

KfK 5285 B
Januar 1994

**Die Expression des Maus
Mamma Tumor Virus:
Identifizierung eines
zelltypspezifischen Repressors**

E. Härtig
Institut für Genetik

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik

KfK 5285 B

**Die Expression des Maus Mamma Tumor Virus:
Identifizierung eines zelltypspezifischen Repressors**

Elisabeth Härtig

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

**Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Die gewebespezifische Genexpression in einem Organismus wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkription durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen DNS-Elementen vermittelt. Die Expression des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) erfolgt in Mäusen hauptsächlich in der Milchdrüse und wurde in dieser Arbeit als Beispiel von zelltypspezifischer Expression untersucht.

Die Analyse der Chromatinstruktur des MMTV in Mammaepithelzellen gegenüber Fibroblasten ergab keinen Hinweis, daß durch Veränderung der Chromatinstruktur die zelltypspezifische Expression des MMTV erreicht wird.

Für Sequenzen des MMTV LTR von Position -235 bis +122 bezüglich der Startstelle der Transkription konnte gezeigt werden, daß sie ausreichen, um zelltypspezifische Expression in Mammaepithelzellen zu vermitteln. Innerhalb dieser Sequenzen befinden sich Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CTF/NF1 und OTF-1. Die Beteiligung dieser Faktoren an der erhöhten Expression in Mammaepithelzellen war durch funktionelle Analyse von Punktmutanten gezeigt worden. Durch vergleichende *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien in Mammaepithelzellen und Fibroblasten wurden jedoch keine quantitativen und qualitativen Unterschiede der Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren CTF/NF1 und OTF-1 gefunden, die zu der zelltypspezifischen Expression des MMTV führen könnten.

In dieser Arbeit wurde durch die DNase I-Protektionsanalyse ein neuer Faktor Fp identifiziert, der als zelltypspezifischer Repressor die Expression des MMTV in Fibroblasten unterdrückt. Dieser Faktor Fp wird aufgrund seiner Bindungsspezifität und durch die Reaktion mit einem ets-spezifischen Antikörper zu der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren gezählt. Interessanterweise wurde dieser Faktor Fp auch in Mammaepithelzellen gefunden, so daß die Regulation des MMTV nicht durch die zelltypspezifische Expression des Repressors erfolgt.

Abstract

Expression of the mouse mammary tumor virus: identification of a cell-type specific repressor

Tissue specific gene expression in an organism is mainly regulated on the level of transcription. This occurs primarily through the interaction of specific transcription factors with regulatory elements on genes expressed in a cell-type specific manner. The mouse mammary tumor virus (MMTV) is expressed specifically in the mammary gland and was used in this work as a model for mammary epithelial cell-type specific gene expression.

Analyses of the chromatin structure of MMTV in mouse mammary epithelial cells and in fibroblasts, did not provide any evidence that the mammary epithelial cell-type specific expression of MMTV occurs as a result of changes in chromatin structure.

Sequences on the MMTV long terminal repeat region (LTR) between positions -235 to +122 with respect to the startpoint of transcription were however shown to be sufficient for the mammary epithelial cell-type specific expression of the viral DNA. These sequences contain binding sites for the transcription factors CTF/NF1 and OTF-1. Functional analyses of point mutants in these binding sites showed that they are responsible for the elevated expression of MMTV in mammary epithelial cells.

Additionally a new factor termed Fp was identified by DNase-I protection assay. This factor functions as a cell-type specific repressor to downregulate the expression of the MMTV in fibroblasts. From the DNA binding specificity of this protein and its recognition by an Ets-specific antibody, it was shown that it belongs to the Ets-family of transcription factors. Surprisingly the Fp protein was also found in mammary epithelial cells, indicating that its interaction with other factors rather than its mere presence in cells determine its role in the cell-type specific expression of MMTV.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
Einleitung	1
1. Gewebespezifische Expression durch Regulation der Transkription	1
2. Die Milchdrüse als Beispiel für gewebespezifische Genregulation	4
3. Der Maus Mamma Tumor Virus als Modell für gewebespezifische Gen- expression in der Milchdrüse	5
4. Zielsetzung	7
Materialien	8
1. Bezugsquellen der Chemikalien und Arbeitsmittel	8
2. Radiochemikalien	10
3. Bakterien und Zellen	10
4. Antikörper	11
5. Kulturmedien	11
6. Plasmidkonstrukte	12
7. Oligonukleotide und Primer	12
7.1. Primer für die PCR-Mutagenese und Sequenzierung	13
7.2. Oligonukleotide für die Gelretardationsanalyse:	13
7.3. Primer für die genomische "footprint"-Analyse	15
Methoden	16
1. Allgemeine Arbeitsmethoden	16
1.1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	16
1.2. Extraktion von Nukleinsäuren	16
1.3. Fällung von Nukleinsäuren	16
1.4. Auftrennung von DNS-Fragmenten durch Gelelektrophorese	17
1.4.1. Agarosegel	17
1.4.2. Polyacrylamidgel	17

1.4.3.	Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen	18
1.4.4.	Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970).....	18
1.5.	Isolierung von DNS -Fragmenten.....	19
1.5.1.	aus Agarosegelen.....	19
1.5.2.	aus Polyacrylamidgelen.....	19
1.6.	Reinigung von Oligonukleotiden.....	19
1.7.	Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden	20
1.7.1	Kinasierung von Oligonukleotiden	20
1.7.2.	Auffüllen von 5' Überhängen mit α - ³² P-dNTPs	20
1.8.	Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1983)	21
1.9.	Präparation von Plasmid-DNS aus rekombinanten Bakterien	21
1.9.1.	Präparation im kleinen Maßstab	21
1.9.2.	Präparation im großen Maßstab	22
1.10.	Präparation von Zellkernextrakten.....	22
1.10.1.	Für große Mengen an Zellextrakt aus konfluenten Zellen	22
1.10.2.	Für Kernextrakte aus verschiedenen Zelldichten (nach Dignam et al., 1983).....	23
1.11.	Sequenzierung doppelsträngiger DNS	24
1.11.1.	Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977).....	24
1.11.2.	Sequenzierung von DNS durch basenspezifische Spaltung (Maxam und Gilbert, 1980)	25
2.	DNS Klonierungstechniken	26
2.1.	Fragmentierung von DNS durch Restriktionsendonukleasen	26
2.2.	Ligation von DNS -Fragmenten.....	26
2.3.	Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Ho et al., 1989)	26
3.	Zellkultur	28
3.1.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
3.2.	Trypsinbehandlung.....	28
3.3.	Stabile Transfektion	29
4.	Analytische Methoden.....	29
4.1.	Bestimmung der CAT-Aktivität ("CAT-Assay")(Gorman et al., 1982).....	29

4.1.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	29
4.1.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry et al., 1951).....	30
4.1.3.	CAT-Aktivitätsbestimmung.....	30
4.2.	Gelretardations-Analyse.....	31
4.3.	Methylierungsinterferenz-Analyse.....	31
4.4.	"UV-Crosslink"-Analyse.....	32
4.5.	Bindungsanalyse mit Hilfe der DNase I-Protektion ("DNase I-footprint").....	33
4.5.1.	Einseitige radioaktive Markierung eines DNS-Fragments.....	33
4.5.2.	DNase I-Protektionsanalyse.....	34
4.6.	<i>In vivo</i> Dimethylsulfat-"footprint" durch ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion (Mueller und Wold, 1989).....	34
4.6.1.	<i>In vivo</i> Methylierung von DNS durch Dimethylsulfat (DMS) in lebenden Zellen und Präparation genomischer DNS.....	34
4.6.2.	<i>In vitro</i> Methylierung genomischer DNS (nach Maxam und Gilbert, 1980).....	35
4.6.3.	Piperidinspaltung der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> methylierten genomischen DNS (Maxam und Gilbert, 1980).....	35
4.6.4.	Amplifikation und radioaktive Markierung der Piperidinspaltprodukte.....	35
4.6.4.1.	Erststrangsynthese.....	35
4.6.4.2.	Ligation des Linkers.....	36
4.6.4.3.	Die Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction") und radioaktive Markierung.....	36
4.7.	Hypersensitivität von chromatinverpackter DNS gegenüber DNase I und Restriktionsendonukleasen.....	37
4.7.1.	Präparation der Zellkerne.....	37
4.7.2.	Restriktionsverdau der Kerne.....	38
4.7.3.	DNase I-Verdau der Kerne.....	38
4.7.4.	Analyse der genomischen DNS und "Southern-Transfer".....	38
4.7.5.	Hybridisierung.....	39
4.8.	Feststellung der Kopienzahl in stabil transfizierten Einzelklonen.....	40

Ergebnisse	42
1. Sequenzen des MMTV von -235 bis +122 sind in der Lage zelltypspezifische Genexpression zu vermitteln	43
2. An der Regulation der zelltypspezifischen Expression sind mehrere Proteine beteiligt	45
2.1. <i>In vitro</i> Bindungsstudien	46
2.1.1. Gelretardations-Analyse mit den Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren OTF-1 und CTF/NF1	46
2.1.2. "UV-Crosslink"-Analyse mit dem NF1-Oligonukleotid	50
2.1.3. DNase I-Protektionanalyse	52
2.2. <i>In vivo</i> Bindungsstudien	57
2.2.1. Genomische "footprint"-Analyse der Sequenzen von -245 bis +122 des MMTV LTR	57
2.2.2. Die Chromatinverpackung des MMTV LTR läßt Bindung von Transkriptionsfaktoren im Bereich des HRE zu	69
3. Charakterisierung des Repressors	76
3.1. Der neue Faktor Fp bindet spezifisch an die Sequenzen von -151 bis -164 des MMTV LTR	76
3.2. Die Mutante des Fp-Oligonukleotids ist nicht mehr in der Lage die Fp-Proteine zu binden	81
3.3. Funktionelle Analyse der Mutation der Fp-Bindungsstelle im Kontext des MMTV HRE	82
3.4. Der Faktor Fp ist ein Mitglied der ets-Familie der Transkriptionsfaktoren	86
Diskussion	94
1. Positive und negative Regulationsmechanismen der zelltypspezifischen Expression des MMTV	94
2. Die Rolle der Transkriptionsfaktoren NF1 und OTF1 bei der zelltypspezifischen Genregulation des MMTV	95
3. Mögliche Mechanismen der zelltypspezifischen Repression durch den Faktor FP	96
Literaturverzeichnis	102

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
Dex	Dexamethason
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRE	"hormon response element"
HSV	Herpes Simplex Virus
K-Mes	K-Morpholin-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm

min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PBS	"Phosphate Buffered Salin"
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	" sodium dodecylsulfate" (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STB	Standarttransformationspuffer
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymin
t-RNA	transfer-RNA
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TBE	Tris/ Borsäure/ EDTA
TE	Tris/ EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

Einleitung

Vielzellige Organismen bestehen aus einer großen Zahl unterschiedlicher Zelltypen, die verschiedene biologische Funktionen erfüllen. Diese reichen von der Antikörperproduktion der B-Lymphozyten, der Produktion von Insulin in den Langerhansschen Zellen der Bauchspeicheldrüse, der Synthese von Albumin in der Leber, bis zu der Produktion des Milchproteins β -Casein in den Epithelzellen der Milchdrüse, um nur einige Beispiele zu nennen. Diese unterschiedlichen Funktionen werden durch spezielle Proteine ausgeführt. Die Information für diese Proteine ist in dem genetischen Material der Zellen verschlüsselt. Da jedoch jede Zelle in einem Organismus die gleiche genetische Information enthält, müssen Mechanismen bestehen, die die Expression der Gene, die charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp sind, regulieren. Die Aufklärung dieser Mechanismen stellt eine der Aufgaben der molekularen Genetik dar.

1. Gewebespezifische Expression durch Regulation der Transkription

Prinzipiell findet Genregulation in der Zelle auf vielen verschiedenen Ebenen statt. Zum Beispiel, bei der Initiation, Elongation und Termination der Transkription, durch DNS-Methylierung, auf der Ebene der mRNA Stabilität, durch differentielles Spleißen und auf der Ebene der Translationseffizienz. Der wichtigste Angriffspunkt für die Regulation der gewebespezifischen Genexpression ist die Aktivierung der Transkription (Darnell, 1982).

Viele grundlegenden Erkenntnisse über die Regulation der Transkription wurden durch die Untersuchung der regulatorischen Sequenzen von Viren erhalten. Da sie in ihrer Entwicklung und Vermehrung von zellulären Komponenten abhängig sind und ein Genom geringer Komplexität besitzen, bieten sie sich als Modellsystem zur Untersuchung zellulärer Mechanismen an. Die am besten untersuchten Beispiele sind der Promotor des Thymidinkinase Gens des Herpes-Simplex-Virus (HSV) und der Enhancer des Simian-Virus 40 (SV 40) (Übersichtsartikel Jones et al., 1988). Nach diesen Untersuchungen kann man zwei Typen von regulatorischen Sequenzbereichen unterscheiden. Zum einen die Promotoren, die sich im 5' nicht-translatierten Bereich eines Gens in direkter Nachbarschaft der Startstelle der Transkription befinden und zum anderen die Enhancer bzw. die Silencer,

die sich mehrere hundert Basenpaare entfernt von der Transkriptionsstartstelle befinden können.

Charakteristisch für die meisten Promotoren ist eine AT-reiche Region, die sogenannte TATA-Box, die sich ca. 30 bp entfernt 5' von der Startstelle der Transkription befindet. An diese Sequenz bindet der Initiationsfaktor TFIID, der die Bindung der RNA-Polymerase und der anderen Initiationsfaktoren (TFIIA, -B, -E, -H, -G und -F) ermöglicht (Conaway et al., 1991). Von diesem Initiationskomplex geht eine basale Transkription aus. Zusätzliche Sequenzmotive im Promotorbereich binden spezifisch Proteine, die als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Diese spezifisch bindenden Proteine können, durch bislang noch nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen die Transkriptionsrate der Gene beeinflussen (Mitchell und Tjian, 1989). Charakteristisch für Enhancer und Silencer ist, daß sie über große Entfernungen hinweg und unabhängig von ihrer Orientierung die Transkriptionsrate eines Gens beeinflussen können (Serfling et al., 1985). Enhancer sind in der Lage die Transkriptionsrate eines Gens zu verstärken, wohingegen Silencer die Transkription unterdrücken.

Die Promotorsequenzen und die Enhancer bestehen aus einer Vielzahl von Sequenzmodulen, die als Erkennungssequenzen für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren dienen. Die Transkriptionsrate eines Gens wird folglich modular durch das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren und dem Initiationskomplex bestimmt. Für dieses Zusammenspiel gibt es verschiedene Möglichkeiten. Innerhalb der Promotoren können direkte Protein/Protein-Wechselwirkungen auftreten. Manche Transkriptionsfaktoren benötigen einen zusätzlichen Coaktivator, der selbst nicht an die DNS bindet und über Protein/Protein-Interaktion die Aktivierung bewirkt (Ptashne, 1986 und 1988; Dynlacht et al., 1991). Enhancer und Silencer müssen über große Distanzen hinweg die Transkriptionsrate eines Promotors beeinflussen. Hierzu wird eine Schleifenbildung der DNS vorgeschlagen, die weiter entfernte Faktoren der Enhancer bzw. der Silencer, mit den Proteinen der Promotorregion in Kontakt bringt (Übersichtsartikel Dynan, 1989). Ein weiterer wichtiger Aspekt der Regulation der Transkription ist die Chromatinstruktur der Gene. Die DNS liegt im Zellkern mit basischen Proteinen, den Histonen, assoziiert vor. Um die Bindung von Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen, muß diese Chromatinstruktur aufgelockert sein (Übersichtsartikel: Kornberg und Lorch 1991).

Wie kommt es jedoch letztendlich zu einer zelltypspezifischen Genregulation? Ein Großteil der bis heute bekannten Transkriptionsfaktoren kommt in vielen Zelltypen vor. Es sind nur wenige Beispiele bekannt bei denen die Gewebespezifität durch einen einzelnen, zelltypspezifischen Transkriptionsfaktor vermittelt wird. Beispiele hierfür sind die Transkriptionsfaktoren OTF-2A und OTF-2B, die nur in B- Lymphocyten vorkommen und dort für die zelltypspezifische Expression der Schwere Kette der Immunglobulingene verantwortlich sind (Müller et al., 1988). In der Leber ist die gewebespezifische Genexpression einiger Gene von dem nur dort vorkommenden Transkriptionsfaktor HNF-1 abhängig. Dieser Faktor reicht aus, um leberspezifische Genexpression zu vermitteln (Kugler et al., 1988; Lichtensteiner und Schibler, 1989). Die Expression einiger muskelspezifischer Gene ist an das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors Myo D gebunden. Myo D ist in der Lage ein muskelspezifisches Differenzierungsprogramm in undifferenzierten Fibroblasten zu induzieren (Weintraub et al., 1991). Die gewebespezifische Expression kann jedoch auch durch das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Die leberspezifische Aktivierung eines Promotors des Hepatitis B Virus wird zum Beispiel erst durch das Zusammenspiel des leberspezifischen Transkriptionsfaktors HNF-1 und des ubiquitär verbreiteten Transkriptionsfaktor OTF-1 erreicht (Zhou und Yen, 1991). Der Transkriptionsfaktor NF1, der zuerst als Replikationsfaktor aus Adenovirus infizierten Hela-Zellen isoliert wurde (Rosenfeld und Kelly, 1986; Jones et al., 1987), ist in vielen Fällen an der Regulation gewebespezifischer Genexpression beteiligt. NF1 gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die alle an dieselbe Bindungssequenz binden und in allen Zelltypen gefunden wurden (Borgmeyer et al., 1984; Santoro et al., 1988). Beispiele für die Beteiligung von NF1 an gewebespezifischer Expression sind die Expression des Lipidträgerproteins aP2 in Adipocyten (Graves et al., 1991) und die Expression des menschlichen Papillomavirus Typ 16 in Epithelzellen (Abt et al., 1993). Aus diesen Beispielen wird ersichtlich, daß es für die Regulation der zelltypspezifischen Expression von Genen kein einheitlicher Mechanismus existiert. Um die einzelnen Regulationsmechanismen aufzuklären, ist es daher nötig die beteiligten Transkriptionsfaktoren zu identifizieren und charakterisieren.

