., Rappolee, D.A., Pedersen, R.A. und Werb, Z. (1989 a). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Develop.* 3, 848-859.
- Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. und Karin, M. (1989 b). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- α . *Nature* 337, 661-663.

- Brinckerhoff, C.E. (1990). Retinoids and rheumatoid arthritis: Modulation of extracellular matrix by controlling expression of collagenase. *Methods Enzymol.* 190, 175-188.
- Brinckerhoff, C.E., Plucinska, I.M., Sheldon, L.A. und O'Connor, G.T. (1986). Half-life of synovial cell collagenase mRNA is modulated by phorbol myristate acetate but not by all-trans-retinoic acid or dexamethasone. *Biochemistry* 25, 6378-6384.
- Brinckerhoff, C.E., Sirum-Connolly, K.L., Karmilowicz, M.J. und Auble, D. (1992). Expression of Stromelysin and Stromelysin-2 in rabbit and human fibroblasts. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors*, Birkedal-Hansen et al. (Hrsg.). Gustav Fischer, New York. MATRIX Supplement No. 1, 165-175.
- Buddecke, E. (1980). Grundriß der Biochemie. de Gruyter, Berlin, 6. Auflage.
- Busch, S. und Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucin zippers and DNA-binding domains. *TIG* 6, 36-40.
- 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.
- Cano, E., Hazzalin, C.A. und Mahadevan, L.C. (1994). Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of *c-fos* and *c-jun*. *MCB* 14, 7352-7362.
- Carmichael, D.F., Sommer, A., Thompson, R.C., Anderson, D.C., Smith, C.G., Welgus, H.G. und Stricklin, G.P. (1986). Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *PNAS* 83, 2407-2411.
- Case, J.P., Lafyatis, R., Remmers, E.F., Kumkumian, G.H. und Wilder, R.L. (1989). Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium: A transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes. *Am. J. Pathol.* 135, 1055-1064.
- Chamberlain, S.H. et al. (1993). Novel phorbol ester responsive sequences in the collagenase gene. *Journal of Cellular Biochemistry* 52, 337-351.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745-2752.
- Chen, C.-Y. und Shyu, A.-B. (1994). Selective degradation of early-response-gene mRNAs: Functional analysis of sequence features of the AU-rich elements. *MCB* 14, 8471-8482.
- Chen, E.Y. und Seeburg, P. (1985). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.
- Chen, R.H., Sarnecki, C. und Blenis, J. (1992). Nuclear localisation and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 915-927.
- Chengsi, H., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z. und Goldberg, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *PNAS* 86, 2632-2636.
- Chiu, R., Angel, P. und Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* 59, 979-986.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. und Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.
- Church, G.M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *PNAS* 81, 1991-1995.
- Crews, C.M., Alessandrini, A. und Erikson, R.L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258, 478-480.
- Croston, G.E., Kerrigan, L.A., Lira, L.M., Marshak, D.R. und Kadonaga, J.T. (1991). Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* 251, 643-649.
- Curran, T. und Franza, B.R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- Curran, T. und Teich, N.M. (1982). Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: Characterization of a 55.000-Dalton phosphoprotein. *J. Virol.* 42, 114-122.

- Davis, R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.
- De Simone, V. und Cortese, R. (1991). Transcriptional regulation of liver-specific gene expression. *Current Opinion in Cell Biology* 3, 960-965.
- Dellaisse, J.-M., Eeckhout, Y. und Vaes, G. (1988). Bone-resorbing agents affect the production and distribution of procollagenase as well as the activity of collagenase in bone tissue. *Endocrinology* 123, 264-276.
- Deng, T. und Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses *c-jun* by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* 7, 479-490.
- Denhardt, D.T. (1966). A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23, 641-646.
- Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barret, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994). JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Dérijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R. (1995). Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J und Karin, M. (1993). NF-kB activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* 261, 1442-1445.
- Diamond, L. (1987). Tumor promoters and cell transformation. In: *Mechanisms of Cellular Transformation by Carcinogen Agents*, S. 73-133. Grunberger, G. und Goff, S. (Hrsg.). Pergamon Press.
- Diamond, L., O'Brian, T.G. und Baird, W.M. (1980). Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. *Adv. Cancer Res.* 32, 1-74.
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. und Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249, 1266-1272.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. und Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *NAR* 11, 1475-1489.
- Dillon, N. und Grosveld, F. (1994). Chromatin domains as potential units of eukaryotic gene function. *Current Opinion in Genetics and Development* 4, 260-264..