2. Die Milchdrüse als Beispiel für gewebespezifische Genregulation

Die Funktion der Milchdrüse besteht in der Produktion und Sekretion der Muttermilch. Diese besteht aus einer Suspension von Proteinen, Fetten, Kohlenhydraten, Vitaminen, Salzen, Immunglobulinen und geringe Mengen anderer Substanzen. Die Hauptanteile der Proteine, Fette und Kohlenhydrate werden durch die Epithelzellen der Milchdrüse hergestellt. Diese Synthese ist spezifisch für dieses Gewebe. Den Hauptteil der spezifischen Proteine machen die verschiedenen Caseine, das α -Lactalbumin, das β -Lactoglobulin und bei den Nagetieren das saure Molkeprotein WAP ("whey acidic protein") aus (Pitelka 1989).

Die Milchdrüse bietet eine einzigartige Möglichkeit zum Studium gewebe- und stadienspezifischer Genexpression, da sie auch nach der Geburt bis zur Erlangung der Geschlechtsreife und während der Schwangerschaft Veränderungen der räumlichen Struktur und der funktionellen Differenzierung durchläuft. Während der Embryonalentwicklung ist die Milchdrüse ein wenig verzweigtes Kanalsystem aus Epithelzellen, das in einen Fettkörper eingelagert ist. Unter dem Einfluß von Östrogen und Wachstumshormon vergrößert sich die Milchdrüse bei Erreichen der Geschlechtsreife. Die eigentliche Differenzierung erfolgt jedoch erst in der Schwangerschaft unter dem Einfluß der Hormone Prolaktin und Hydrocortison (Topper und Freeman, 1980). Die Milchgänge verzweigen sich verstärkt und die Endstücke erweitern sich zu Alveoli. Während der Lactation werden in den Epithelzellen die Bestandteile der Milch gebildet.

Die Expression der Milchproteingene wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert. Die Regulation erfolgt hierbei stadienspezifisch durch die Hormone Prolaktin und Glukokortikoid, aber auch durch gewebespezifische Faktoren. Denn, obwohl auch in der Leber die Rezeptoren für die Glukokortikoide und für Prolaktin vorhanden sind, findet die Expression der Milchproteine nur in der Milchdrüse statt. Dies spricht für ein Zusammenspiel der laktogenen Hormone und mammazellspezifischer Faktoren bei der Expression der Milchproteine.

Die für die Regulation der Transkription notwendigen Sequenzen konnten bei dem WAP Gen auf 2500 Basenpaare eingegrenzt werden (Andres et al., 1987). Beim β -Casein Gen wurden die für die gewebespezifische und hormonelle Regulation notwendigen Sequenzen auf einen Bereich von 338 Basenpaare eingegrenzt (Doppler et al., 1989). Innerhalb dieser Sequenz konnte die Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor lokalisiert werden, der für die hormonvermittelte Genexpression des β -Casein Gens benötigt wird und nur in

Mammagewebe vorkommt (Schmitt-Ney et al., 1991). Es ist bislang bei der Untersuchung der Promotoren der Milchproteine nicht gelungen, zwischen den Mechanismen der hormonvermittelten und der gewebespezifischen Regulation zu unterscheiden

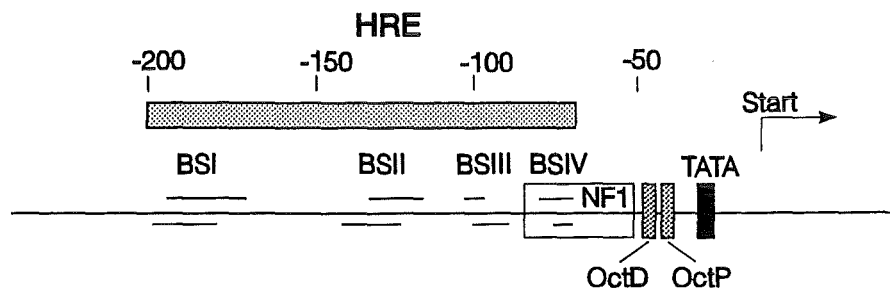
3. Der Maus Mamma Tumor Virus als Modell für gewebespezifische Genexpression in der Milchdrüse

Ein anderes System zur Untersuchung der mammaspezifischen Genexpression ist der Maus Mamma Tumor Virus (MMTV), der in der Maus als integrierter Provirus, wie die endogenen Milchproteingene, hauptsächlich in der Milchdrüse exprimiert wird. Geringe Expression wurde auch in der Speicheldrüse oder im Hoden gefunden (Henrard und Ross, 1988). Die regulatorische Sequenz des MMTV, das LTR ("long terminal repeat"), ist mit 1328 bp im Vergleich zu zellulären Genen relativ kurz, was die Erforschung der Zelltypspezifität erleichtert (Donehower et al., 1981). Durch Experimente mit transgenen Tieren konnte gezeigt werden, daß das MMTV LTR ausreicht sowohl die gewebespezifische als auch die entwicklungspezifische Expression auf andere Gene zu übertragen (Ross und Solter, 1985). Ein weiterer Vorteil des MMTV Modells ist, daß die Chromatinstruktur des MMTV bereits charakterisiert wurde (Cordingley et al., 1987, Pina et al., 1990, Bresnick et al., 1991). Es bietet sich dadurch die Möglichkeit die Organisation des Chromatins bei der Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren zu studieren und somit der *in vivo* Situation der Regulation in der Zelle näher zu kommen.

Der MMTV gehört in die Familie der Retroviren und ist an der Ausbildung von Mammakarzinomen in den Epithelzellen der Maus beteiligt (Bittner 1936; Nandi und McGrath, 1973). Der Virus wird als endogener Provirus vertikal über die Keimbahn (Varmus et al., 1972; Cohen und Varmus, 1980; Groner und Hynes, 1980) oder horizontal mit der Muttermilch von der Mutter zum Säugling weitergegeben (Bentvelzen 1974). Die MMTV Expression steigt während der Schwangerschaft unter dem Einfluß der laktogenen Hormone auf ein vielfaches an und bleibt während der Geburt und der Lactation auf diesem Niveau (Munos und Bolander, 1989). Die hohe Expression des Virus in der Milchdrüse führt zur Reintegration des Virus in das zelluläre Genom. Die zufällige Integration des Provirus in der Nachbarschaft der zellulären "wnt"- Onkogene führt zur Überexpression dieser Proto-Onkogene und zur Bildung von Mammakarzinomen (Nusse und Varmus, 1982; Dickerson et al., 1984; Moore et al., 1986; Nusse, 1986).

Das MMTV LTR enthält verschiedene regulatorische Elemente. Durch fortschreitende 5'-Deletion des MMTV LTR konnte die Bedeutung der einzelnen Sequenzelemente des LTR für die Expression in Mammazellen gezeigt werden (Mink et al., 1990). Zwischen Position -1094 und -739 befindet sich ein Enhancer, der an der zelltypspezifischen Expression des Virus beteiligt ist. Innerhalb dieser ca. 350 bp befindet sich die Bindungsstelle eines neu charakterisierten mammazellspezifisch aktivierender Faktor, MAF, der zusammen mit einem Transkriptionsfaktor der CTF/NF1-Familie für die gewebespezifische Expression verantwortlich ist (Mink et al., 1992). Aufgrund von Protein/DNA-Bindungsstudien wird der Faktor MAF zur ets-Familie der Transkriptionsfaktoren gezählt (Huck 1993). Zwischen Position -631 bis -560 und Position -428 und -364 wurden Sequenzmodule charakterisiert, die für eine negative Regulation des Virus verantwortlich sind (Morley, 1987; Mink et al., 1990). Das jedoch am Besten untersuchte Element des MMTV LTR ist das auf Hormone reagierende Element, HRE ("hormone response element"), das zwischen Position -202 und -59 stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription liegt (Hynes et al., 1983; Ponta et al., 1985; Cato et al., 1987). Interessanterweise zeigt auch ein Genkonstrukt, bei dem die regulatorischen Sequenzen bis Position -235 entfernt wurden, noch eine erhöhte Expression in Mammazellen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß auch Sequenzen des HRE an der zelltypspezifischen Expression des MMTV beteiligt sind. Erst eine weitere Verkürzung der regulatorischen Sequenzen bis Position -79 verhindert eine weitere Expression in Mammazellen.

Das HRE beinhaltet vier Bindungsstellen für den Glukokortikoid- bzw. den Progesteronrezeptor (Scheidereit et al., 1983, Payar et al., 1983, von der Ahe et al., 1985). Über diese Bindungsstellen wirkt während der Schwangerschaft das Progesteron und nach der Geburt das Hydrocortison aktivierend auf die Expression des MMTV ein. Diese Bindungsstellen können ebenfalls die Wirkung von Androgen und Mineralokortikoid vermitteln (Cato et al., 1986 und 1987). Neben den Rezeptorbindungsstellen befindet sich bei Position -79 bis -58 eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor der CTF/NF1-Familie (Miksicek et al., 1987; Cato et al., 1988). Diese Bindungsstelle überlappt teilweise mit der proximalen Hormonrezeptorbindungsstelle. Zwischen Position -56 und -49 und Position -44 und -37 befinden sich zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor OTF-1, die distale und proximale Octamer-Sequenz (OctD und Oct P) (Brüggemeier et al., 1991). Das folgende Schema gibt einen Überblick über das HRE und die verschiedenen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren, die sich im MMTV LTR zwischen Position -235 bis +122 befinden.



Schematische Darstellung des HRE und der verschiedenen Bindungsstellen. Die dünnen Linien zeigen die Bindungsstellen der Hormonrezeptoren (BSI-BSIV). Die unterschiedlich schraffierten Kästchen stehen für die Bindungsstellen für NF1, OTF-1 (OctD und OctP) und die TATA-Box. Der Pfeil bezeichnet die Startstelle der Transkription.

Punktmutationen im Bereich der NF1- bzw. OTF-1 Bindungsstellen verringern die Expression, was auf eine Beteiligung dieser Faktoren an der Expression des MMTV in Mammazellen hinweist (Nierlich, 1989; Härtig et al., 1993). Diese erhöhte Expression in Mammazellen findet jedoch nur in Zellen hoher Dichte statt, die direkten Zell/Zell-Kontakt haben. Kultiviert man die Zellen bei niedriger Zelldichte, so findet man keine erhöhte MMTV Expression. Der Zustand niedriger Zelldichte ist sicherlich artifiziell, da dieser im Organismus nicht vorkommt. Dieses Ergebnis gibt jedoch einen Hinweis auf den regulatorischen Einfluß des direkten Zell/Zell-Kontaktes und bietet die Möglichkeit, im Experiment Unterschiede im Bezug auf die Regulation der Expression herauszuarbeiten.

4. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Beteiligung der Sequenzen von -235 bis +122 im Bezug auf die Startstelle der Transkription an der zelltypspezifischen Expression des MMTV untersucht werden. Ziel war es, Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren zu lokalisieren die an dieser Regulation beteiligt sind, sie zu charakterisieren und daraus den Mechanismus der Regulation abzuleiten. Damit sollten die Voraussetzungen für die Aufreinigung der Proteine und der Klonierung der entsprechenden Gene geschaffen werden.

Materialien

1. Bezugsquellen der Chemikalien und Arbeitsmittel

Acetyl Coenzym A, Li-Salz	Pharmacia, Freiburg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten (9cm)	Greiner, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
DEAE-Membran, NA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dexamethason	Sigma, München
Dialyseschläuche	Bender & Hobein, Karlsruhe
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dithiotreitol	BRL, Neu-Isenburg
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Schwalbach
DNase I	Sigma, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt

G418	Gibco, Karlsruhe
Glycerin	BRL, Neu-Isenburg
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Bio-Rad, München
HEPES	Sigma, München
Hybond N ⁺	Amersham, Braunschweig
Hydrazin	Fluka, Neu-Ulm
Kieselgel-DC Platten	Machery und Nagel, Düren
Lachsspermien-DNA, Typ III	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
NACS-Prepac Säulen	BRL, Neu-Isenburg
N-Broth	Difco Laboratories, Detroit
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio Rad, München
Nonidet P-40	Bio Rad, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Piperidin	Fluka, Neu-Ulm
PMSF	Serva, Heidelberg
Poly dI/dC	Pharmacia, Freiburg
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Proteaseinhibitoren	Sigma, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Quiagen Tip-500 Säulen	Diagen, Düsseldorf
Quickzint	Zinsser, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach Promega-Biotec, Heidelberg Boehringer, Mannheim BRL Inc., Neu-Isenburg Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilme (HyperfilmMP)	Amersham, Braunschweig
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G-50	Pharmacia, Freiburg
Sequenase-Kit	United Biochemical Cooperation
Taq-Polymerase	Amersham, Braunschweig
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

TEMED	Bio-Rad, München
T4 Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Schwalbach
transfer-RNA (aus Kalbsleber)	Boehringer, Mannheim
Transformations-Chemikalien	Fluka, Buchs Schweiz
Tris HCl, Tris Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Bio Rad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Whatman 3MM Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen

Alle übrigen Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von der Fa. Roth, Karlsruhe bezogen.

2. Radiochemikalien

D-Treo-(dichloroacetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (7.4 MBq/ml)
 γ -³²P-ATP (10 mCi/ml; >5000 Ci/mmol)
 α -³²P-CTP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol)
L-³⁵S-Methionin (370 MBq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Fa. Amersham, Braunschweig bezogen.

3. Bakterien und Zellen

E.coli DH5 α	F ⁻ , L ⁻ , recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁻), supE44, thi-1, gyrA96, rel A1
NIH 3T3	Embryonale Mausfibroblasten ; entsprechend den 3T3 Zellen der American Type Culture Collection Erhalten von P.Gruss, Heidelberg
GR	Mammacarcinom Zelllinie aus GR-Mäusen Erhalten von N. Sarkar, Augusta, Georgia (Ringold et al., 1975)
MNUMG	nicht tumorigene Mammaepithelzelllinie (Owens et al., 1974)

4. Antikörper

Pan-ets:

Dieser Antikörper ist gegen die hoch konservierte Aminosäuresequenz FKLSDPDEVARRW der DNS- Bindedomäne der ets- Transkriptionsfaktoren gerichtet (Yoganathan et al., 1992). Erhalten von N. K. Bhat, Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, Frederick, U.S.A.

LET 126:

Dieser Antikörper ist gegen die aminoternale Aminosäuresequenz des Progesteronrezeptors gerichtet. Erhalten von E. Milgrom, Paris.

5. Kulturmedien

Kulturmedium für Bakterien:

L-Broth: 0,5 % Bacto-Hefe-Extrakt, 1 % Bacto-Trypton, 1 % NaCl

Selektivmedium für Bakterien:

L-Broth mit 100 µg/ml Ampicillin

Selektivagar:

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

Kulturmedium für NIH 3T3-, NMuMG- und GR-Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin

6. Plasmidkonstrukte

- p LTR CAT 9:** Gesamter MMTV LTR von Position -1239 bis +125 von Virusisolaten aus GR-Mäusen vor dem CAT-Gen (Mink et al., 1990)
- pHCwt:** MMTV LTR von Position -235 bis +125 vor dem CAT-Gen (Cato und Weinmann, 1988)
- pHC110:** MMTV LTR von Position -235 bis +125 vor dem CAT-Gen. Enthält Mutation im Bereich der NF1-Bindungsstelle, die Bindungssequenz wurde durch eine ClaI-Schnittstelle (ATCGAT) ersetzt (Plasmid erhalten von Dr. A. C. B. Cato)
- pHCmFp:** MMTV LTR von Position -235 bis +125 vor dem CAT-Gen. Enthält Mutation im Bereich des Repressors Fp, die Bindungssequenz wurde durch eine BstEII-Schnittstelle (GTTACC) ersetzt.
Als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 640 bp langes Pvu II/Pvu II- Fragment aus dem Plasmid pHCwt verwendet. Als Primer wurden der Sequenzierungsprimer M13 (Messing et al. 1981) und der CAT Primer verwendet (Alton und Vapnek, 1977). Zur Mutagenese wurden die Einzelstränge des Oligonukleotids mFp benutzt. Das Produkt der PCR-Mutagenese wurde eluiert und mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI verdaut. Dieses Fragment wurde dann in ein ebenfalls Hind III und Bam HI verdautes Plasmid pHCwt kloniert. Die Sequenz des neuen Plasmids wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft.

7. Oligonukleotide und Primer

Die Oligonukleotide und Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bzw. der Firma TIB Molbiol, Berlin als Einzelstränge bestellt. Die Einzelstränge wurden durch Gelelektrophorese gereinigt und für die Gelretardationsanalyse zu Doppelsträngen hybridisiert.

7.1. Primer für die PCR-Mutagenese und Sequenzierung

M 13 5' CAGCACTGACCCTTTTG '3

(Messing et al. 1981)

CAT Primer 5' AGGAGCTAAGGAAGCTAAAA '3

(Alton und Vapnek, 1977)

7.2. Oligonukleotide für die Gelretardationsanalyse:

Es werden jeweils der Name und die Herkunft der Sequenz. Die Wildtypsequenzen sind im Gegensatz zu den Linkersequenzen fett gedruckt. Eingeführte Mutationen werden durch unterstrichene Basen gekennzeichnet. Die MMTV Sequenzen wurden nach Fasel et al. (1982) abgeleitet.

NF1, MMTV LTR, -78/-59

5' AGCTTTTGGAACTATCCAAGTC '3
3' AAACCTTAGATAGGTTTCAGCCTAG '5

OCTP, MMTV LTR, -35/-45

5' AGCTTATGTAAACCAG '3
3' ATACATTTGGTCCTAG '5

OCTD, MMTV LTR, -47/-57

5' AGCTTATGTAAATGCG '3
3' ATACATTTACGCCTAG '5

Sp1, erhalten von Dr. I. Baumann

5' GATCGATCGGGGCGGGGCGATC '3
3' CTAGCCCCGCCCCGCTAGCTAG '5

F7, MMTV LTR, -1008/-999

```

5' AGCTTGGGAAGTTGCG      ' 3
3'   ACCCTTCAACGCCTAG    ' 5

```

Fp, MMTV LTR, -169/-145

```

5' AGCTTAAAACAAGGATGTGAGACAAGTGG      ' 3
3'   ATTTTGTTCTTACACTCTGTTACCTAG     ' 5

```

mFp, MMTV LTR, -175/-145

```

5' GTTCTTAAAACGGTTACCTGAGACAAGTG      ' 3
3' CAAGAATTTTGCCAATGGACTCTGTTTAC     ' 5

```

NF-AT, Interleukin-2 Enhancer (Thompson et al., 1991)

```

5' AGCTTGAAAGGAGGAAAACTGTTTCATG      ' 3
3'   ACTTTCCTCCTTTTTGACAAAGTACCTAG   ' 5

```

TCR α , T-Zellrezeptor α Enhancer (Ho et al., 1990)

```

5' AGCTTTTCCAGAGGATGTGGCTTCTGCGG      ' 3
3'   AAAGGTCTCCTACACCGAAGACGCCCTAG   ' 5

```

PEA3, Polyoma Virus Enhancer (Wasylyk et al., 1990)

```

5' AGCTTTTAAGCAGGAAGTGAATAACTGAG      ' 3
3'   AAATTGCTCCTTCACTGATTGACTCCTAG    ' 5

```

F3, MMTV LTR, -1046/-1018

```

5' AGCTTCAAACCTTGGCATAGCTCTGCTTTGCCTG      ' 3
3'   AGTTTGAACCGTATCGAGACGAAACGGACCTAG ' 5

```

7.3. Primer für die genomische "footprint"-Analyse

Für die Position der Primer siehe Abb. 8, S.59 in dieser Arbeit.

Primer U1: 5' GATTAAGTTGGGTAACGCCAGG '3
Primer U2: 5' TAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC '3
Primer U3: 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCAAGACGTTGTAA '3

Primer O1: 5' TGAAAATCTCGCCAAGCTCCTC '3
Primer O2: 5' AAGTCCTCGAGATCTGCAGGTCGA '3
Primer O3: 5' AAGTCCTCGAGATCTGCAGGTCGACCGA '3

Langes Linker-

Oligonukleotid: 5' GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC '3
(Mueller und Wold, 1989)

Kurzes Linker-

oligonukleotid: 5' GGAATTCAGATC '3
(Mueller und Wold, 1989)

Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Arbeitsprotokolle den Methodensammlungen von Sambrook et al. (1982) und Ausubel et al. (1991) entnommen.

1. Allgemeine Arbeitsmethoden

1.1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine $OD_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNS oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNS oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide. Die OD bei 280 nm ist ein Maß für die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen, da die aromatischen Aminosäuren in diesem Bereich absorbieren. Die OD_{280} sollte höchstens 70 % der OD_{260} betragen.

1.2. Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zu einem Volumen nukleinsäurehaltiger Lösung wurde das gleiche Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) gegeben, kräftig gemischt und kurz abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde noch einmal mit dem gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.

1.3. Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,2 M gebracht und mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol gemischt.

Das Präzipitat wurde nach 30 minütiger Inkubation bei -20°C für 20 Minuten bei 10000xg abzentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend unter Vakuum getrocknet.

1.4. Auftrennung von DNS-Fragmenten durch Gelelektrophorese

1.4.1. Agarosegel

0,8-2 % Agarose Typ II wurde in 50 μl 0,5 x TBE (45 mM Tris; 45 mM Borsäure; 1,25 mM EDTA pH 8,3) durch Kochen geschmolzen und nach Zugabe von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in eine horizontale Elektrophoresekammer (7,5x13,5 cm) gegossen. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart. Die DNS-Proben wurden in 1x Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0; 10 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen. Das Gel wurde mit Laufpuffer (0,5x TBE) überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 30-40 mA und 50-150 V. Die Fragmente wurden über einem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und fotografiert.

1.4.2. Polyacrylamidgel

6-10%ige Polyacrylamidgele wurden aus einer Stammlösung mit 30 Gewichts-% Acrylamid und 0,8 Gewichts-% N,N'-Methylenbisacrylamid mit 0,5x TBE hergestellt. Die Polymerisation erfolgt durch Zugabe von 1 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,1 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zwischen zwei durch 2 mm breite Abstandhalter getrennte Glasplatten (14x15 cm). Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Die DNS-Proben wurden in 1x Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0; 10 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte für ca. 1,5 h bei 150 V. Nach der Auftrennung wurden die Gele für 10 min in einer wäßrigen Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt, die DNS-Fragmente auf dem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und fotografiert.

1.4.3. Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen

Das getrocknete DNS-Pellet wurde in 3 μ l Sanger-Probenpuffer (98 % deionisiertes Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Xylenxyanol; 0,03 % Bromphenolblau) gelöst, 5 min bei 85°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und sofort auf ein Gel aufgetragen. Das Gel bestand aus 6 % Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8) und 8 M Harnstoff in 90 mM Tris-HCl pH 8,3; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA. 30 ml dieser Lösung wurden mit 0,1 % TEMED und 0,5 % Ammoniumperoxodisulfat zwischen zwei Glasplatten (20x40cm) mit 0,15 mm dicken Abstandhaltern polymerisiert. Das Gel wurde 30 min bei 1500 V vorlaufen gelassen, bevor die Proben aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 1500 V. Der Laufpuffer war 1x TBE (90 mM Tris-HCl pH 8,3; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA). Der Gellauf dauerte 1,5-4 h. Nach dem Lauf wurde eine Glasplatte abgehoben und das Gel auf ein Whatman Filterpapier aufgezogen. Das Gel wurde auf dem Filter mit einem Vacuumtrockner getrocknet und anschließend bei -80°C auf einem Amersham Hyperfilm MP exponiert.

1.4.4. Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970)

Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem 10 % Trenngel und einem 5 % Kammgel. Das Trenngel wurde aus 10 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung (30:0,8), 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 150 μ l 20 % SDS und 12,35 ml H₂O durch Zugabe von 250 μ l APS und 15 μ l TEMED zwischen zwei Glasplatten (14x15 cm) polymerisiert. Die Glasplatten wurden durch drei Abstandhalter (an den Seiten und unten) mit 1 mm Dicke getrennt und außen mit flüssiger 1%iger Agarose abgedichtet. Das Trenngel wird ca. 12 cm hoch gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation mit Iso-Propanol überschichtet. Das Iso-Propanol wird abgegossen und anschließend das Kammgel aus 2,55 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung (30:0,8), 3,75 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 75 μ l 20 % SDS; 8,7 ml H₂O; 75 μ l APS und 15 μ l TEMED auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt um Taschen für den Probenauftrag aus dem Gel auszusparen. Die Proteine wurden in Laemmli-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 12 % Glycerin; 0,001 % Bromphenolblau; 0,71 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen, für 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Der Gellauf erfolgte für ca. 3 h bei 35 mA mit 1x Laemmli-Laufpuffer (0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS).

1.5. Isolierung von DNS -Fragmenten

1.5.1. aus Agarosegelen

Die DNS-Fragmente wurden auf dem UV-Lichtkasten lokalisiert und mit einem Skalpell wurde ein Schnitt direkt unter die gewünschte DNS-Bande gesetzt. In diesen Schnitt wurde ein Stück DEAE-Membran eingesetzt und die Elektrophorese so lange fortgesetzt bis sich die DNS-Bande vollständig auf der Membran befand. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei 65° in 500 µl Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) inkubiert und dadurch die DNS von der Membran eluiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die isolierte DNS mit Ethanol ausgefällt.

1.5.2. aus Polyacrylamidgelen

Die DNS wurde auf dem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und das entsprechende Gelstück ausgeschnitten. Das Gelstück wurde zerkleinert und die DNS über Nacht bei 50°C in 0,2M NaCl in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5) eluiert. Die DNS-haltige Lösung wurde durch Zentrifugation über eine Quarzsandschicht von den Gelstücken abgetrennt und die DNS mit Ethanol ausgefällt.

1.6. Reinigung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden von verschiedenen Firmen getrocknet geliefert und in 100 µl H₂O aufgenommen. 2 µl hiervon wurden 1:1000 mit H₂O verdünnt und die Konzentration bestimmt. Jeweils 100 µg der Oligonukleotideinzelstränge wurden in 100 µl Sanger-Probenpuffer (98 % deionisiertes Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol) aufgenommen, 5 min bei 85°C denaturiert und in Eiswasser abgeschreckt. Die Oligonukleotideinzelstränge wurden nun über ein präparatives (400x200x1mm), denaturierendes 20 %iges Polyacrylamidgel (siehe 1.4.3.) aufgetrennt (Gellauf 3-4 h bei 1000 V; 1x TBE). Das Gel wurde nicht getrocknet. Nach Färbung für 10 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) wurde die oberste Bande als längstes Syntheseprodukt aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstück zerkleinert und die Einzelstränge über Nacht bei 37°C mit 1 ml H₂O aus den Gelstückchen eluiert. Zur

Hybridisierung wurden gleiche Mengen an komplementären Einzelsträngen in geringem Volumen H₂O zusammengegeben, 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend im Wasserbad für 3-4 h abgekühlt.

1.7. Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

1.7.1 Kinasierung von Oligonukleotiden

20 ng Oligonukleotid wurden mit 30 µCi γ -³²P-ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase in 20 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur radioaktiven Markierung von Primern für in vivo "footprint"-Analysen wurden 20 pmol einzelsträngiges Oligonukleotid mit 150 µCi γ -³²P-ATP und 20 U T4-Polynukleotidkinase in 30 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA für 1 h bei 37°C inkubiert.

Das markierte Oligonukleotid wurde über eine NACS Prepac Säule von den nicht eingebauten Radionukleotiden abgetrennt. Die Säule wurde mit 1 ml 1 M NaCl in TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) äquilibriert und 4x mit 1 ml 0,1 M NaCl in TE gewaschen bevor die Probe aufgetragen wurde. Die Probe wurde aufgetragen und langsam durchtropfen gelassen. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit 4x 1 ml 0,1 M NaCl in TE von der Säule gewaschen. Das markierte Oligonukleotid wurde mit 3x 100 µl 1 M NaCl in TE eluiert und nach Zugabe von 10 µg t-RNS mit Ethanol präzipitiert.

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

20 ng Oligonukleotid wurden mit 30 µCi eines α -³²P-dNTP in 20 µl 7 mM Tris-HCl pH 7,5; 7 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,2 mM dNTPS und 1U E.coli DNS-Polymerase I (Klenow-Fragment) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Aufarbeitung des markierten Oligonukleotids und die Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiv markierten Nukleotide erfolgte wie unter 1.7.1. beschrieben.

1.8. Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1983)

100 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton, 0.5 % Bacto-Hefe Extrakt, 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* Bakterien (DH5 α) angeimpft und unter Schütteln und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 wachsen gelassen. Die Kultur wurde 10 min in Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4°C mit 2000x g abzentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde vorsichtig in 20 ml Standardtransformationspuffer (STB: 100 mM KCl; 45 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂, 3 mM HA CoCl₃; 0,5 M K-MES pH 6,3; 15 % Glycerin) resuspendiert und 15-20 min auf Eis stehen gelassen. Die Bakterien wurden erneut 10 min bei 4°C mit 2000x g abzentrifugiert und auf Eis vorsichtig in 4 ml STB resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und in flüssigem N₂ eingefroren oder sofort zur Transformation verwendet.

Zu 200 μ l Aliquots kompetenter Zellen wurden 2 ng Plasmid-DNS bzw. 5 μ l Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 3 ml SOC-Medium (SOC = SOB + 20 mM Glukose) wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf ampicillinhaltige Agarplatten (100 μ g/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

1.9. Präparation von Plasmid-DNS aus rekombinanten Bakterien

1.9.1. Präparation im kleinen Maßstab

1 ml ÜN-Kultur wurden 10 min bei 5000xg abzentrifugiert, das Pellet in 100 μ l Lösung A (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 μ l Lösung B (0,2 N NaOH; 1 % SDS) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden 150 μ l Lösung C (3 M NaAcetat) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach erneuter Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Zellfragmente und die chromosomale DNS 10 min bei 4°C mit 10000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Ethanol für 5 min im Ethanol/Trockeneisbad die DNS ausgefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10000x g

wurde das Pellet in 200 µl Lösung D (0,1 M NaAcetat; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und erneut mit 500 µl Ethanol präzipitiert. Die gefällte DNS wurde abzentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl H₂O aufgenommen und jeweils 10 µl für einen Restriktionsverdau verwendet.

1.9.2. Präparation im großen Maßstab

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Säulenreinigung mit Quiagen-tips 500. Dazu wurden 200 ml rekombinante Bakterien über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur wurde 5 min bei 5000xg zentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 10 ml Puffer P1 (100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und nach sanftem Mischen weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2,55 M KAc, pH 4,8) und vorsichtigem Mischen der Lösungen wurde sofort für 30 min bei 4 °C und 16000xg zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Quiagen-tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100) equilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde auf die Säule gegeben und durchtropfen gelassen. Während dieser Zeit bindet die Plasmid-DNS an das Säulenmaterial. Anschließend wird die Säule mit 30 ml Puffer QC (1,0 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Ethanol) gewaschen. Die Plasmid-DNS wird mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8,2; 15 % Ethanol) von der Säule eluiert, mit 10,5 ml Iso-Propanol gefällt und sofort für 30 min bei 4 °C und 16000x g abzentrifugiert. Das DNS-Pellet wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNS wurde in ca. 300 µl H₂O resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

1.10. Präparation von Zellkernextrakten

1.10.1. Für große Mengen an Zellextrakt aus konfluenten Zellen

Die Zellen von 15 konfluenten 15 cm Gewebekulturschale wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 20 ml PBS (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) mit einem Gummispatel abgeschabt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden bei 3000 xg

abzentrifugiert und in 5 ml Lösung IV (0,3 M Saccharose; 10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM EGTA; 0,5 mM DTT; 5 % Glycerin; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml Antipain) aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl Nonidet P40 wurden die Zellen in einem Glashomogenisator mit Pistil A lysiert. Die Kerne wurden bei 8500 Upm für 10 min abzentrifugiert und zwei mal mit je 5 ml Lösung IV gewaschen. Die Kerne wurden dann zum Aufbrechen in 1 ml Lösung II (10 mM HEPES pH 7,9; 400 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM EGTA; 0,5 mM DTT; 5 % Glycerin; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml Antipain) resuspendiert und für 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Kernfragmente bei 50000 Upm bei 4°C für 1 h abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und 2 h gegen 200 ml Lösung III (20 mM HEPES pH 7,9; 1 mM EDTA; 75 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml Antipain) dialysiert. Der Dialysepuffer wurde nach einer Stunde erneuert. Die Proteinlösung wurde für 15 min bei 8500 Upm abzentrifugiert, der Überstand in 30 µl Portionen aufgeteilt, schockgefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al.(1951) bestimmt (siehe auch 4.1.2.)

1.10.2. Für Kernextrakte aus verschiedenen Zelldichten (nach Dignam et al., 1983)

Eine 10 cm Gewebekulturschale wurde mit 5×10^5 Zellen und zehn 10 cm Gewebekulturschalen wurden mit je 2×10^5 Zellen angesetzt und für 48 h wachsen gelassen. Zur Ernte der Zellen wurde das Medium von den Gewebekulturschalen abgeschüttelt, die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellen der dünn kultivierten Platten wurden hierbei zusammengesammelt. Die Zellen wurden 5 min bei 500g und 2°C abzentrifugiert, das Volumen des Zellpellets bestimmt und das Pellet im 3fachen Volumen des Pellets (ca. 300µl) mit Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml Antipain) resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension durch eine Injektionsnadel mit G 25 gezogen und gedrückt; und dadurch lysiert. (Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt). Anschließend wurden die Kerne durch Zentrifugation bei 2000x g pelletiert und im 1,5fachen Volumen des ursprünglichen Zellpellets (ca. 150 µl) in Puffer C

(20 mM HEPES pH 7,9; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 25 % Glycerin; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml Antipain) resuspendiert. Nach 30 minütiger Rotation bei 4 °C wurden die Kernfragmente bei 2000x g für 10 min abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand gegen 100 ml Puffer D (20 mM HEPES pH 7,9; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 25 % Glycerin; 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml Antipain) 2x für 1 h dialysiert. Die Kernextrakte wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). (siehe auch 4.1.2.)

1.11. Sequenzierung doppelsträngiger DNS

1.11.1. Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierungsreaktion wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit einem Sequenase-Kit (United Biochemical Cooperation) durchgeführt. 3 µg DNS wurden bei Raumtemperatur für 5 min in 20 µl 0,2 N NaOH; 0,2 mM EDTA denaturiert, anschließend mit 2 µl 2 M NH₄-Acetat pH 4,6 neutralisiert und bei -80°C mit Ethanol gefällt. Nach 5 min wurde die DNS für 10 min bei 7000x g abzentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl H₂O gelöst. Zur Hybridisierung des Primers wurden die 7 µl DNS-Lösung mit 2 µl 5x Sequenase Puffer (200 mM Tris HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 250 mM NaCl) und 1 µl Primer (1 pmol/µl) gemischt und für 3 min auf 65°C erhitzt. Das Abkühlen erfolgte langsam bei Raumtemperatur für ca. 30 min. Währenddessen wurden vier Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 2,5 µl der entsprechenden Terminationsmischungen* (didesoxy (dd)GTP; ddATP; ddTTP; ddCTP) vorbereitet und bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Für die Markierungsreaktion wurden zu den 10 µl Hybridisierungslösung 1 µl 0,1 M DTT; 2 µl 1:5 verdünnte Markierungsmischung (Endkonzentration: 1,5 µM dGTP, 1,5 µM dCTP; 1,5 µM dTTP); 1 µl ³⁵S-dATP (Amersham 8µCi, 660Ci/mmol) und 2 µl 1:8 mit 1xTE verdünnte Sequenase gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Termination der Reaktion wurden jeweils 3,5 µl der Markierungsreaktion in die vier vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl Sanger Probenuffer (98 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol) wurden die Proben für 3 min bei

90°C erhitzt und nach Abschrecken im Eiswasser auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamidgel bei 1500V in 1x TBE aufgetrennt (siehe dazu 1.4.3.). Die Autoradiographie erfolgte mit Verstärkerfolie mit einem Amersham Hyperfilm MP bei -80°C.