- Docherty A.J.P., Lyons, A., Smith, B.J., Wright, E.M., Stephens, P.E., Murphy, G. und Reynolds, J.J. (1985). Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318, 66-69.
- Duffy, M.J., O'Grady, P., Devaney, D., O'Siorain, L., Fennelly, J.J. und Lijnen, H.J. (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast cancers. Preliminary report. *Cancer* 62, 531-533.
- Edwards, D.R. und Mahadevan, L.C. (1992). Protein synthesis inhibitors differentially superinduce *c-fos* and *c-jun* by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J.* 11, 2415-2424.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitman, S.E., Docherty, A.J.P., Angel, P. and Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* 6, 1899-1904.
- Ehrlich, H.A. (1989). PCR Technology. *Stockton Press*.
- Elder, P.K., Schmidt, L.J., Ono, T. und Getz, M.J. (1984). Specific stimulation of actin gene transcription by epidermal growth factor and cycloheximide. *PNAS* 81, 7476.
- Erikson, R.L. (1991). Structure, expression and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 266, 6007-6010.
- Everts, V., Wolvius, E., Saklatvala, J. und Beertsen, W. (1990). Interleukin 1 increases the production of collagenase but does not influence the phagocytosis of collagen fibrils. *Matrix* 10, 388-393.

- Fields, G.B., Van Wart, H.E. und Birkedal-Hansen, H. (1987). Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. *J. Biol. Chem.* 262, 6221-6226.
- Fisher, R., Waller, E.K., Grossi, G., Thompson, D., Tizard, R. und Schleuning, W.-D. (1985). Isolation and characterization of the human tissue-type plasminogen activator structural gene including its 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 260, 11223-11230.
- Formstone, C.J., Byrd, P.J., Ambrose, H.J., Riley, J.H., Hernandez, D., McConville, C.M. und Taylor, A.M. (1993). The order and orientation of a cluster of metalloproteinase genes, stromelysin 2, collagenase, and stromelysin, together with D11S385, on chromosome 11q22-q23. *Genomics* 16, 289-291.
- Fort, P., Rech, J., Vie, A., Piechaczyk, M., Bonniou, A., Jeanteur, P. und Blanchard, J.-M. (1987). Regulation of *c-fos* gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 15, 5657-5667.
- Frisch, S.M. und Morisaki, J.H. (1990). Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6524-6532.
- Frisch, S.M., Reich, R., Collier, I.E., Genrich, T., Martin, G. und Goldberg, G.I. (1990). Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene* 5, 75-83.
- Fujita, T., Shibuya, H., Ohashi, T., Yamanishi, K. und Taniguchi, T. (1986). Regulation of human interleukin-2 gene: functional sequences in the 5'-flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell* 46, 401-407.
- Galang, C.K., Der, C.J. und Hauser, C.A. (1994). Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* 9, 2913-2921.
- Garbisa, S., Pozzati, R., Muschel, R.J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R.H., Khoury, G. und Liotta, L.A. (1987). Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: Induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1A. *Cancer Res.* 47, 1523-1528.
- Garzon, R. und Zehner, Z.E. (1994). Multiple silencer elements are involved in regulating the chicken vimentin gene. *Mol. Cell. Biol.* 14, 934-943.
- Gebel, S. (1992). Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun: Ein Schlüssel zum Verständnis der schnellen Induktion von Genen. Dissertation am Institut für Genetik (Kernforschungszentrum Karlsruhe), ISSN 0303-4003, KfK 5015.
- Gille, H., Sharrocks, A. und Shaw, P. (1992). Phosphorylation of p62 TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-Fos promoter. *Nature* 358, 414-417.
- Gilman, M.Z. (1987). Ribonuclease protection assay. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Hrsg.), Green Publishing Associates, New York, Unit 4.7
- Gilman, M.Z. (1988). The *c-fos* serum response element responds to protein kinase C-dependent and -independent signals but not to cyclic AMP. *Genes Dev.* 2, 394-402.
- Glover, J.N.M. und Harrison, S.C. (1995). Crystl structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373, 257-261.
- Goldberg, B. und Rabinovitch, M. (1989). Connective Tissue. In: *Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology*. Weiss, L. (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich, 6th ed..
- Gonzalez, G.A. und Montminy, M. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-680.
- Gorman, C.M., Merlino, G.T., Willingham, M.C., Pastan, I. und Howard, B.H. (1982 b). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *PNAS* 79, 6777-6781.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. und Howard, B.H. (1982 a). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1057.
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.

- Greenberg, J.H., Seppä, S., Seppä, H. und Hewitt, A.T. (1981). Rolle of collagen and fibronectin in neural crest cell adhesion and migration. *Dev. Biol.* 87, 259-266.