* Die Terminations-Mischungen enthalten:

ddGTP-Mix: 80 µM dGTP; 80 µM dATP; 80 µM dCTP; 80 µM dTTP; 8 µM ddGTP;
50 mM NaCl

ddATP-Mix: 80 µM dGTP; 80 µM dATP; 80 µM dCTP; 80 µM dTTP; 8 µM ddATP;
50 mM NaCl

ddTTP-Mix: 80 µM dGTP; 80 µM dATP; 80 µM dCTP; 80 µM dTTP; 8 µM ddTTP;
50 mM NaCl

ddCTP-Mix: 80 µM dGTP; 80 µM dATP; 80 µM dCTP; 80 µM dTTP; 8 µM ddCTP;
50 mM NaCl

1.11.2. Sequenzierung von DNS durch basenspezifische Spaltung (Maxam und Gilbert, 1980)

Für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert wurden jeweils ca. 20 ng bzw. 40000 cpm eines einseitig markierten DNS-Fragments (siehe 4.5.1.) spezifisch modifiziert.

Für eine G-spezifische Spaltung wurde die DNS in 200 µl Cacodylat-Puffer (50 mM Na-Cacodylat, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und mit 1 µl DMS für 20 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl DMS-Stopplösung (1,5 mM NaAcetat pH 7,0; 1 M β-Mercaptoethanol; 100 µg/ml t-RNS) beendet und die DNS mit 750 µl Ethanol gefällt.

Für die Spaltung an C bzw. T wurde die DNS in 20 µl H₂O mit 30 µl Hydrazin versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Hydrazin-Stopplösung (0,3 M NaAcetat pH 7,0; 0,1 mM EDTA; 25 µg/ml t-RNS) wurde die Reaktion beendet und die DNS mit 750 µl Ethanol gefällt.

Die modifizierte DNS aus beiden Ansätzen wurde abzentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 250 µl 0,3 M NaAcetat aufgenommen. Die DNS wurde erneut mit Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die getrocknete DNS wurde in 100 µl 10 % Piperidin resuspendiert und für 30 min bei 90°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden 200 µl 0,3 M NaAcetat zugegeben und die DNS mit 900 µl Ethanol

gefällt, abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden in 4 µl Sanger-Probenpuffer (98 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol) resuspendiert und jeweils 1500 cpm auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 1.4.3.) aufgetragen.

2. DNS Klonierungstechniken

2.1. Fragmentierung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit einer Restriktionsendonuklease ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µg DNS des Phagen Lambda in einer Stunde verdaut. In der Regel wurde ein 2-3 facher Überschuß an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Für den einzelnen Restriktionsverdau wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen eingehalten.

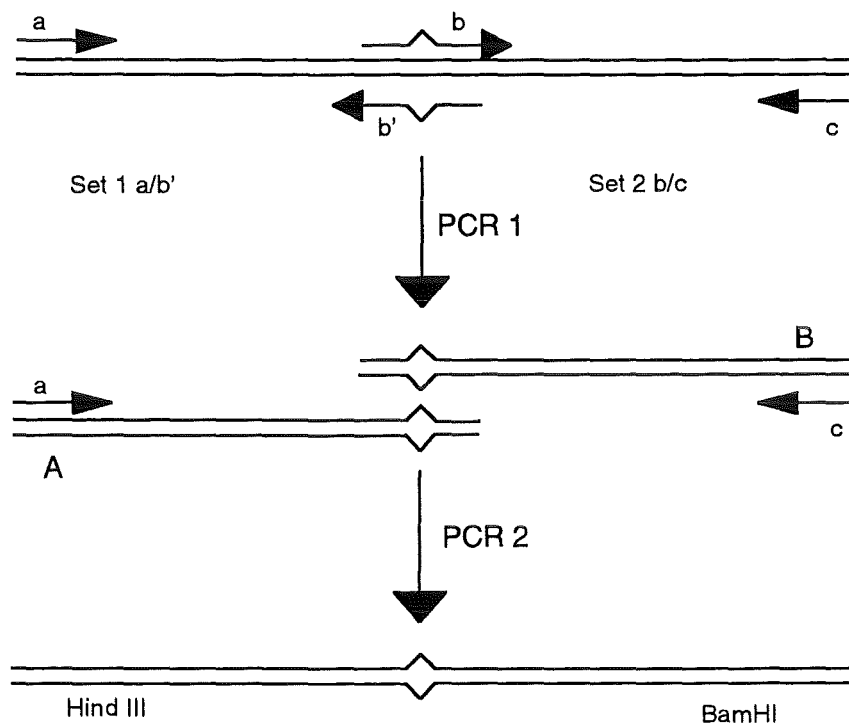
2.2. Ligation von DNS -Fragmenten

Die zu ligierenden DNS-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 zusammengegeben und mit 1 U T4 DNS-Ligase in 30 µl 50 mM Tris HCl pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0,1 mg/ml BSA und 1 mM ATP für 12 h bei 15°C inkubiert.

2.3. Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Ho et al., 1989)

Jeweils 50 ng eines Restriktionsfragmentes, das den zu mutierenden Bereich enthält und als Matrize für die Polymerasekettenreaktion dient, wurde mit 2,5 U Taq-Polymerase, 0,2 mM dNTPs und einem Set aus jeweils einem Primer und einem Einzelstrang des mutierten Oligonukleotids in 50 mM KCL; 10 mM Tris HCl pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine gemischt. Die Primer und Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt. Die erste Reaktion wurde mit 2 Sets unterschiedlicher Primer/Oligonukleotid-Kombination durchgeführt. Set 1 bestand aus Primer a und dem kodierender Strang des mutierten Oligonukleotids (b') und Set 2 aus Primer c und dem nicht-kodierender Strang des

mutierten Oligonukleotids (b) (siehe schematische Darstellung). Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin und Elmer durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus 2 min Denaturierung bei 94°C, 3 min Hybridisierung bei 45°C und 3 min Kettenverlängerung bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 30 mal wiederholt. Die relativ niedrige Hybridisierungstemperatur von 45°C ermöglichte auch den stellenweise mutierten Oligonukleotiden an die Matrize zu hybridisieren. Die Produkte aus den Reaktionen mit Set 1 und 2 wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente A und B der zwei Ansätze mit Hilfe einer DEAE-Membran aus dem Gel eluiert (siehe 1.5.1.). Die so entstandenen DNS-Fragmente wurden als Matrize für eine zweiten Reaktion zusammengegeben und das gesamte Fragment mit den Primern a und c erneut unter den selben Bedingungen amplifiziert: 30 Zyklen; 2 min 94 °C; 3 min 45 °C; 3 min 72 °C. Das Reaktionsprodukt wurde wiederum über ein 2 % Agarosegel gereinigt. Das Endprodukt wurde einem Restriktionverdau unterzogen und in einen Vektor kloniert.



Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. Schematische Darstellung der Mutagenese. Die Primer sind mit den Buchstaben a-c gekennzeichnet. Die Pfeile geben die Richtung der Strangverlängerung an. Das Primerpaar b/b' enthält die Mutation (Λ). A und B markieren die Produkte der ersten PCR-Reaktion. BamHI und Hind III stellen die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme dar.

3. Zellkultur

Die NIH 3T3 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 6 % CO₂ kultiviert. Stabil transfizierte NIH 3T3 (siehe 3.3.2.) wurden in DMEM + 10 % FCS + 0,3 mg/ml G418 (Gibco) kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt und die Zellen wurden bei Erreichen von 70-80 % Konfluenz trypsiniert (siehe 3.2) und zur weiteren Kultivierung 1:5 verdünnt.

3.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, bei 500x g abzentrifugiert und in Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen (5×10^6 Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann in einem Styroporbehälter 12-14 h bei -80°C langsam eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Im Wasserbad, das eine Temperatur von 37 °C hatte, wurden die Zellen rasch aufgetaut. Dann wurden sie mit 10 ml Kulturmedium gegeben, abzentrifugiert und in Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

3.2. Trypsinbehandlung

Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 0,05 % Trypsin gewaschen und mit 1 ml 0,05 % Trypsin/ 10 cm PS für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 5 ml Medium aufgenommen und aus dem trypsinhaltigen Medium abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, ausgezählt und in gewünschter Dichte ausgesät.

3.3. Stabile Transfektion

Die Transfektionen wurden mit einer modifizierten Form der Calciumphosphat-Coprazipitations-Methode (Graham und van der Eb 1973) durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 8×10^5 pro 10 cm Gewebekulturschale angesetzt. 10 μg Plasmid wurde mit 1 μg pSVneo-Plasmid und mit 10 μg Träger-DNS (hochmolekulare Lachsspermien-DNS) transfiziert. Das pSVneo-Plasmid trägt die Information für das Aminoglykosid-3-Phosphotransferase-Gen, das Resistenz gegen Aminoglykosid-Antibiotika wie G418 (Gibco) verleiht. Die Präzipitatbildung wurde in einem Volumen von 500 ml durchgeführt. Die DNS wurde in 225 μl H_2O mit 25 μl 2,5 M CaCl_2 versetzt und diese Mischung unter leichtem Schütteln zu 250 μl 2x HBS (140 mM Na Cl; 25 mM HEPES, pH 7,7; 0,75 mM NaHPO_4) zutropft. Der Ansatz wurde zur Präzipitatbildung 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Je 500 μl des Präzipitats wurden in das Medium einer 10 cm Gewebekulturschale gegeben. Nach 12-14 h wurden die Zellen zweimal mit Medium ohne Serum gewaschen und frisches Medium mit 10 % FCS zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen trypsinisiert, 1:5 verdünnt und zur Selektion in Medium mit 0,6 mg/ml G418 (Gibco) ausgesät. Nach ca. 10-14 Tagen hatten sich ca. 100 G418 resistente Kolonien gebildet, welche trypsinisiert und zu Massenkulturen vereinigt wurden oder als Einzelkone trypsinisiert und vermehrt wurden.

4. Analytische Methoden

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

4.1.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die Zellen wurden 48 h vor der Ernte in zwei verschiedenen Dichten angesetzt. Eine 10 cm Gewebekulturschale wurde mit 5×10^5 Zellen und zehn 10 cm Gewebekulturschalen wurden mit je 2×10^5 Zellen angesetzt. Zur Ernte der Zellen wurde das Medium von den Gewebekulturschalen abgeschüttet, die Zellen 2x mit ca 10 ml eiskaltem PBS (1,4 M NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl_2 ; 0,6 mM MgCl_2 ; 6,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 M KH_2PO_4) gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellen der dünn kultivierten Platten wurden

hierbei in 2 ml zusammengesammelt. Die Zellen wurden 5 min bei 8800 xg abzentrifugiert und in 100 µl 250 mM Tris-HCl pH 7,6 resuspendiert. Dann wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren (Ethanol/Trockeneisbad) und Auftauen (37°C Wasserbad) aufgebrochen. Die Zellfragmente wurden 10 min bei 8800x g abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei -20°C aufbewahrt.

4.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Lowry et al., 1951)

10 µl Gesamtzellextrakt wurden mit 490 µl Lowry Lösung I (2 % Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH) gemischt und anschließend 1 ml Lösung IV (frisch gemischt aus: 500 µl 2 % Na-K-Tartrat (Lsg. II); 50 ml (Lösung I); 500 µl CuSO₄ (Lösung III)) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl frisch angesetzte 50 % Folin Lösung zugegeben, gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichkurve mit BSA bestimmt.

4.1.3. CAT-Aktivitätsbestimmung

Jeweils gleiche Proteinmengen wurden mit 2 µl ¹⁴C-Chloramphenicol und 20 µl 4 mM Acetyl-Coenzym A in 100 µl 250mM Tris-HCl pH 7,6 für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Chloramphenicol mit 1 ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert und in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Der Rückstand wurde in 15 µl Ethylacetat aufgenommen und punktförmig auf eine 20x20 cm große Kieselgel-Dünnschichtchromatographie Platte aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung des nicht umgesetzten Chloramphenicols und der acetylierten Formen erfolgte mit einem Chloroform/Methanol 9:1 Gemisch als Laufmittel. Nach dem Trocknen der Dünnschichtchromatographie-Platte an der Luft erfolgte die Autoradiographie.

Zur Bestimmung der umgesetzten Mengen Chloramphenicol wurden die radioaktiven Punkte ausgeschnitten, mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und im Scintillationszähler gemessen. Da die Enzymaktivität proportional dem umgesetzten Substrat ist erfolgt die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität in pmol·mg⁻¹·h⁻¹ nach folgender Formel:

$$\frac{\text{cpm acetyliertes Chloramphenicol} : 7000\text{cpm eingesetztes Chloramphenicol}}{\text{cpm eingesetztes Chloramphenicol} \cdot 2\text{h} \cdot \text{mg eingesetztes Protein}}$$

4.2. Gelretardations-Analyse

Jeweils 5 µg Kernextrakt wurde mit 1 µg poly (dI-dC) und mit unmarkiertem Kompetitoroligonukleotid für 10 min in 19 µl Bindepuffer (10 mM HEPES KOH, pH 7,9; 5 mM MgCl₂; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 4 % Ficoll 400; 1 M DTT) auf Eis bzw. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2-10 fmol eines radioaktiv markierten Oligonukleotids (10000-20000 cpm) in einem Endvolumen von 20 µl wurde erneut für 30 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnten spezifische Proteine des Kernextraktes an die markierten Oligonukleotide binden. Diese Bindung führt dazu, daß diese Protein/Oligonukleotid-Komplexe im folgenden Polyacrylamidgel langsamer laufen als die freien Oligonukleotide, sie sind retardiert. Die Reaktionen wurden auf einem 4 %igen nativen Polyacrylamidgel in 0,25x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA pH 8,3) bei 100 V aufgetrennt. Als Marker für die Laufstrecke wurde parallel zu den Proben eine Bromphenolblau-Markerspür aufgetragen und nach 6 cm Lauflänge wurden das Gel gestoppt. Anschließend wurde das Gel für 10 min in 10 % Essigsäure fixiert und auf ein 3MM Whatmanfilterpapier aufgezogen und getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C.

4.3. Methylierungsinterferenz-Analyse

20 ng eines Oligonukleotideinzelstranges wurden kinasiert (siehe 1.7.1.) und mit 20 ng des komplementären Einzelstranges durch aufkochen und abkühlen lassen hybridisiert.

Dieses einseitig markierte Oligonukleotid wurde in 200 µl Cacodylat-Puffer (50 mM Na-Cacodylat, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Die Methylierung erfolgte mit 1 µl DMS für 20 Sekunden bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl DMS-Stopplösung (1,5 mM NaAcetat pH 7,0; 1 M β-Mercaptoethanol; 100 µg/ml t-RNS) beendet und die DNS mit 750 µl Ethanol gefällt. Die DNS wurde in 250 µl 0,3 M NaAcetat aufgenommen und erneut mit Ethanol gefällt. Anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das so methylierte Oligonukleotid wurde nun in einen präparativen Gelretardationsansatz eingesetzt.

Ca. 100000 cpm einseitig markiertes und methyliertes Oligonukleotid wurden mit 5 µg poly (dI-dC) und 50-100 µg Kernextrakt in 100 µl Bindepuffer (10 mM HEPES KOH, pH 7,9; 5 mM MgCl₂; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 4 % Ficoll 400; 1 M DTT) für 30 min auf Eis inkubiert. Die genaue Menge an Kernextrakt ist zuvor in einem kleineren Ansatz ausgetestet

worden. Ziel war es ungefähr die gleiche Menge an freiem, ungebundenen und an proteingebundenen Oligonukleotid zu erhalten. Nach der Inkubation wurden die 100 µl Reaktionsansatz auf 2 Taschen des Gels verteilt. Das Gel ist ein 4 %iges natives Polyacrylamidgel in 0,25x TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA pH 8,3). Die Reaktionsprodukte wurden bei 100 V aufgetrennt. Als Marker für die Laufstrecke wurde parallel zu den Proben eine Bromphenolblau-Markerspür aufgetragen und nach 6 cm Lauflänge wurden das Gel gestoppt.

Das Gel wurde nicht getrocknet sondern mit Plastikfolie abgedeckt, auf einer der Glasplatten fixiert und so bei 4 °C auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Lage des Films wurde genau markiert. Mit Hilfe des entwickelten Röntgenfilms konnte die genaue Lage des freien und des proteingebundenen Oligonukleotids im Gel ermittelt und die entsprechenden Banden aus dem Gel herausgeschnitten werden. Die Gelstücke wurden anschließend in ein 1 %iges Agarosegel eingebettet. Die radioaktiven Oligonukleotide wurden über eine DEAE-Membran aus dem Gel eluiert (siehe 1.5.1) und gefällt.

Die so isolierten Oligonukleotide wurden einer Piperidinspaltung unterzogen. Die getrocknete DNS wurde in 100 µl 10 % Piperidin resuspendiert und für 30 min bei 90 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden 200 µl 0,3 M NaAcetat zugegeben und die DNS mit 900 µl Ethanol gefällt, abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 4 µl Sanger-Probenpuffer (98 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol) resuspendiert und jeweils 1500 cpm des Ansatzes des freien und des proteingebundenen Oligonukleotides wurden nebeneinander auf ein 20 %iges denaturierendes Acrylamidgel (siehe 1.4.3.) aufgetragen und solange elektrophoretisch aufgetrennt bis die Bromphenolblau Bande 2/3 der Laufstrecke des Gels gelaufen war. Das Gel wurde mit Plastikfolie abgedeckt und auf einer Glasplatte fixiert bei -80 °C auf Röntgenfilm exponiert.

4.4. "UV-Crosslink"-Analyse

Die Bindungsreaktion und der Gellauf erfolgte genau wie bei der unter 4.2. beschriebenen Gelretardationsanalyse.

Nach dem Gellauf wurde das Gel mit Plastikfolie abgedeckt und auf einer Glasplatte fixiert. Das Gel wurde nun auf einen UV-Transiluminator gelegt und für 30 min mit UV-Licht (305 nm) bestrahlt. Durch diese Behandlung kommt es zur Vernetzung der gebundenen Proteine mit dem markiertem Oligonukleotid. Um eine Degradation der Proteine während der

Bestrahlung zu verhindern wurde das Gel durch eine Wanne mit Eis gekühlt. Nach der UV-Bestrahlung wurde das Gel bei 4 °C für 4-16 h auf einem Röntgenfilm exponiert. Mit Hilfe des entwickelten Filmes wurde die Bande des proteingebundenen Oligonukleotids lokalisiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 30 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 24 % Glycerin; 0,002 % Bromphenolblau; 1,42 M β-Mercaptoethanol) für 5 min bei 95 °C inkubiert. Das Gelstück wurde anschließend in die Tasche eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels (siehe 1.4.4.) eingesteckt und die gebundenen Proteine elektrophoretisch nach der relativen Molekülmasse aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde ein ¹⁴C-markierter Proteinmarker (Biorad) parallel auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 15 mA. Das Gel wurde in 42 % Methanol/ 7 % Essigsäure fixiert, auf einen 3mm Whatmanfilter aufgezogen und für ca. 1h auf einen Vakuumtrocker getrocknet und anschließend autoradiographiert.

4.5. Bindungsanalyse mit Hilfe der DNase I-Protektion ("DNase I-footprint")

4.5.1. Einseitig radioaktive Markierung eines DNS-Fragments

Als geeignetes Fragment wurden Sequenzen aus einem Plasmid ausgewählt, die die Promotorsequenzen mit interessanten Proteinbindungsstellen enthalten.

Um einseitig markierte DNS-Fragmente für die DNaseI Protektionsanalyse zu erhalten wurde das gewünschte Plasmid zuerst in einem Restriktionsverdau (siehe 2.1.) linearisiert. Der Ansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Die entstandenen, überhängenden Enden wurden durch Auffüllen mit α-³²P-dNTPs radioaktiv markiert (siehe 1.7.2.). Das so linearisierte und markierte Plasmid wurde erneut Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Durch Verdau mit einem zweiten Restriktionsenzym wurde das gewünschte Fragment erhalten. Die Abtrennung des Fragments von dem restlichen Vektor erfolgte über ein 2 % Agarosegel. Nach Exposition des Gels auf einen Röntgenfilm wurde das Fragment lokalisiert und mit Hilfe einer DEAE-Membran aus dem Gel eluiert (siehe 1.5.1.). Das Fragment wurde gefällt, gewaschen und in einer Konzentration von 20000 cpm/µl in H₂O aufgenommen. Um dasselbe Fragment auf der anderen Seite zu markieren wurde die Reihenfolge der Restriktionsverdau umgekehrt.

4.5.2. DNase I-Protektionsanalyse

20 000 cpm eines einseitig markierten DNS-Fragments wurden mit 30-90 µg Kernextrakt in einem Endvolumen von 100 µl in 20 mM HEPES pH 7,9; 50mM KCL; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Mg-Mix (30 mM MgCl₂; 300µg/ml Lachsspermien-DNS) zugegeben. Durch Zugabe von 2 U DNase I wurde der DNase-Verdau gestartet und je nach Proteinmenge nach 1 bis 5 min durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die Reaktionen wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und die entstandenen Verdauprodukte mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Sanger-Probenpuffer (98 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol) resuspendiert und jeweils 1500 cpm eines Ansatzes wurden auf ein 6 %iges denaturierendes Acrylamidgel (siehe 1.4.3.) aufgetragen. Um die Proteinbindungsbereiche genau lokalisieren zu können, wurde parallel zu den Proben eine Sequenzierung desselben Fragments nach Maxam und Gilbert (siehe 1.11.2.) aufgetragen

4.6. In vivo Dimethylsulfat-"footprint" durch ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion (Mueller und Wold, 1989)

4.6.1. In vivo Methylierung von DNS durch Dimethylsulfat (DMS) in lebenden Zellen und Präparation genomischer DNS

Die Zellen einer 10 cm Gewebekulturschale wurden einmal mit warmen PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 2 min mit 5 ml 0,5 % DMS in DMEM/10 mM HEPES-KOH pH 7,5 inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 5 ml PBS abgeschabt und bei 4°C und 500x g für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,7; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % SDS) resuspendiert und nach Zugabe von 300 µg/ml Proteinase K bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Lysat wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 1.2.) und in Anwesenheit von 0,25 M NaAcetat mit Iso-Propanol gefällt. Die genomische DNS wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 ml H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µg RNase A und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde erneut eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und die genomische DNS gefällt.

4.6.2. *In vitro* Methylierung genomischer DNS (nach Maxam und Gilbert, 1980)

Die Ernte der Zellen erfolgt wie unter 11.1 beschrieben, die Zellen bleiben jedoch unbehandelt. Die gefällte DNS wird in 200 μ l Cacodylat-Puffer (50 mM Na-Cacodylat, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und mit 1 μ l DMS für 20 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 μ l DMS-Stopplösung (1,5 mM NaAcetat pH 7,0; 1 M β -Mercaptoethanol; 100 μ g/ml t-RNS) beendet und die DNS mit 750 μ l Ethanol gefällt. Die DNS wurde in 250 μ l 0,3 M NaAcetat aufgenommen und erneut mit Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.6.3. Piperidinspaltung der *in vivo* und *in vitro* methylierten genomischen DNS (Maxam und Gilbert, 1980)

Die getrocknete DNS wurde in 100 μ l 10 %igem Piperidin resuspendiert und für 30 min bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden 200 μ l 0,3 M Na Acetat zugegeben und die DNS mit 900 μ l Ethanol gefällt. Anschließend abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNS wurde in 44 μ l H₂O resuspendiert und die Konzentration bestimmt (siehe 1.1.)

4.6.4. Amplifikation und radioaktive Markierung der Piperidinspaltprodukte

4.6.4.1. Erststrangsynthese

Jeweils 3 μ g, durch Piperidin gespaltene genomische DNS, wurde mit 0,6 pmol Primer 1 in 15 μ l 40 mM Tris-HCl pH 7,7 und 50 mM NaCl für 3 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden danach sofort zur Hybridisierung des Primers für 30 min bei 45°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 9,5 μ l Sequenase-Mischung (7,5 μ l 20 mM MgCl₂/20 mM DTT; 1 μ l 480 μ M dNTPs; 1 μ l 1x TE; 0,346 μ l Sequenase (13 U/ μ l)) zugegeben, durch auf und ab pipettieren gemischt und für weitere 20 min bei 45°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abschrecken der Proben auf Eis abgestoppt. Durch Zugabe von 6 μ l 310 mM Tris-HCl pH 7,7 und Erhitzen der Proben für 15 min bei 67°C wurde die Sequenase inaktiviert.

4.6.4.2. Ligation des Linkers

Der Linker wurde durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide hergestellt: 5'-OH-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-OH-3' (langes Linker-Oligonukleotid) und 5'-OH-GAATTCAGATC-OH-3' (kurzes Linker-Oligonukleotid). Für die Technik ist es wichtig, daß der Linker keine 5'Phosphate besitzt und auf einer Seite überhängende Enden besitzt um Selbstligation zu vermeiden. Die beiden Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 20 pmol/ml in 250 mM Tris-HCl pH 7,7 zu gleichen Mengen zusammengegeben und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die DNS-Lösung wurde dann in ein Becherglas mit 100 ml 70°C heißes Wasser überführt und langsam (ca. für 3h) abgekühlt.

Für die Ligation des Linkers wurden die Proben aus der Erststrangsynthese auf Eis inkubiert und jeweils 20 µl Verdünnungspuffer (17,5 mM MgCl₂; 42,3 mM DTT; 126 µg/ml BSA) zugegeben. Anschließend wurden 25 µl Ligationsmischung, bestehend aus: 20 µl Ligationspuffer (10 mM MgCl₂; 20 mM DTT; 3 mM ATP; 50 µg/µl BSA), 5 µl Linker (20 pmol/µl) und 3 U T4-DNS-Ligase, zugegeben und die Reaktionen für 4-16 h bei 15°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Inkubation bei 70°C für 10 min gestoppt. Die DNS wurde anschließend in Gegenwart von 10 µg t-RNS mit Ethanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.6.4.3. Die Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR) und radioaktive Markierung

Die gefällte DNS wurde in 59 µl H₂O gelöst und anschließend wurden 20 µl 5x Taq-Puffer (200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 25 mM MgCl₂; 0,05 % Gelatine), 5 µl Primer 2 (2 pmol/µl) und 5 µl des langen Linker-Oligonukleotids (2 pmol/µl) zupipettiert. Die Proben wurden gemischt, für 5 min bei 95°C inkubiert und danach sofort auf Eiswasser abgeschreckt. Nach Zugabe von 10 µl einer 2,5 mM dNTP-Mischung und 4 µl einer, 1:4 in 1x Taq-Puffer, verdünnten Taq-Polymerase (AmpliTaq™, Cetus-Perkin-Elmer Corporation, 5 U/µl) wurden die Proben gemischt, in spezielle 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die PCR in einem Thermocycler von Perkin-Elmer durchgeführt. Es wurden 20 Zyklen programmiert, wobei ein Zyklus wie folgt aussah: 1 min Denaturierung bei 95°C, 2 min Hybridisierung der Primer bei 63°C, 3 min Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase bei 72°C.

Die Proben wurden dann auf Eis abgekühlt und jeweils 2 pmol ^{32}P -endmarkierter Primer 3 (ca. $2\text{-}5 \times 10^6$ cpm), 2,5 U Taq-Polymerase und 2 μl 1 mM dNTP-Mischung zugegeben. Die Proben wurden erneut für einen Zyklus in den Thermozycler gestellt und dort 2 min bei 95°C , 2 min bei 68°C und 10 min bei 72°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 295 μl Stopp-Lösung (260 mM NaAc, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 4 mM EDTA) auf Eis gestoppt. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, die Proben mit Ethanol gefällt und zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Die getrockneten Proben wurden in 6 μl Sanger-Probenpuffer (80 % deionisiertes Formamid, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol) aufgenommen und 2 μl davon auf ein 6 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für ca. 3h bei 1500 V.

4.7. Hypersensitivität von chromatinverpackter DNS gegenüber DNase I und Restriktionsendonukleasen

4.7.1. Präparation der Zellkerne

Die konfluent gewachsenen Zellen von mindestens sechs 15cm Petrischalen wurden 2x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 10 ml PBS mit dem Gummispatel abgeschabt. Die Zellen wurden bei 600g für 3 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml Homogenisationspuffer (10 mM Tris.HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 15 mM NaCl; 60 mM KCl; 0,15 mM Spermine; 0,5 mM Spermidin; 0,2 % NP40; 5 % Saccharose) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Dounce-Homogenisator mit Pistil A lysiert. Das Zelllysate wurde auf ein Kissen aus 5 ml des Homogenisationspuffers mit 10 % Saccharose aufgetragen und mit $1600 \times g$ für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das Kernpellet wurde zum Waschen in 10 ml Waschpuffer (10 mM Tris.HCl, pH 7,4; 15 mM NaCl; 60 mM KCl; 0,15 mM Spermine; 0,5 mM Spermidin) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Kernpellet in 1 ml Verdaupuffer (10 mM Tris.HCl, pH 7,4; 5 mM MgCl_2 ; 15 mM NaCl; 20 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,15 mM Spermine; 0,5 mM Spermidin) aufgenommen, 10 μl dieser Suspension wurden abgenommen, die Kerne in 990 μl 1 %iger SDS-Lösung lysiert und anschließend die OD $_{260}$ bestimmt. Die Kerne wurden dann auf eine OD $_{260}$ von 40 mit Verdaupuffer verdünnt. Die Kerne wurden zu jeweils 200 μl Aliquots abgefüllt.

4.7.2. Restriktionsverdau der Kerne

Zu den Kernaliquots wurden steigende Mengen des Restriktionsenzym SacI gegeben (0, 750, 1500 und 2250 U/ml). Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 30°C. Durch Zugabe von 2 ml Stopp-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K) wurde die Reaktion abgestoppt und der Proteinase K-Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die genomische DNS mit Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

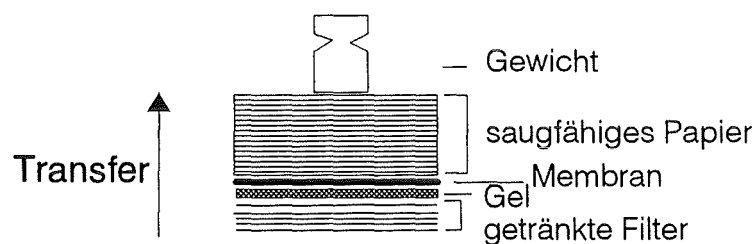
4.7.3. DNase I-Verdau der Kerne

Zu den Kernaliquots wurden steigende Mengen DNase I (0, 300, 600 1200 U/ml) zugegeben. Die Reaktion erfolgte für 10 min auf Eis. Durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und 2 ml Stopp-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K) wurde die Reaktion abgestoppt und der Proteinase K-Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die genomische DNS mit Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

4.7.4. Analyse der genomischen DNS und "Southern-Transfer"

Die genomische DNS wurde in 100 µl H₂O gelöst und die Konzentration bestimmt. 20 µg DNS wurden mit jeweils 40 U der Enzyme Nco I und Hind III in Puffer H (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM DTT) bei 37 °C für 6-14 h verdaut. Die verdaute DNS wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Anschließend wurde die verdaute DNS in 40 µl 1x Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0; 10% Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen und die DNS-Fragmente auf einem 1,2 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE (40 mM Tris-Acetat; 2 mM EDTA) verwendet. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 50 V. Das Gel wurde anschließend in 200 ml 1x TAE mit 5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, die gefärbte DNS auf einem UV-Transiluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert. Das Gel wurde dann für 15 min in 0,25 N HCl geschwenkt und die DNS dadurch depuriniert. Danach wurde das Gel für 30 min bis 1 h in 0,5 N NaOH/ 1,5 M NaCl denaturiert und schließlich für 30 min bis 1 h in 1 M Tris pH 7,5 wieder neutralisiert. Für den Transfer der

aufgetrennten DNS-Fragmenten aus dem Gel auf eine Membran wurden fünf 3MM Whatmannfilter in Gelgröße zugeschnitten, in 10x SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat pH 6,5) getränkt und auf der Arbeitsfläche übereinandergelegt. Auf diesen Stapel wurde das vorbehandelte Gel gelegt. Auf das Gel wurde eine in Gelgröße zugeschnittene Hybond N⁺-Membran aufgelegt, die zuvor kurz in H₂O und 10x SSC geschwenkt wurde. Auf die Membran wurden mehrer Lagen saugfähiges Filterpapier aufgelegt. Die Salzlösung steigt nun aus den unteren Filtern durch das Gel in die trockenen Papierschichten und gleichzeitig wird die DNS mittransportiert und auf die Membran transferiert.



Schematische Darstellung der Aufsichtung beim "Southern-Transfer" der DNS.

Der Transfer dauert ca. 12-14 h. Nach dem Transfer wird die DNS durch Behandlung für 5 min mit 50 mM NaOH auf der Membran fixiert und die Membran nach dem Waschen in 5x SSC feucht in Plastikfolie eingeschweißt.

4.7.5. Hybridisierung

Als Hybridisierungsprobe wurde ein 561 bp Hind III/Nco I-Fragment des Plasmids pHcwt gewählt, das spezifisch mit der Sequenz des CAT-Gens hybridisiert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem "Random Primed DNS Labeling Kit" der Firma Boehringer, Mannheim. Hierzu wurden ca. 50 ng des Fragments in 20 µl H₂O mit 10 µl "Primer"-Lösung für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden bei Raumtemperatur 10 µl "Primer"-Puffer, 3 µl α-³²P-dCTP (10 mCi/ml) und 2 µl T7-Polymerase (1 U/µl) zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl "Stopp-Lösung" gestoppt. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über eine Gelfiltration mit Sephadex G 50 abgetrennt.

Zur Vorhybridisierung wurde die Membran mit ca. 10 ml Church-Puffer (0,5 M NaPi; 7 % SDS; 1 mM EDTA, pH 8,0) in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 2 h bei 65 °C inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde die radioaktive Hybridisierungsprobe durch Kochen für 5 min denaturiert und anschließend in einer Konzentration von ca 1×10^6 cpm /ml zu 10 ml Church-Puffer gegeben. Mit dieser Lösung wurde die Membran erneut eingeschweißt und für 12-16 h bei 65 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 4x in jeweils 250 ml 40 mM NaPi/ 1 % SDS gewaschen: 2x 5 min bei 55 °C, 15 min bei 65 °C und 45 min bei 65 °C. Danach wurde der Filter an der Luft getrocknet, in Folie eingeschweißt und bei -80 °C auf einen Röntgenfilm exponiert.

4.8. Feststellung der Kopienzahl in stabil transfizierten Einzelklonen

Stabil mit pHcwt transfizierte Einzelklone von NIH 3T3- und GR-Zellen wurden mit 1×10^6 Zellen pro Gewebekulturschale angesetzt und nach 48 h wurde die genomische DNS präpariert. Dazu wurden die Zellen zwei mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 5 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,7; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % SDS) mit einem Gummispatel abgeschabt. Nach Zugabe von 300 µg/ml Proteinase K bei 37°C wurden die Proben über Nacht inkubiert. Das Lysat wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 1.2.) und in Anwesenheit von 0,25 M NaAcetat mit Iso-Propanol gefällt. Die genomische DNS wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O resuspendiert. Die genomische DNS wurde genau wie unter 4.7.4. beschrieben verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran wie unter 4.7.5. beschrieben hybridisiert. Zum Vergleich der Kopienzahl wurden 20 µg des Plasmids pHcwt ebenfalls wie unter 4.7.4. beschrieben verdaut. Nach der Komplexität eines Säuger-genoms besitzt eine Zelle 3×10^9 bp genomische DNS. Die Größe des pHcwt-Plasmids beträgt ca. 4000 bp und entspricht somit $1,33 \times 10^{-4}$ % der genomischen DNS einer Zelle, wenn nur eine Kopie vorliegt. In den Restriktionsverdau wurden jeweils 20 µg genomische DNS eingesetzt. Damit beträgt der pHcwt-Anteil 26,6 pg wenn nur eine Kopie vorliegt. Von den 20 µg des verdauten pHcwt-Plasmids wurden 26,6 pg, 79,8 pg, 133 pg und 266 pg neben der verdauten genomischen DNS der stabilen Einzelklone auf das Agarosegel aufgetragen (siehe 4.7.4). Diese Plasmidmengen entsprachen einer, drei, fünf und zehn Kopien des Plasmids in 20 µg genomischer DNS einer Zelle. Nach Exposition der hybridisierten Membran auf einen

Röntgenfilm konnte durch Vergleich der Intensitäten der Banden die Kopienzahl in den stabil transfizierten Einzelklonen festgestellt werden.