- Greenberg, M.E. und Ziff, E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* 311, 433-438.
- Greenberg, M.E., Hermanowski, A.L. und Ziff, E.B. (1986). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of *c-fos*, *c-myc*, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1050-1057.
- Gross, J. und Bruschi, A.B. (1971). The pattern of collagen degradation in cultured tadpole tissues. *Dev. Biol.* 26, 36-41.
- Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B. und Davis, R. (1995). Transcription factor ATF2 Regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.
- Gutman, A. und Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promotor contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* 9, 2241-2246.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Alberts, A., Meinkoth, J., Feramisco, J., Dend, T., Karin, M. und Montminy, M. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1 mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70, 105-113.
- Hagmeyer, B.M., König, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A.J., Herrlich, P. und Angel, P. (1993). Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.* 12, 3559-3572.
- Hai, T., Liu, F., Coukos, W.J. und Green, M.R. (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* 3, 2038-2090.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of *E. coli*. In: *DNA cloning*. Glover, D.M. (Hrsg.), IRL Press Band 1, Oxford, 109-135.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Kodama, S., Iwata, H. und Iwata, K. (1991). Tissue inhibitor of metallo-proteinases and collagenase activity in synovial fluid of human rheumatoid arthritis. *Biomed. Res.* 12, 169-173.
- Haystead, T.A.J., Dent, P., Wu, J., Haystead, C.M.M. und Sturgill, T. (1992). Ordered phosphorylation of p42^{MAPK} by MAP kinase kinase. *FEBS* 301, 17-22.
- He, C., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z. und Goldberg, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *PNAS* 86, 2632-2636.
- Hecker, E. (1968). Cocarcinogenic principles from the seed oil of croton tiglium and from other euphorbiaceae. *Cancer Res.* 28, 2338-2349.
- Herr, I., van Dam, H. und Angel, P. (1994). Binding of promotor-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the *c-jun* promotor by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis* 6, 1105-1113.
- Herrera, R.E., Shaw, P.E. und Nordheim, A. (1989). 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. und Rahmsdorf, H.J. (1994). Transcriptional and post-transcriptional responses to DNA-damaging agents. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 425-431.
- Hewitt, R.E., Leach, L.H., Powe, D.G., Clark, L.M., Cawston, T.E., und Turner, D.R. (1991). Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int. J. Cancer* 49, 666-672.
- Hibbs, M.S. und Bainton, D.F. (1989). Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. *J. Clin. Invest.* 84 (5), 1395-1402.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135-2148.

- Hori, R. and Carey, M. (1994). The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Current Opinion in Genetics & Development* 4: Chromosomes and expression mechanisms, 2236-244.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387.
- Hunter, T. und Sefton, B. (1980). Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *PNAS* 77, 1311-1315.
- Ishihara, T., Kudo, A. und Watanabe, T. (1984). Induction of immunoglobulin gene expression in mouse fibroblasts by cycloheximide treatment. *J. Exp. Med.* 160, 1937.
- Jackson, S.P. (1992). Regulating transcription factors activity by phosphorylation. *Trends Cell Biol.* 2, 104-108.
- Jänicke, F., Schmitt, M., Pache, L., Ulm, K., Harbeck, N., Höfler, H. und Graeff, H. (1993). Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 24, 195-208.
- Janknecht, R., Ernst, W.H., Pingoud, V. und Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.* 12, 5097-5104.
- Janusz, M.J. und Doherty, N.S. (1991). The degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin G. *J. Immunol.* 146, 3922-3928.
- Jenuwein, T., Forrester, W.C., Qiu, R.-G. und Grosschedl, R. (1993). The immunoglobulin μ enhancer core establishes local factor access in nuclear chromatin independent of transcriptional stimulation. *Genes Dev.* 7, 2016-2032.
- Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J. und McKnight, S.L. (1987). Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses. *Genes & Dev.* 1, 133-146.
- Jonat, C. (1990). Glucocorticoid-induzierte Repression der Kollagenase-I Synthese: Vermittlung durch den Transkriptionsfaktor AP-1. Dissertation am Institut für Genetik (Kernforschungszentrum Karlsruhe), ISSN 0303-4003, KfK 4750.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.
- Jones, N.C, Rigby, P.W.J., Ziff, E.B. (1988). *Trans*-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: Lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* 267-281.
- Juliano, R.L. und Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120, 577-585.
- Karin, M. (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 415-424.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R., Krauter, P., Westphal, H. und Beato, M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-II_A gene. *Nature* 308, 513-519.