Ergebnisse

Die Expression des proviralen MMTV erfolgt in Mäusen zelltypspezifisch in der Milchdrüse. Nur in der Speicheldrüse und im Hoden wird noch eine geringe MMTV Expression gefunden. In Experimenten mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, daß rekombinierte Genkonstrukte, die den gesamten MMTV LTR vor ein Testgen kloniert enthalten, hauptsächlich in der Milchdrüse exprimiert werden (Stewart et al., 1988). Dadurch konnte gezeigt werden, daß sich die für die Regulation der gewebespezifischen Expression benötigten Sequenzen im MMTV LTR befinden. Vergleicht man die Expression solcher chimären Genkonstrukte in Zellkultur, so ist erneut in Mammaepithelzelllinien eine erhöhte Expression im Vergleich zu Fibroblasten festzustellen (Mink et al., 1990). Es ist folglich möglich, die durch den MMTV LTR vermittelte gewebespezifische Expression in Zellkultur nachzuvollziehen. Untersuchungen des MMTV LTR zeigten, daß Sequenzen von -1094 bis -739 des MMTV LTR (im Bezug auf die Startstelle der Transkription) in der Lage sind zelltypspezifische Expression zu vermitteln. Diese Sequenzen wurden als mammaspezifischer Enhancer E1 charakterisiert (Mink et al. 1992). Sequenzen des MMTV LTR von Position -235 bis +122 im Bezug zu der Startstelle der Transkription, vermitteln jedoch außerdem eine erhöhte Expression in Mammaepithelzellen verglichen mit MMTV Sequenzen von Position -73 bis +122 (Mink et al., 1990). Diese Expression ist jedoch abhängig von der Zelldichte nur in Zellen hoher Dichte festzustellen (Nierlich, 1989; Härtig et al., 1993). Es ist jedoch bislang nicht geklärt, ob die zelldichte-induzierte Expression des MMTV auch in anderen Zelllinien statt findet oder ob diese Expression zelltypspezifisch erfolgt. In dieser Arbeit wurde daher zunächst untersucht, ob die MMTV LTR Sequenzen von Position -235 bis +122 in der Lage sind zelltypspezifische Expression zu vermitteln.

1. Sequenzen des MMTV von -235 bis +122 sind in der Lage zelltypspezifische Genexpression zu vermitteln

Zur Untersuchung der zelltypspezifischen Expression wurde ein Genkonstrukt verwendet, bei dem MMTV LTR Sequenzen von Position -235 bis +122 (bezüglich der Startstelle der Transkription) die Expression der bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als Reporter gen kontrollieren. Dieses, als pHCwt bezeichnete rekombinante Genkonstrukt, wurde stabil in drei verschiedene Zelllinien transfiziert. Zum einen in GR-Zellen, eine mamma-adenokarzinom Zelllinie aus GR-Mäusen (Ringold et al., 1975), die eine verstärkte MMTV Expression zeigen und zum anderen in die nicht tumorigene Mammaepithelzelllinie NMuMG (Owens et al., 1974). Außerdem wurde das Konstrukt in NIH 3T3-Zellen, eine murine Fibroblastenzelllinie transfiziert. Durch die stabile Transfektion wird das Plasmid in das Genom integriert und unterliegt somit der gleichen Chromatinverpackung wie die endogenen Gene. Um klonale Effekte auszuschließen wurden jeweils mindestens 100 stabile Einzelklone zu einer Massenkultur zusammengefaßt.

Der Vorteil dieser rekombinanten Genkonstrukte ist, daß das synthetisierte Genprodukt leicht durch einen Enzymtest nachgewiesen werden kann. Die Chloramphenicol-Acetyltransferase überträgt Acetylgruppen auf ^{14}C -markiertes Chloramphenicol. Das Acetyl-Coenzym A dient in diesem Test als Donor für die Acetyl-Gruppen. Die Produkte dieser Enzymreaktion werden aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens durch eine Dünnschicht-Chromatographie voneinander getrennt. Das unveränderte Chloramphenicol wandert weniger weit als die mono- und di-acetylierten Formen des Chloramphenicol. Das Ausschneiden der Spots aus der Dünnschicht-Chromatographie ermöglicht eine quantitative Auswertung mit Hilfe der Scintillationsmessung. Die Enzymaktivität ist proportional zu dem umgesetzten Substrat und ist somit ein direktes Maß für die Genexpression. Dieser Enzymtest wird auch als "CAT-Assay" bezeichnet. Werden in diesen CAT-Assay gleiche Mengen an Protein eingesetzt, so können die Enzymaktivitäten aus verschiedenen Ansätzen verglichen werden. Hierdurch sind Rückschlüsse auf die Genregulation möglich. Dieses System eignet sich daher sehr gut, um die transkriptionelle Regulation von Genen zu untersuchen.

Die stabil transfizierten Zellen wurden für diese Experimente jeweils in zwei Zelldichten ausgesät. Bei der niedrigen Zelldichte wurden 1×10^5 Zellen pro 9 cm Gewebekulturschale eingesät, die hohe Zelldichte entsprach 6×10^6 Zellen pro 9 cm Gewebekulturschale. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und ein CAT-Assay

durchgeführt. In Abb. 1 sind in einem Balkendiagramm die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt.

Der Vergleich der Expression des chimären CAT-Gens in den verschiedenen Zellen bei niedriger Dichte zeigt, daß sie in allen drei Zelllinien gleich gering ist. Bei hoher Dichte zeigen sich jedoch zelltypspezifische Unterschiede. Die Expression in den Mammaepithelzelllinien GR und NMuMG ist im Vergleich zu den NIH 3T3-Zellen deutlich erhöht (siehe Abb. 1.).

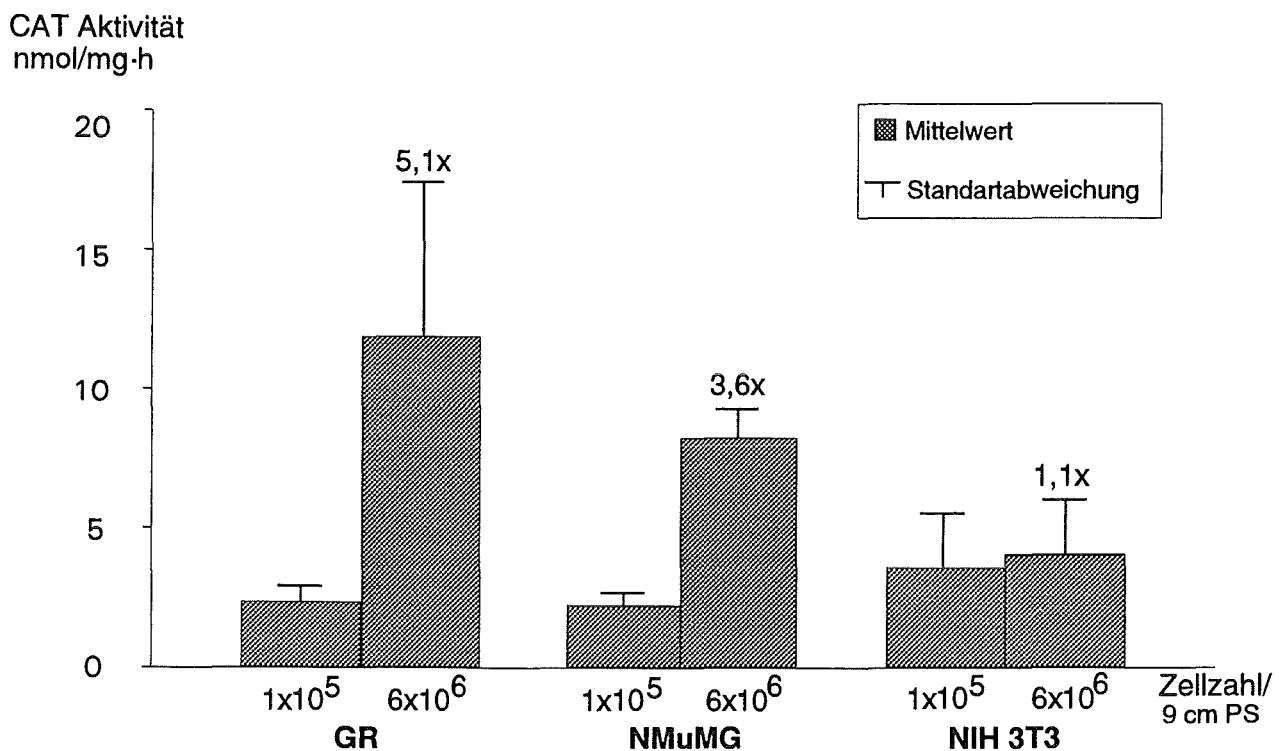


Abb. 1 Das pHcwt-Konstrukt ist in GR- und NMuMG-Zellen hoher Dichte stärker exprimiert als in NIH 3T3-Zellen. Stabil mit dem pHcwt-Konstrukt transfizierte Zellen wurden in niedriger (1×10^5 Zellen/ 9 cm PS) und in hoher Dichte (6×10^6 Zellen/ 9 cm) angesetzt, nach 48 h wurden Gesamtzellextrakte präpariert und ein CAT-Assay durchgeführt, wobei 60 bis 120 μ g Protein eingesetzt wurden. Die spezifische Enzymaktivität (nmol/mg·h) von mindestens 5 unabhängigen Experimenten wurde bestimmt und daraus der Mittelwert und die Standartabweichung berechnet. Die dunkel schraffierten Flächen stellen den Mittelwert da, darüber ist die Standartabweichung eingezeichnet. Die Faktoren über den Balken sind die Induktionsfaktoren der zell-dichte-induzierten Expression.

Vergleicht man nun die Werte mit niedriger und hoher Zelldichte innerhalb einer Zelllinie so ergibt sich ein Induktionsfaktor für die zell-dichte-induzierte Expression von 5,1 für GR-Zellen, in NMuMG-Zellen beträgt er 3,6 und in NIH 3T3-Zellen 1,1. Dieses Experiment

zeigt, daß die zelldichte-abhängige Expression des pHcwt-Konstrukts zelltypspezifisch nur in den Mammazelllinien GR und NMuMG, nicht aber in der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 erfolgt. Es kommt hierbei zu einer Überlagerung zweier Effekte: Zum einen die zelltypspezifisch höhere MMTV-Expression in den Mammaepithelzellen im Vergleich zu NIH 3T3-Zellen und zum anderen die zelldichte-induzierte Expression des MMTV in Mammaepithelzellen.

Zur Aufklärung der Mechanismen, die zu der zelltypspezifischen Expression führen, wurden durch Bindungsstudien die Faktoren analysiert, die an die MMTV-Sequenzen von -235 bis +122 binden und daher an der zelltypspezifischen Regulation beteiligt sein können. Die folgenden Experimente wurden vergleichend mit GR- und NIH 3T3-Zellen durchgeführt, da zwischen diesen Zelltypen die größten Unterschiede in der Expression bestehen.

2. An der Regulation der zelltypspezifischen Expression sind mehrere Proteine beteiligt

Die Sequenzen von +235 bis +122 des MMTV LTR beinhalten das sogenannte HRE ("hormone response element"), das vier Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor enthält (Scheidereit et al., 1983, Payar et al., 1983, von der Ahe et al., 1985), eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor der CTF/NF1-Familie (Nowock et al., 1985; Miksicek et al., 1987) und zwei Erkennungssequenzen für den Transkriptionsfaktor OTF-1, die distale und die proximale Octamerbindestelle (OctD und OctP) (Brüggemeier et al., 1991). Der Glukokortikoidrezeptor ist dabei nicht für die zelldichte-induzierte Expression in Mammaepithelzellen verantwortlich, da diese Expression auch dann stattfindet, wenn der Rezeptor durch den Agonisten RU486 inaktiviert wurde (Härtig et al., 1993). Punktmutationen im Bereich der CTF/NF1- und der OTF-1-Erkennungssequenzen im Kontext des pHcwt führen zu einer verringerten Expression in GR-Zellen hoher Dichte. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind folglich an der zelldichte-induzierten Regulation des MMTV LTR in Mammaepithelzellen beteiligt (Nierlich, 1989). Daher wurde zunächst überprüft ob diese beiden Transkriptionsfaktoren ebenfalls an der Vermittlung der zelltypspezifischen Regulation des MMTV beteiligt sind. Die Regulation der Zelltypspezifität könnte dabei so erfolgen, daß die Faktoren CTF/NF1 bzw. OTF-1 in den Mammaepithelzellen in größerer Menge vorliegen, so daß die erhöhte Expression allein von dem Vorhandensein dieser Faktoren abhängt. Da CTF/NF1 eine große Familie von

Transkriptionsfaktoren darstellt, könnte auch ein mammaspezifischer NF1-Faktor existieren, der für die zelltypspezifische Expression verantwortlich ist.

Mit Hilfe von Protein/DNS-Bindungsanalysen wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht, ob tatsächlich Mengenunterschiede dieser Transkriptionsfaktoren zwischen den Mammaepithelzellen und den Fibroblasten bestehen oder ob verschiedene Faktoren der NF-1 Familie in den beiden Zelltypen existieren.

2.1. *In vitro* Bindungsstudien

2.1.1. Gelretardations-Analyse mit den Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren OTF-1 und CTF/NF1

Mit Hilfe der Gelretardations-Analyse wurde überprüft, ob qualitative oder quantitative Unterschiede in der Bindungsaktivität von NF1 und OTF-1 zwischen den beiden Zelltypen GR und NIH 3T3 bestehen. Für diese Analyse werden synthetische Oligonukleotide verwendet, die die spezifische Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren enthalten. Diese Oligonukleotide werden radioaktiv endmarkiert und mit Kernextrakten aus GR- und NIH 3T3-Zellen inkubiert. Während dieser Inkubationszeit können die im Kernextrakt vorhandenen Transkriptionsfaktoren an die Oligonukleotide binden. Die dabei entstehenden Protein/DNS-Komplexe werden anschließend auf einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei laufen Oligonukleotide, an die Proteine gebunden hatten, im Vergleich zu den freien, ungebundenen Oligonukleotiden, deutlich verlangsamt. Dieses Bandenmuster, aus freiem und retardiertem Oligonukleotid, ist nach der Autoradiographie des Gels, aufgrund der radioaktiven Markierung des Oligonukleotids sichtbar. Liegt das radioaktiv Oligonukleotid im Überschuß vor, so entspricht die Stärke der Bande der Menge an gebundenem Protein. Ob es sich um eine spezifische Bindung handelt kann in einem zweiten Ansatz feststellen werden, bei dem man, zusätzlich zu dem radioaktiv markierten Oligonukleotid, einen 50- bis 200-fachen Überschuß an unmarkiertem homologen Oligonukleotid zugibt. Bei einer spezifischen Protein/DNS-Wechselwirkung bindet das spezifische Protein mit der gleichen Affinität an das unmarkierte Oligonukleotid und die Bindung an das markierte Oligonukleotid wird verringert (kompetiert). Im Gegensatz dazu hat ein sequenzfremdes Oligonukleotid keinen Einfluß auf die Bindung eines spezifischen Proteins an das markierte Oligonukleotid. Ein qualitativer Unterschied der Bindungsaktivität der OTF-1- bzw. NF1-Faktoren würde sich in einer unterschiedlichen Laufstrecke und Breite der spezifischen Bande zeigen. Ein quantitativer Unterschied hingegen wäre aus der veränderten Intensität der Banden ersichtlich.

Die markierten Oligonukleotide OctP- und OctD, die die Bindungssequenzen für OTF-1 aus dem MMTV enthalten, ergaben nach Inkubation mit Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen eine retardierte Bande (siehe Abb. 2A, Spur 1 und 5). Diese Bande wurde durch 100-fachem Überschuß an OctP (Spur 2) bzw. OctD (Spur 6) kompetiert, ist also spezifisch. Der Überschuß an dem sequenzfremden Oligonukleotid F7 hat keinen Einfluß auf die Bande (siehe Spur 3 und 7). Auch mit Extrakt aus GR-Zellen findet man eine spezifische, retardierte Bande, die im Laufverhalten und der Intensität der aus NIH 3T3-Zellen vergleichbar ist (vergleiche Spur 1 mit Spur 4 und Spur 5 mit Spur 8). Man kann daher in dieser Bindungsstudie, was Menge und Art des an die Oct-Erkennungssequenz bindenden Faktoren anbelangt, keine Unterschiede zwischen NIH 3T3- und GR-Zellen feststellen.