- Kawai, S. und Nishizawa, M. (1987). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell Biol.* 4, 1172-1174.
- Kerr, L.D., Miller, D.B. und Matrisian, L.M. (1990). TGF- β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61, 267-278.
- Kolbus, A. (1993). UV-geschädigte DNA als ein Auslöser der UV-Antwort: Analyse durch Mikroinjektion einzelner Zellen. Diplomarbeit am Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.
- Kölch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, S. and Rapp, U.R. (1993). Protein kinase C α activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.
- König, H. (1992). Konstitutiv und induzierbar an die DNA bindende Transkriptionsfaktoren *in vivo*: Vermittler von positiver und negativer Genregulation. Dissertation am Institut für Genetik (Kernforschungszentrum Karlsruhe), ISSN 0303-4003, KfK 5071 B.

- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. und Herrlich, H. (1992). Interference between pathway specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation *in vivo*. *EMBO J.* 11, 2241-2246.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1989). Autoregulation of *fos*: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* 8, 2559-2566.
- Krstic, R.V. (1978). Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. Ein Atlas zum Studium für Mediziner und Biologen. Springer-Verlag, Berlin.
- Kryszke, M.H., Piette, J. und Yaniv, M. (1987). Induction of a factor that binds to the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* 328, 254-256.
- Kwok, R.P.S., Lundblad, J.R., Chriva, J.C., Richards, J.P., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G.E., Green, M.R. und Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* 265, 17355-17363.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L. und Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase. *Nature* 358, 417-421.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. und Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laird-Offringa, I.A., de Wit, C.L., Elfferich, P. und van der Eb, A.J. (1990). Poly(A) tail shortening is the translation dependent step in *c-myc* mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6132-6140.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Lange-Carter, C., Pleiman, C., Gardner, A., Blumer, K. und Johnson, G. (1993). A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260, 315-319.
- Laub, O., Jakobovits, E.B. und Aloni, J. (1980). 5,6-dichloro-1- β -ribofuranosylbenzimidazole enhances premature termination of late transcription of simian virus 40 DNA. *PNAS* 77, 3297-3301.
- Lee, K.A.W. und Masson, N. (1993). Transcriptional regulation by CREB and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1174, 221-233.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. und Tjian, R. (1987 a). Activation of transcription by two factors that bind promotor and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325, 368-372.
- Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987 b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49, 741-752.
- Leevers, S.J. und Marshall, C.J. (1992). Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21 *ras* oncoprotein. *EMBO J.* 11, 569-574.
- Lenardo, M.J. und Baltimore, D. (1989). NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control (Minireview). *Cell* 58, 227-229.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pagès, G., L'Allemain, G., Brunet, A. und Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42^{mapk} and p44^{mapk}) but not of their activator MAP kinase kinase (p45^{mapkk}) in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 122, 1079-1088.
- Lewin, B. (1990). Genes IV. Oxford University Press.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J., Seth, A. und Davis, R. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP Kinase. *Cell* 72, 269-278.

- Liotta, L.A., Abe, S., Robey, P.G. and Martin, G. (1979). Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *PNAS* 76, 2268-2272.
- Loo, S. und Rine, J. (1994). Silencers and domains of generalized repression. *Science* 264, 1768-1771.
- 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.
- Luckow, B. und Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 15, 5490.
- MacNaul, K.L., Chartrain, N., Lark, M., Tocci, M.J. und Hutchinson, N.I. (1990). Discoordinate expression of stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α on stromelysin expression. *J. Biol. Chem.* 265, 17238-17245.
- Mahadevan, L.C. und Edwards, D.R. (1991). Signalling and superinduction. *Nature* 349, 747-748.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory.*
- Marais, R., Wynne, J. und Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein ELK-1 contains a growth factor regulated transcription domain. *Cell* 73, 381-393.
- Maroteaux, L., Chen, L., Mitrani-Rosenbaum, S., Howley, P.M. und Revel, M. (1983). Cycloheximid induces expression of the human interferon β_1 gene in mouse cells transformed by bovine papilloma-virus-interferon β_1 recombinants. *J. Virol.* 47, 89.
- Mathey-Prevot, B., Andrews, N.C., Murphy, H.S., Kreissman, S.G. und Nathan, D.G. (1990). Positive and negative elements regulate human interleukin 3 expression. *PNAS* 87, 5046-5050.
- Matrisian, L.M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 6, 121-125.
- Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 14, 455-463.
- Matrisian, L.M. und Hogan, B.L.M. (1990). Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. In: *Current Topics in Developmental Biology* 24, 219-259, Academic Press, Inc.