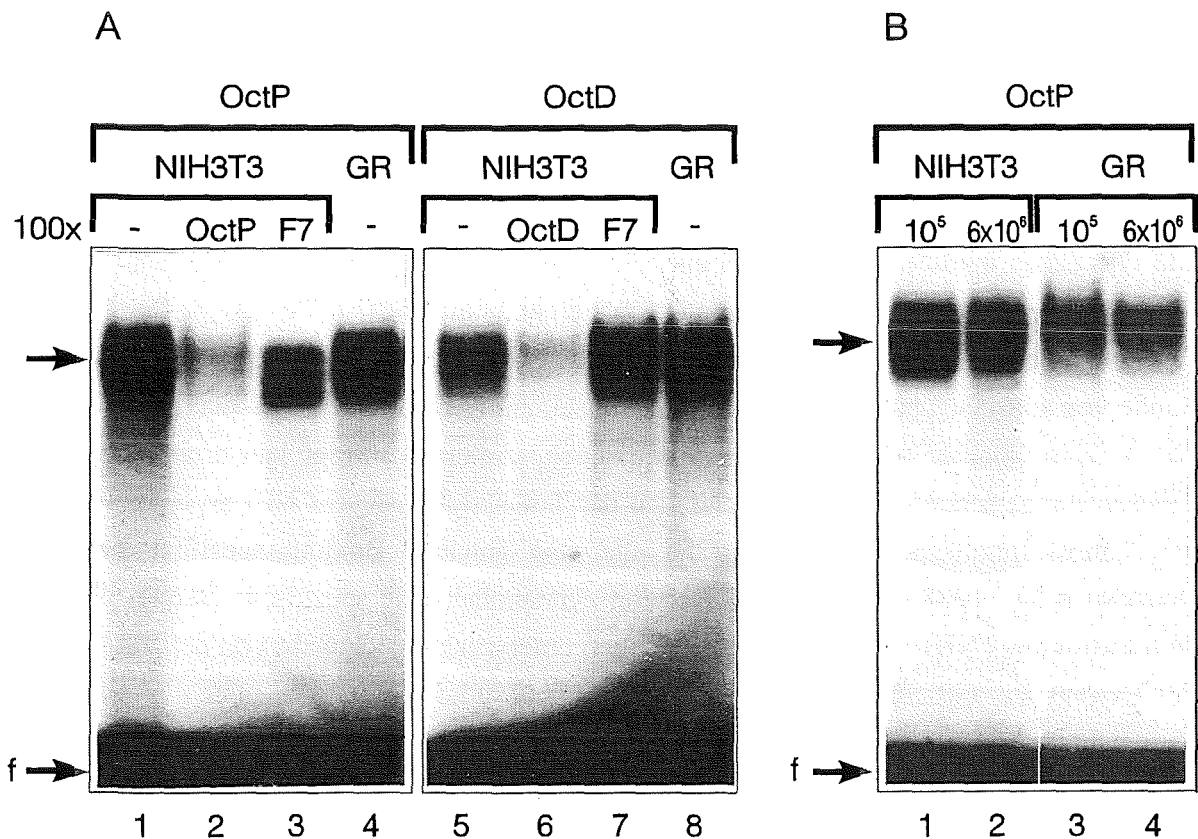


Abb. 2 Kernextrakte aus GR- und NIH 3T3-Zellen zeigen keinen Unterschied in der Bindungsaktivität zu den Oct-Oligonukleotiden, OctP und OctD. (A) Autoradiogramm einer Gelretardations-Analyse mit je 5 µg Kernextrakt aus konfluent wachsenden NIH 3T3- und GR-Zellen und 10 fmol (20000cpm) endmarkiertem OctP- bzw. OctD-Oligonukleotid. Die angegebenen Kompetitoren (OctP, OctD und F7) wurden in 100-fachem molaren Überschuß zugegeben. (B) Autoradiogramm einer Gelretardations-Analyse mit je 5 µg Kernextrakt aus Zellen niedriger (1x10⁵ Zellen/PS) und hoher Zelldichte (6x10⁶ Zellen/PS) und 10 fmol (20000 cpm) endmarkiertem OctP-Oligonukleotid. Die spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, das freie Oligonukleotid mit f.

Die bisher verwendeten Kernextrakte wurden aus Zellen präpariert, die dicht gewachsen waren und somit den Zellen entsprachen, die eine zelltypspezifische höhere Expression des MMTV in GR-Zellen verglichen mit NIH 3T3-Zellen zeigten. Um herauszufinden, ob die zelldichte-induzierte höhere Expression des MMTV in GR-Zellen durch einen Mengenunterschied an OTF-1 bewirkt wird und ob in NIH 3T3-Zellen die Zelldichte die Bindungsaffinität von OTF-1 in irgend einer Weise beeinflusst, wurde das OctP-Oligonukleotid mit Kernextrakt aus GR- und NIH 3T3-Zellen niedriger (1×10^5 Zellen/ 9 cm Gewebekulturschale) und hoher Dichte (6×10^6 Zellen/ 9 cm Gewebekulturschale) inkubiert. Dabei entsteht dieselbe spezifische Bande wie mit GR- und NIH 3T3-Extrakt hoher Dichte vergleiche Abb. 2B, Spur 1 mit Spur 2 und Spur 3 mit Spur 4). Es besteht kein Unterschied zwischen den Banden, die mit Extrakt aus niedriger und hoher Zelldichte entstanden sind. Die verstärkte Expression des MMTV in GR-Zellen hoher Dichte beruht folglich ebenfalls nicht auf einem quantitativen Unterschied des Transkriptionsfaktors OTF-1 zwischen Zellen niedriger und hoher Dichte.

Wurde das NF1-Oligonukleotid mit Kernextrakten aus konfluent wachsenden NIH 3T3- und GR-Zellen inkubiert, so entstand eine breite diffuse Bande (siehe Abb. 3A, Spur 1 und 4). Durch Konkurrenz mit 100-fachem Überschuß an unmarkiertem NF1 (siehe Spur 2 und 5) und sequenzfremden Oligonukleotid F7 (siehe Spur 3 und 6), wurde gezeigt, daß die Bande von spezifisch bindenden NF1-Proteinen stammt (Abb. 3A). Daß es sich hierbei nicht nur um eines sondern um mehrere Proteine handelt, kann man aus der sehr breiten und diffusen Bande schließen. Die Tatsache, daß der Transkriptionsfaktor NF1 zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren gehört, die alle eine ähnliche Bindungsspezifität besitzen (Santoro et al., 1988), macht dieses Resultat verständlich. Die spezifische Bande, die mit dem Extrakt aus NIH 3T3-Zellen entstanden ist, unterscheidet sich nicht von der Bande, die mit Extrakt aus GR-Zellen erhalten wurde. Es gibt weder qualitativen oder quantitativen Unterschiede zwischen den beiden Kernextrakten, die zu einer zelltypspezifischen Expression führen könnten.

Auch nach Inkubation des NF1-Oligonukleotids mit Kernextrakten aus GR- und NIH 3T3-Zellen niedriger oder hoher Dichte konnte kein verändertes Bandenmuster festgestellt werden (vergleiche Abb. 3B, Spur 1 mit 2 und Spur 3 mit 4). Somit ergibt sich aus diesem Experiment ebenfalls keinen Anhaltspunkt dafür, daß die zelldichte-induzierte MMTV Expression in GR-Zellen durch eine erhöhte NF1-Menge in diesen Zellen reguliert wird.

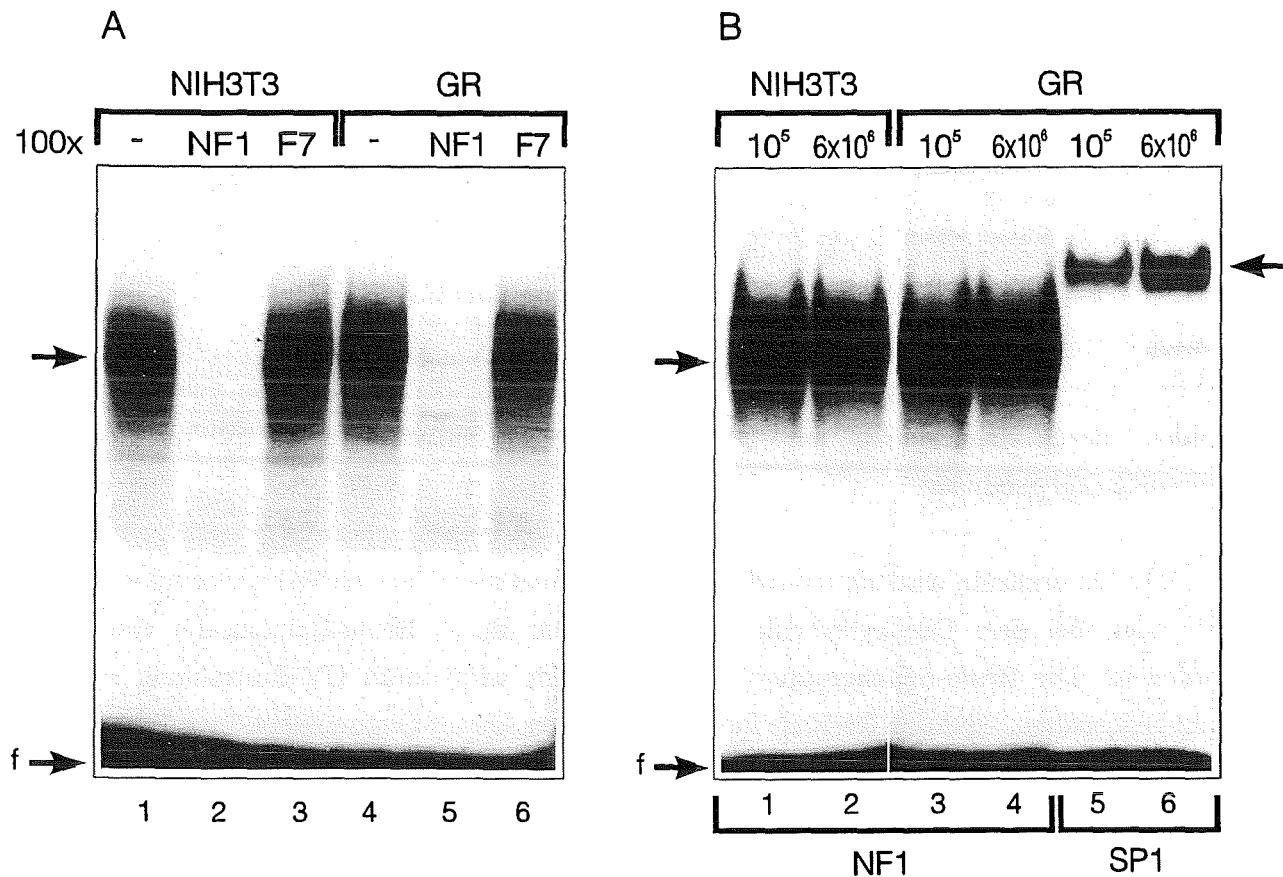


Abb. 3 Kernextrakte aus GR- und NIH 3T3-Zellen zeigen keinen Unterschied in der Bindungsaktivität zu dem NF1-Oligonucleotid. (A) Autoradiogramm einer Gelretardations-Analyse mit je 5 µg Kernextrakt aus konfluent wachsenden NIH 3T3- und GR-Zellen und 10 fmol (20000 cpm) endmarkiertem NF1-Oligonucleotid. Die angegebenen Kompetitoren (NF1 und F7) wurden in 100-fachem molaren Überschuß zugegeben. (B) Autoradiogramm einer Gelretardations-Analyse mit je 5 µg Kernextrakt aus GR-Zellen niedriger (1×10^5 Zellen/9 cm PS) und hoher Zelldichte (6×10^6 Zellen/9 cm PS) und 10 fmol (20000 cpm) endmarkiertem NF1- bzw. Sp1-Oligonucleotid. Die spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, das freie Oligonucleotid mit f.

Zur Kontrolle ob die Kernextrakte aus dünn und dicht angesetzten Zellen vergleichbar sind und ob die Konzentrationsbestimmung der Proteine korrekt erfolgt ist, wurden die Extrakte mit einem Oligonucleotid inkubiert, das die Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors Sp1 enthält. Sp1 ist ein ubiquitär auftretender Faktor, der konstitutiv exprimiert wird (Briggs et al. 1986). Daß mit beiden Kernextrakten eine Bande vergleichbarer Intensität entstanden ist, zeigt, daß die Qualität der Kernextrakte vergleichbar ist (Abb. 3B, Spur 5 und 6).

Da das Auflösungsvermögen des nativen Polyacrylamidgels der Gelretardations-Analyse gering ist, kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche der verschiedenen CTF/NF1-Spezies, die in den Kernextrakten enthalten sind, an das NF1-Oligonukleotid gebunden haben. Aus diesem Grund wurde ein "UV-Crosslink-Experiment durchgeführt, das eine genaue Größenbestimmung der am Oligonukleotid gebundenen Proteine ermöglicht.

2.1.2. "UV-Crosslink"-Analyse mit dem NF1-Oligonukleotid

Bei der "UV-Crosslink"-Analyse werden die in der Gelretardations-Analyse gebundenen Proteine durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent an das radioaktiv markierte Oligonukleotid gebunden.

Für diese Experimente wird ein radioaktiv markiertes und modifiziertes NF1-Oligonukleotid verwendet, bei dem Desoxythymidin in der Sequenz durch Brom-Deoxyuridin ersetzt worden ist. Die Brom-Seitengruppe dieses Nukleotids wird durch UV-Bestrahlung sehr leicht abgespalten, wodurch Radikale freigesetzt werden. Dieses Oligonukleotid wird für ein präparatives Gelretardations-Experiment mit Kernextrakt inkubiert. Nach der Auftrennung auf einem nativen Polyacrylamidgel werden die Protein/DNS-Komplexe im Gel mit UV-Licht bestrahlt. Die durch die UV-Bestrahlung freigesetzten Radikale führen zu einer kovalenten Verknüpfung der gebundenen Proteine mit der DNS. Durch Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm werden die Protein/DNS-Komplexe und die freien Oligonukleotide im Gel lokalisiert und ausgeschnitten. Diese Gelstücke werden in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels gesteckt und die Proteine werden elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine durch das Detergens SDS und durch Mercaptoethanol denaturiert und entfaltet. Das Mercaptoethanol, das wie SDS ein Bestandteil des Probenpuffers ist, löst durch Reduktion die Disulfid-Brücken der Proteine. Das SDS lagert sich gleichmäßig entlang der Aminosäurekette an und es entsteht ein Komplex mit nach außen gerichteten negativen Ladungen der Sulfat-Gruppen des SDS. Die Eigenladung der Proteine wird dadurch vernachlässigbar und die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt allein nach ihrer relativen Molekülmasse. Das Gel wird anschließend getrocknet und autoradiografiert. Durch die kovalente Verknüpfung mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden sind die gebundenen Proteine in dem Autoradiogramm sichtbar.

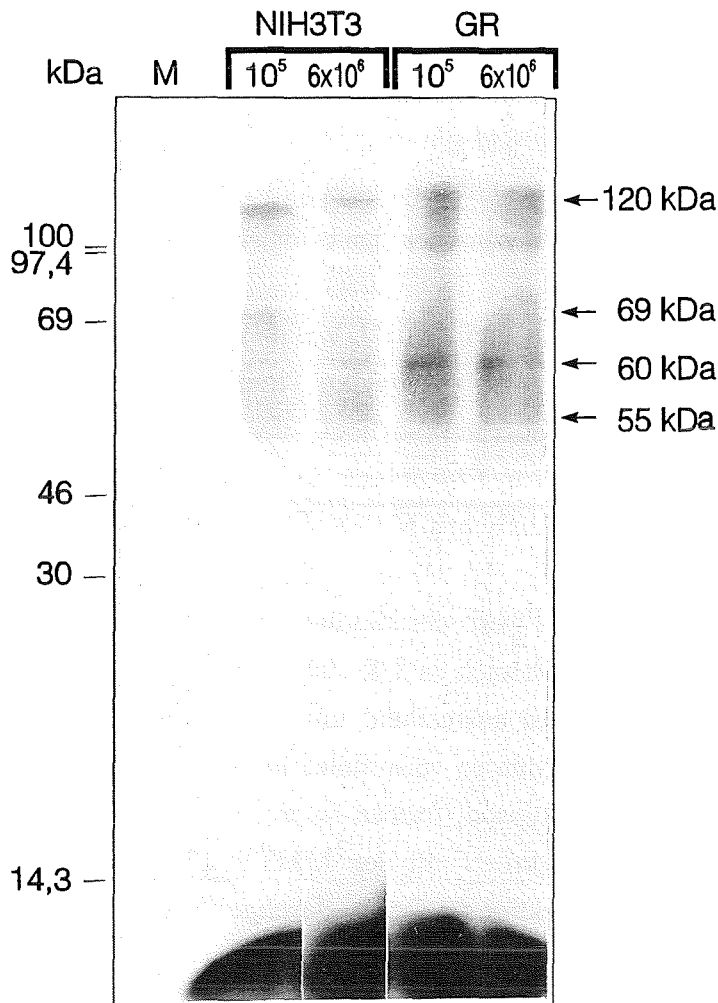


Abb. 4 An das NF1-Oligonukleotid binden verschiedene Spezies der CTF/NF1-Familie. Nach einem präparativen Gelretardationsexperiment mit 50 μ g Kernextrakt und 50 fmol (100000cpm) endmarkiertem modifiziertem NF1-Oligonukleotid wurden die Protein/DNS-Komplexe und das freie Oligonukleotid nach 30 min UV-Bestrahlung (304 nm) des Gels und Exposition auf einen Röntgenfilm ausgeschnitten und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Autoradiogramm des 10%igen Gels der SDS-PAGE M, Protein-Größenmarker. kDa, Einheit der Molekülmasse.

Abb. 4 dokumentiert das Ergebnis einer "UV-Crosslink"-Analyse mit dem NF1-Oligonukleotid. Nach der Auftrennung auf dem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden 4 Banden mit ca. 55, 60, 69 und 120 kDa gefunden. Die Bande bei ca. 12 kDa stammt von den freien Oligonukleotiden, die nicht mit Proteinen vernetzt wurden. Will man allein die Molekülmasse der Proteine bestimmen, so muß man die 12 kDa der freien Oligonukleotide abziehen und kommt so zu den relativen Molekülmassen von 43, 48, 57 und 108 kDa für die am Oligonukleotid gebundenen NF1-Faktoren. Diese Größen stimmen mit den in der Literatur veröffentlichten Größen für NF1-Proteine überein (Rosenfeld et al., 1986; Jones et al., 1987). Bei der größten Bande von 108 kDa handelt es sich wahrscheinlich um ein Dimer zweier NF1-Proteine, die beide an die palindromische Erkennungssequenz des NF1-Oligonukleotids binden und die beide mit dem Oligonukleotid vernetzt wurden (Mermod et al., 1989; Gounari et al., 1990).

Vergleicht man das Bandenmuster, das mit Extrakten aus NIH 3T3- und GR-Zellen erreicht wurde, so sind keinerlei Unterschiede sichtbar. Weder im Bezug auf die Zelldichte-Induktion (vergleiche Spur 1 mit 2 und Spur 3 mit 4), noch bezüglich der Zelltypspezifität (vergleiche Spur 2 mit 4) Zwischen den beiden Zelldichten der NIH 3T3-Zellen (Spur 1 und 2) scheint ein kleiner Unterschied zu bestehen, der jedoch nicht reproduzierbar ist. Dieses Experiment zeigt, daß verschiedene NF1-Spezies aus GR- und NIH 3T3-Zellen an die NF1-Sequenz binden. Es besteht jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Zelltypen

Aus den Resultaten der Gelretardations-Analysen und dem "UV-Crosslink"-Experiment ist ersichtlich, daß kein mengenmäßiger Unterschied der beiden Transkriptionsfaktoren NF1 und OTF-1 in den unterschiedlichen Zelltypen vorliegt, der für die erhöhte Expression in GR-Zellen verantwortlich ist. Diese Ergebnisse geben ebenfalls keinen Hinweis für das Vorhandensein einer mammaspezifischen NF1-Spezies.