- Matrisian, L.M., Bowden, G.T., Krieg, P., Fürstenberger, G., Briand, J.P., LeRoy, P. und Breathnach, R. (1986 a). The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *PNAS* 83, 9413-9417.
- Matrisian, L.M., Leroy, P., Ruhlmann, C., Gesnel, M.-C. und Breathnach, R. (1986 b). Isolation of the oncogene and epidermal growth factor-induced transin gene: Complex control in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1679-1686.
- Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65, 499-560.
- McCormick, F. (1994). Raf: the holy grail of ras biology?. *Trends in Cell Biology* 4, 347-350.
- McKnight, S. und Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46, 795-805.
- McKnight, S.L., Gavis, E.R. und Kingsbury, R. (1981). Analysis of transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: Identification of an upstream control region. *Cell* 25, 385-398.
- McKnight, S.L., Kingsbury, R.C., Spence, A. und Smith, M. (1984). The distal transcription signals of the herpesvirus tk gene share a common hexanucleotide control sequence. *Cell* 37, 253-262.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *NAR* 12, 7035-7056.

- Mignatti, P., Robbins, E. und Rifkin, D.B. (1986). Tumor invasion through the human amniotic membrane: Requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47, 487-498.
- Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E. und Rifkin, D.B. (1989). In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J. Cell. Biol.* 108, 671-682.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Dérijard, ., Davis, R., Johnson, G.L. und Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266, 1719-1723
- Mitchell, P.J. and Tijan, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Mordaq, J.C. und Linzer, D.I.H. (1989). Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes & Dev.* 3, 760-769.
- Mueller, P.R. und Wold, B. (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246, 780-786.
- Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M.C., Millon-Collard, R., Abecassis, J. und Breathnach, R. (1988). The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem. J.* 253, 187-192.
- Muller, D., Wolf, C., Abecassis, J., Millon, R., Engelmann, A., Bronner, G., Rouyer, N., Rio, M.C., Eber, M., Methlin, G., Chambon, P. und Basset, P. (1993). Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 53, 165-169.
- Muller, D.R., Breathnach, R., Engelmann, A., Millon, R., Bronner, G., Flesch, H., Dumont, P., Eber, M. und Abecassis, J. (1991). Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. *Int. J. Cancer* 48, 550-556.
- Murphy, G., Crockett, M.I., Stefens, P.I., Smith, B.J. und Docherty, A.J.P. (1987). Stromelysin is an activator of procollagenase: A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 248, 265-268.
- Nakajima, M., Welch, D.R., Belloni, P.N. und Nicholson, G.L. (1987). Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.* 47, 4869-4876.
- Nerlov, C., D. C. D., Pergola, F., Caracciolo, A., Blasi, F., Johnsen, M. und Verde, P. (1992). A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.* 11, 4573-4582.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308, 693-698.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Nomura, S., Hogan, B.L.M., Wills, A.J., Heath, J.K. und Edwards, D.R. (1989). Developmental expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) RNA. *Development* 105, 575-584.
- Oehler, T. und Angel, P. (1992). A common intermediary factor (p52/p54) recognizing "acidic-blob"-type domains is required for transcriptional activation by the Jun proteins. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5508-5515.
- Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1A: Repression of AP-1 activity. *Cell* 62, 527-538.
- Oliviero, S. und Struhl, K. (1991). Synergistic transcriptional enhancement does not depend on the number of acid activation domains bound to the promotor. *PNAS* 88, 224-228.
- Otani, Y., Quinones, S., Saus, J., Kurkinen, M. und Harris, E.D. Jr. (1990). Cycloheximide induces stromelysin mRNA in cultured human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 192, 75-79.

- Overall, C.M., Wrana, J.L. und Sodek, J. (1991). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 kDa-Gelatinase/Type IV Collagenase by transforming growth factor- β 1 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266, 14064-14071.
- Pestka, S. (1971). Inhibitors of ribosome functions. In: *Annual review of microbiology* 25, 515-553, Clifton, C.E., Raffel, S., Starr, M.P. (Hrsg.).
- Pötting, A. (1985). Charakterisierung TPA-regulierter Gene mit Hilfe von cDNAs. Dissertation am Institut für Genetik (Kernforschungszentrum Karlsruhe), ISSN 0303-4003.
- Pschyrembel (1986). Klinisches Wörterbuch. *de Gruyter*, Berlin, 255. Auflage.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-689.
- Ptashne, M. und Gann, A.F. (1990). Activators and targets. *Nature* 346, 329-331.
- Pulverer, B.J., Kyriakis J.M., Arruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- Rabin, M., Doherty, P.J. und Gottesman, M.M. (1986). The tumor promotor phorbol 12-myristate 13-acetate induces a program of altered gene expression similar to that induced by platelet-derived growth factor and transforming oncogenes. *PNAS* 83, 357-360.
- Radler-Pohl, A., Gebel, S., Sachsenmaier, C., König, H., Krämer, M., Oehler, T., Streile, M., Ponta, H., Rapp, U., Rahmsdorf, H.J., Cato, A.C.B., Angel, P. und Herrlich, P. (1992). The activation and activity control of AP-1 (Fos/Jun). In: *Zinc-Finger Proteins in Oncogenesis: DNA-Binding and Gene Regulation. Annals of the New York Academy of Sciences* 684, 127-148.
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.P., Bruder, J.T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 Kinase. *EMBO J.* 12, 1005-1012.
- Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1990). Regulation of gene expression by tumor promoters. *Pharmac. Ther.* 48, 157-188. Pergamon Press.
- Rahmsdorf, H.J., Gebel, S., Krämer, M., König, H., Lüche-Huhle, C., Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Stein, B., Auer, H.-P., Vanetti, M. und Herrlich, P. (1992). Ultraviolet irradiation and phorbol esters induce gene transcription by different mechanisms. In: *Induced Effects of Genotoxic Agents in Eukaryotic Cells*. Rossman, T. (Hrsg.), Hemisphere, Washington, D.C., 141-161.
- Rahmsdorf, H.J., Harth, N., Eades, A.M., Litfin, M., Steinmetz, M., Forni, L. und Herrlich, P. (1986). Interferon- γ , Mitomicin C, and cycloheximid as regulatory agents of MHC class II-associated invariant chain expression. *Journal of Immunology* 136, 2293-2299.
- Rahmsdorf, H.J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütther, U. und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of *c-fos* expression. *Nucleic Acids Res.* 15, 1643-1659.
- Reich, R., Thompson, E.W., Iwamoto, Y., Martin, G.R., Deason, J.R. Fuller, G.C. und Miskin, R. (1988). Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Res.* 48, 3307-3312.
- Renauld, H., Aparicio, O., Zierath, P., Billington, B. Chablani, S. und Gottschling, D. (1993). Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promotor distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev.* 7, 1133-1145.
- Renkawitz, R. (1990). Transcriptional repression in eukaryotes. *TIG* 6, 192-197.
- Risse, G., Jooss, K., Neuberg, M., Brüller, H.-J. und Müller, R. (1989). Asymmetrical recognition of the palindromic AP-1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. *EMBO J.* 8, 3825-3832.
- Roldan, A.L., Cubellis, M.V., Masucci, M.T., Behrendi, N., Lund, L.R., Danø, K., Apella, E. und Blasi, F. (1990). Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 9, 467-474.
- Romer, A.S. und Parsons, T.S. (1983). Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere. Parey, Hamburg, 5. Auflage.

- Rozek, D und Pfeifer, G.P. (1993). *In vivo* protein-DNA interactions at the *c-jun* promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5490-5499.
- Ryden, T.A. und Beemon, K. (1989). Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1155-1164.
- Ryffel, G.U., Kugler, W., Wagner, U. und Kaling, M. (1989). Liver cell specific gene transcription *in vitro*: the promoter elements HP1 and TATA box are necessary and sufficient to generate a liver-specific promoter. *NAR* 17, 939-953.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* 78, 963-972.
- Saksela, O. und Rifkin, D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: Regulation and physiological functions. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4, 93-126.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74, 5463-5467.
- Sato, H. und Seiki, M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405.
- Sato, T., Ito, A., Mori, Y., Yamashita, K., Hayakawa, T. und Nagase, H. (1991). Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 β . *Biochem. J.* 275, 645-650.
- Sánchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J. und Zon, L.I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372, 794-798.
- Schaper, J. (1993). Isolierung und Charakterisierung des Kollagenase I-Gens der Maus. Diplomarbeit am Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.
- Scheidtmann, K.H., Echele, B. und Walter, G. (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J. Vir.* 44, 116-133.
- Schönthal, A., Büscher, M., Angel, A., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M. und Herrlich, P. (1989). The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* 4, 629-638.
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. und Ponta, H. (1988). Requirement for the *fos* gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54, 325-334.
- Schorpp, M., Kugler, W., Wagner, U. und Ryffel, G.U. (1988). Hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. *J. Mol. Biol.* 202, 307-320.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. und Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.
- Serfling, E. und Slaga, T.L. (1985). Enhancers and eucaryotic gene transcription. *TIG* 1, 224-230.
- Seth, A., Alvarez, E., Gupta, S., Davis, R.J. (1991). A phosphorylation site located in the NH₂-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 266, 23521-23524.
- Shaw, P.E., Schröter, H. und Nordheim, A. (1989). The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human *c-fos* promoter. *Cell* 56, 563-572.
- Sirum-Connolly, K. und Brinckerhoff, C.E. (1991). Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. *NAR* 19, 335-341.
- Smeal, T., Binétruy, B., Mercola, D., Grover-Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U.R. und Karin, M. (1992). Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell Biol.* 12, 3507-3513.

- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M and Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on residues 63 and 73. *Nature*, 354, 494-496.
- Smerdon, M.J., Bedoyan, J. und Thoma, F. (1990). DNA repair in a small yeast plasmid folded into chromatin. *NAR* 18, 2045-2051.
- Smith, S.B. und Johnson, K.S. (1988). Single step purification of polypeptide expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Sodek, J. und Overall, C.M. (1992). Matrix metalloproteinases in peridontal tissue remodelling. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors*. Matrix Suppl. No. 1, 352-362, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Sözeri, O., Vollmer, K., Liyanage, M., Frith, D., Kour, G., Mark, G.E. and Stabel, S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7, 2259-2262.
- Springman, E.B., Angelton, E.L., Birkedal-Hansen, H. und Van Wart, H.E. (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zink complex in latency and a "cystein switch" mechanism for activation. *PNAS* 87, 364-368.
- Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der Eb, A. und Rahmsdorf, H.J. (1992). Ultraviolet-radiation induced *c-jun* gene transcription: Two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem. Photobiol.* 55, 409-415.
- Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein. *Mol. Cell Biol.* 9, 5169-5181.
- Stetler-Stevenson, W.G. (1990). Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 289-303.
- Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. und Liotta, L.A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9, 541-573.
- Stetler-Stevenson, W.G., Krutzsch, H.C. und Liotta, L.A. (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 264, 17374-17378.
- Stokoe, D., Campbell, D.G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S.J., Marshall, C.J., Cohen, P. (1992). MAPKAP Kinase-2: a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* 11, 3985-3994.
- Stricklin, G.P., Bauer, E.A., Jeffrey, J.J. and Eisen, A.Z. (1977). Human skin collagenase: Isolation of precursor and activ forms from fibroblast and organ cultures. *Biochemistry* 16, 1607-1615.
- Struhl, K. (1987). The DNA-binding domains of the Jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* 50, 841-846.
- Struhl, K. (1988). The Jun oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast. *Nature* 332, 649-650.
- Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G. und Nagase, H. (1990). The activation of tissue procollagenase by MMP-3 (Stromelysin). *Biochemistry* 29, 10261-10270.
- Takahashi, S., Ito, A., Nagino, M., Mori, Y., Xie, B. und Nagase, H. (1991). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate suppresses interleukin-1 induced synthesis of matrix metalloproteinases but not of tissue inhibitor of metalloproteinases in human uterine cervical fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266, 19894-19899.
- Thorpe, S.M., Rochefort, H., Garcia, M., Freiss, G., Chistensen, I.J., Khalaf, S., Paolucci, F., Pau, B., Rasmussen, B.B. und Rose, C. (1989). Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res.* 49, 6008-6014.
- Touray, M., Ryan, F., Jaggi, R. und Martin, F. (1991). Characterisation of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. *Oncogene* 6, 1227-1234.

- Treisman, R. (1985). Transient accumulation of *c-fos* RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and *c-fos* 3' sequences. *Cell* 42, 889-902.
- Treisman, R. (1992). The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* 17, 423-426.
- Treisman, R. (1994). Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Current Opinion in Genetics and Development* 4, 96-101.
- Troen, B., Ascherman, D., Atlas, D. und Gottesman, M.M. (1988). Cloning and expression of the gene for the major excreted protein of transformed mouse fibroblasts a secreted lysosomal protease regulated by transformation. *J. Biol. Chem.* 263, 254-261.
- Tsukiyama, T., Becker, P.B. und Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367, 525-531.
- Umek, R.M., Friedman, A.D. und McKnight, S.L. (1991). CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251, 288-292.
- Urbanski, S.J., Edwards, D.R., Maitland, A., Leco, K.J., Watson, A. und Kossakowska, A.E. (1992). Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br. J. Cancer* 66, 1188-1194.
- Vaes, G. (1988). Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 231, 239-271.
- Vallee, B.L. und Auld, D.S. (1990). Active site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *PNAS* 87, 220-224.
- Vallee, B.L. und Auld, D.S. (1992). Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors*. Matrix Suppl. No. 1, 5-19, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Vallette, F., Mege, E., Reiss, A. und Adesnik, M. (1989). Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. *NAR* 17, 723.
- Van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., De Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., Van der Eb, A. (1993). Heterodimer formation of c-Jun and ATF-2 is responsible for induction of c-Jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 12, 479-487.
- Van Duuren, B.L. und Oris, L. (1965). The tumor-enhancing principles of croton tiglium I. *Cancer Res.* 25, 1871-1875.
- Van Wart, H. und Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *PNAS* 87, 5578-5582.
- Vasquez, D. (1979). Inhibitors of protein synthesis. *Springer Verlag KG*, Berlin.
- Verdin, E., Paras, P. und Van Lint, C. (1993). Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO* 12, 3249-3259.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. und Cooper, J.A. (1993). Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* 74, 205-214.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L. und Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211, 7-18.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., LePunche, P. und Stehelin, D. (1990). The *c-ets* proto-oncogene encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191-193.
- Wasylyk, C., Flores, P., Gutman, A. und Wasylyk, B. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* 8, 3371-3378.
- Welgus, H.G., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z., Roswit, U.T. und Stricklin, G.P. (1985). Human skin fibroblast collagenase: Interaction with substrate and inhibitor. *Collagen Rel. Res.* 5, 167-179.
- Werb, Z., Alexander, C.M. und Adler, R.R. (1992). Expression and function of matrix metalloproteinases in development. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors*. Matrix Suppl. No. 1, 337-343, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Werb, Z., Mainardi, G., Vater, C.A. und Harris, E.D. (1977). Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *New Engl. J. Med.* 296, 1017-1023.
- Whitham, S.E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Smith, B.J., Lyons, A., Harris, T.J.R., Reynolds, J.J., Herrlich, P. und Docherty, A.J.P. (1986). Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* 240, 913-916.
- Wilson, T. und Treisman, R. (1988). Fos C-terminal mutations block down-regulation of *c-fos* transcription following serum stimulation. *EMBO J.* 7, 4193-4202.
- Woessner, J.F. (1991). Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145-2154.
- Wolf, C., Chenard, M.P., de Grossouvre, P.D., Bellocq, J.P., Chambon, P. und Basset, P. (1992). Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 99, 870-872.
- Wolf, C., Rouyer, N., Lutz, Y., Adida, C., Lorient, M., Bellocq, J.P., Chambon, P. und Basset, P. (1993). Stromelysin-3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *PNAS* 90, 1843-1847.
- Wolffe, A. P. (1994 a). Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *TIBS* 19, 240-244.
- Wolffe, A.P. (1994 b). The transcription of chromatin templates. *Current Opinion in Genetics & Development* 4: Chromosomes and expression mechanisms, 245-254.
- Wu, H., Moulton, K., Horvai, A., Parik, S. und Glass, C.K. (1994). Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *MCB* 14, 2129-2139.
- Xanthopoulos, K.G. und Mirkovitch, J. (1993). Gene regulation in rodent hepatocytes during development, differentiation and disease. *Eur. J. Biochem.* 216, 353-360.
- Yagel, S., Khokha, R., Denhardt, D., Kerbel, R.S., Parkar, R.S. und Lala, P.K. (1989). Mechanism of cellular invasiveness: A comparison of amnion invasion *in vitro* and metastatic behavior *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 768-775.
- Yagel, S., Parhar, R.S., Jeffrey, J.J. und Lala, P.K. (1988). Normal nonmetastatic human trophoblast cells share *in vitro* invasive properties of malignant cells. *L. Cell. Physiol.* 136, 455-462.
- Yan, M., Dai, T., Deak, J., Kyriakis, J., Zon, L., Woodgett, J. und Templeton, D.J. (1994). Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372, 798-800.
- Yang, M. und Kurkinen, M. (1994). Different mechanisms of regulation of the human stromelysin and collagenase genes. Analysis by a reverse-transcription-coupled-PCG assay. *Eur. J. Biochem.* 222, 651-658.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. und Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.
- Zandomeni, R., Mittleman, B., Bunick, D., Ackerman, S. und Weinmann, R. (1982). Mechanism of action of dichloro-B-furanosyl-benzimidazole: effect on *in vitro* transcription. *PNAS* 79, 3167-3170.
- Zandomeni, R., Zandomeni, M.C., Shugar, D. und Weinmann, R. (1986). Casein Kinase Type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* 261, 3414-3419.