Die Mutationsanalyse des HRE hat die Notwendigkeit der Bindungsstellen für NF1 und OTF-1 für die zelldichte-induzierte höhere Expression in GR-Zellen gezeigt. Es wurde jedoch nicht überprüft, ob diese beiden Faktoren ausreichen, um die zelltypspezifische Expression des pHCwt in GR- und NIH 3T3-Zellen zu vermitteln. Es ist daher möglich, daß weitere Faktoren an der Regulation der zelltypspezifischen Expression beteiligt sind, die bislang nicht identifiziert wurden. Daher wurden mit den MMTV LTR-Sequenzen von Position -245 bis +122 DNase I-Protektionsanalysen durchgeführt, um nach weiteren Proteinbindungsstellen zu suchen.

2.1.3. DNase I-Protektionanalyse

Mit Hilfe der DNase I-Protektionsanalyse ist es möglich, längere Sequenzbereiche auf die Bindung von Proteinen hin zu untersuchen. Dabei wird ein an einem Ende radioaktiv markiertes DNS-Fragment mit Kernextrakt inkubiert und anschließend mit der Endonuklease DNase I verdaut. Die Menge an DNase I wurde dabei so gewählt, daß jedes Fragmentmolekül durchschnittlich nur einmal geschnitten wird. Durch diesen Verdau entsteht eine Mischung von Fragmenten unterschiedlicher Länge, die, wenn man sie mit Hilfe der Gelelektrophorese analysierte, auf dem Autoradiogramm eine Leiter von verschieden langen Banden ergibt. Binden Proteine an die DNS-Fragmente, so sind diese DNS-Bindungsgebiete vor dem Verdau mit DNase I geschützt. In der Mischung der Verdauprodukte fehlen dann die Fragmente, die durch Verdau innerhalb der Proteinbindungsstellen entstanden wären. Dadurch entsteht ein "Fenster" in der Leiter der

Banden. Diese Methode wird "footprint"-Analyse genannt, weil das Protein eine Art Fußabdruck hinterläßt. Zur genauen Lokalisation der DNase I-Schnittstellen wird parallel zur DNase I-Protektionsanalyse eine Sequenzierung des markierten Fragments durch basenspezifische Spaltung nach Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt und aufgetragen.

Für die Analyse des MMTV HRE wurde ein Fragment gewählt, das die gesamten Sequenzen von -235 bis +122 enthält. Das Fragment wurde mit steigenden Mengen von Kernextrakt aus dicht gewachsenen GR- und NIH 3T3-Zellen inkubiert.

In Abb. 5 ist die DNase I-Protektionsanalyse des kodierenden DNS-Stranges zu sehen. Besonders deutlich zu erkennen ist ein Fenster im Bindungsbereich von NF1 (Position -62/-75), das mit Extrakten aus GR- und NIH 3T3-Zellen gleichermaßen entsteht (vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 1; vergleiche Spur 5 und 6 mit Spur 4). Dieses Resultat wurde aufgrund der Gelretardations-Experimente erwartet. Im Gegensatz dazu ist keine Bindung bzw. eine sehr schwache Protektion an den Oct-Sequenzen zu erkennen, was sich jedoch durch die geringe Affinität von OTF-1 zu den degenerierten Octamer-Bindungsstellen im MMTV erklären läßt (Brüggemeier et al., 1991).

In diesem Ergebnis zeigt sich die geringere Sensitivität der DNase I-Protektionsanalyse im Vergleich zu dem Gelretardations-Experiment. Bei der Gelretardation werden schon geringe Mengen an Protein durch das unterschiedliche Laufverhalten von freiem und gebundenen Oligonukleotid sichtbar, während bei der DNase I Protektion über 50% der markierten Fragmente mit Protein besetzt sein müssen, um eine Veränderung im Verdauemuster sichtbar werden zu lassen. Deutlich sichtbar werden die Fenster jedoch erst, wenn nahezu alle markierten Fragmente von Proteinen gebunden werden.

Zwischen Position -151 und -164 ist nach Inkubation des Fragments mit NIH 3T3-Extrakt eine weitere Veränderung des Bandenmusters erkennbar, einige Banden sind in den Ansätzen mit Protein protektiert (vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 1). In den Ansätzen mit GR-Extrakt bleibt dieser Bereich auch nach Inkubation mit Protein unverändert (Spur 4,5,6). Diese Veränderungen mit Extrakt aus NIH 3T3-Zellen weisen auf die Bindung eines neuen Faktors hin, der zunächst mit Fp (von "footprint") bezeichnet wird und der zelltypspezifisch nur in NIH 3T3-Zellen an die DNS bindet.

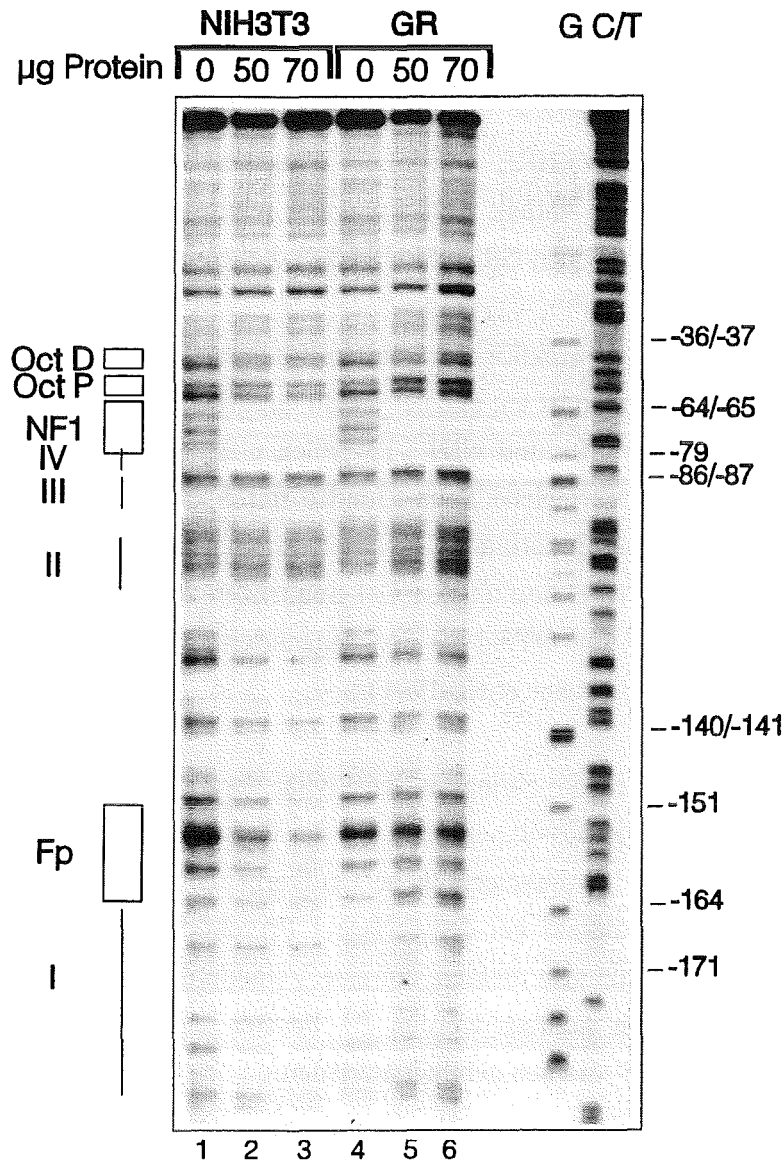


Abb. 5 Neben NF1 und OTF-1 bindet noch ein weiterer Faktor an das HRE. Autoradiogramm einer DNase I-Protektionsanalyse des kodierenden DNS-Stranges eines an einem Ende radioaktiv markierten Fragments des pHCwt-Plasmids. Das Plasmid wurde zuerst mit Hind III (-235) verdaut, durch Auffüllen der überhängenden Enden mit radioaktiven Nukleotiden markiert und dann mit Xho I (+122) nachgeschnitten. Das Fragment wurde mit steigenden Mengen Kernextrakt aus konfluenten NIH 3T3- und GR-Zellen inkubiert und mit 0,5 bis 2U DNase I verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. G,C/T bezeichnet die Spuren der Sequenzierung durch G- bzw. C/T-spezifische Spaltung des Fragments (Maxam und Gilbert, 1980). Die Kästchen geben die Positionen der Bindungsstellen OctP, OctD, NF1 und des neuen Faktors FP an. Die Linien geben die Positionen der Hormonrezeptorbindungsstellen (I-IV) an.

Bei Betrachtung des nicht-kodierenden DNS-Stranges (Abb. 6A) ist wiederum deutlich die Bindung von NF1 sichtbar, die durch das Fehlen der Banden im Bereich zwischen Position -61 und -82 sichtbar wird. Die Bindung des NF1-Faktors wird nach Inkubation mit Kernextrakt sowohl aus GR- als auch aus NIH 3T3-Zellen festgestellt (vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 1; und vergleiche Spur 5 und 6 mit Spur 4). Wiederum ist keine Bindung an die Oct-Sequenzen zu erkennen. Aber im Bereich zwischen -151 und -164, in dem sich bereits Veränderungen am kodierenden Strang ergaben, ist bei der Analyse mit Extrakt aus NIH 3T3-Zellen eine hypersensitive Bande zu erkennen (vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 1). Diese hypersensitive Bande ist wiederum zelltypspezifisch nur mit NIH 3T3-Extrakt sichtbar und nicht mit Extrakt aus GR-Zellen (Spur 4,5,6). Eine solche Verstärkung bestimmter Banden wird, wie die Protektion, ebenfalls auf die spezifische Bindung eines Proteins zurückgeführt. Das gebundene Protein verursacht hierbei wahrscheinlich eine Deformierung der DNS, die zu einem bevorzugten Verdau durch die DNase I an einer zu dem Protein benachbarten Stelle führt.

Um eine bessere Auflösung im Bereich um die hypersensitive Bande zu erhalten, wurde die DNase I-Protektionsanalyse des nicht-kodierenden Stranges mit einem kürzeren DNS-Fragment wiederholt (Abb. 6B). Mit diesem Fragment sind nach Inkubation mit NIH 3T3-Kernextrakt deutliche Veränderungen im Bandenmuster zu erkennen. Zwei hypersensitive Stellen bei -151 und -164 begrenzen die Bindungsstelle des Faktors Fp und bei Position -157 ist eine leichte Protektion zu erkennen (vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 1). Aber auch bei besserer Auflösung der Bindungsregion des neuen Faktors Fp ist mit dem Extrakt aus GR-Zellen keine Veränderung zu sehen (vergleiche Spur 5 und 6 mit Spur 4). Diese Daten sprechen für eine zelltypspezifische Bindung des Faktors Fp in der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3.

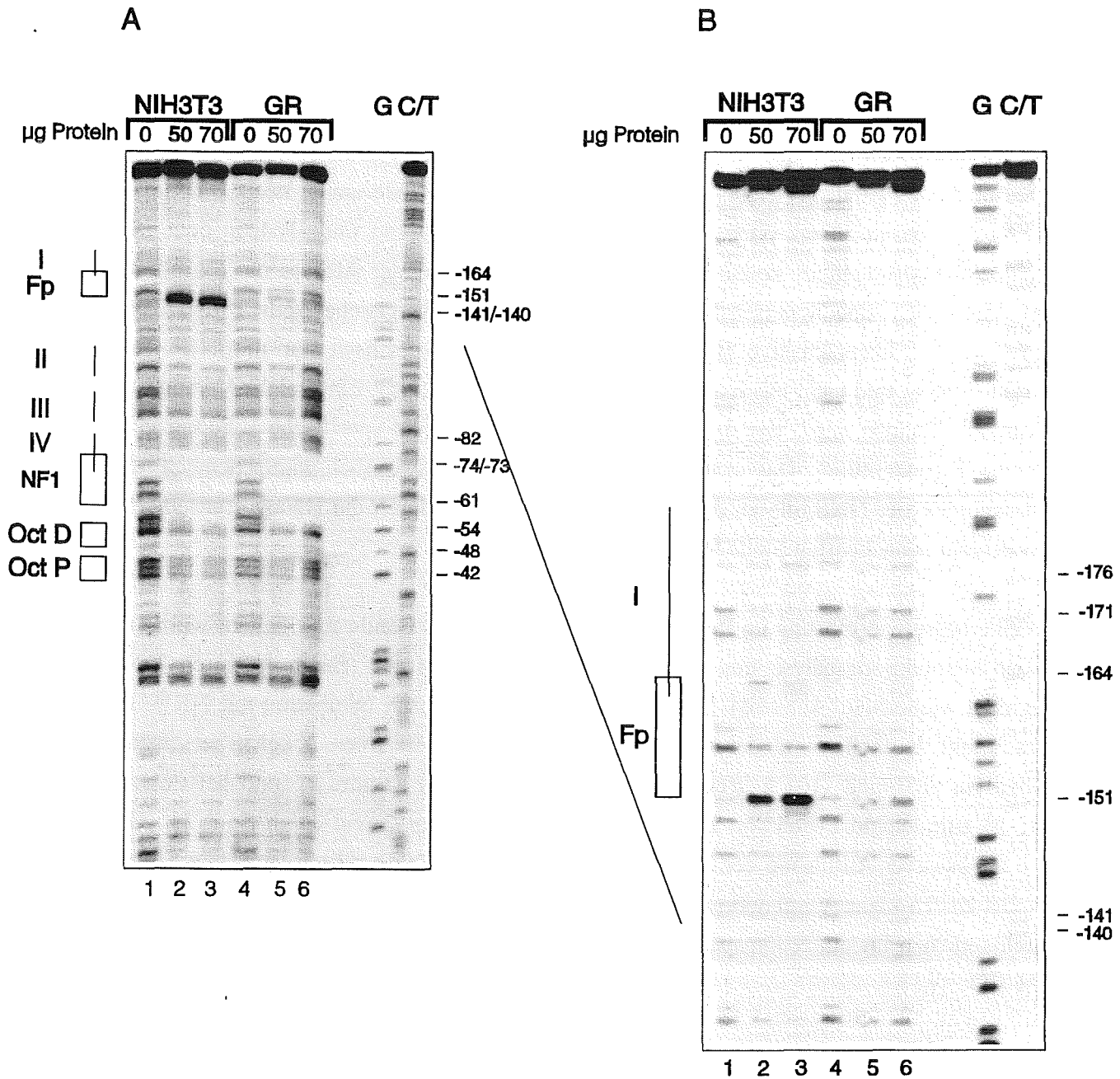


Abb. 6 Neben NF1 und OTF-1 bindet noch ein weiterer Faktor an das HRE. (A) DNase I-Protektionsanalyse des nicht-kodierenden DNS-Stranges mit einem einseitig markierten Fragment des pHCwt Plasmids. Das Plasmid wurde zuerst mit Xho I (+122) verdaut, durch Auffüllen der überhängenden Enden mit radioaktiven Nukleotiden markiert und dann mit Hind III (-235) nachgeschnitten. (B) DNase I-Protektionsanalyse des nicht-kodierenden DNS-Stranges mit einem einseitig markierten Fragment des pHC10 Plasmids. Das Plasmid wurde zuerst mit Cla I (-70) verdaut, durch Auffüllen der überhängenden Enden mit radioaktiven Nukleotiden markiert und dann mit Hind III (-235) nachgeschnitten. Die Fragmente wurden mit steigenden Mengen Kernextrakt aus konfluent gewachsenen NIH 3T3- und GR-Zellen inkubiert und mit 0,5 bis 2U DNase I verdaut. Die Verdauprodukte wurden auf einem 8 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. G,C/T bezeichnet die Spuren der Maxam & Gilbert Sequenzierung der Fragmente. Die Kästchen geben die Positionen der Bindungsstellen OctP, OctD, NF1 und des neuen Faktors FP an. Die Linien geben die Positionen der Hormonrezeptorbindungsstellen (I-IV) an.

Mit Hilfe der DNase I-Protektionsanalyse konnte erneut die Bindung von NF1 in der Region des HRE gezeigt werden, die jedoch in Gr- und NIH 3T3-Zellen gleichermaßen erfolgt. Durch diese Bindungsstudie wurde außerdem ein neuer Faktor Fp entdeckt, der zwischen Position -151 und -164 im Bezug zur Transkriptionsstartstelle im MMTV LTR binden kann. Die Bindung dieses neuen Faktors kann nur in NIH 3T3-Zellen festgestellt werden. Mit Hilfe der DNase I-Protektionsanalyse konnte somit auf der Ebene der Proteinbindung ein zelltypspezifischer Unterschied zwischen GR- und NIH 3T3-Zellen gefunden werden.

Als Mechanismus der zelltypspezifischen Expression des MMTV kann ein Repressor postuliert werden, der die Expression in den Fibroblasten unterdrückt. Die zelltypspezifische Bindung des neu gefundenen Faktors Fp macht diesen Faktor zu einem guten Kandidaten für einen zelltypspezifischen Repressor. Zur Überprüfung dieser Hypothese muß die Funktion des Fp-Faktors festgestellt werden.

Zunächst wurde jedoch auch durch *in vivo* Bindungsanalysen überprüft, ob zelltypspezifische Unterschiede zwischen NIH 3T3- und GR-Zellen bestehen, die durch die *in vitro* Analysen nicht feststellbar sind. Von besonderem Interesse ist dabei die Bindung des neuen Faktors Fp.

2.2. *In vivo* Bindungsstudien

2.2.1. Genomische "footprint"-Analyse der Sequenzen von -245 bis +122 des MMTV LTR

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der MMTV-Regulation zum ersten Mal die genomische "footprint"-Analyse angewandt. Durch diese Methode ist es möglich, die Bindung von Transkriptionsfaktoren unmittelbar in der Zelle zu studieren, da die intakte Zelle behandelt wird und nicht mit isolierter DNS oder Zellkernen gearbeitet wird. In dieser Analyse wird der Einfluß der Chromatinverpackung der genomischen DNS auf die Protein/DNS-Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren berücksichtigt.

Die Technik beruht auf spezifischer Methylierung der Purine in der genomischen DNS der Zelle. Bindet an die DNS in der Zelle ein Transkriptionsfaktor, so wird die

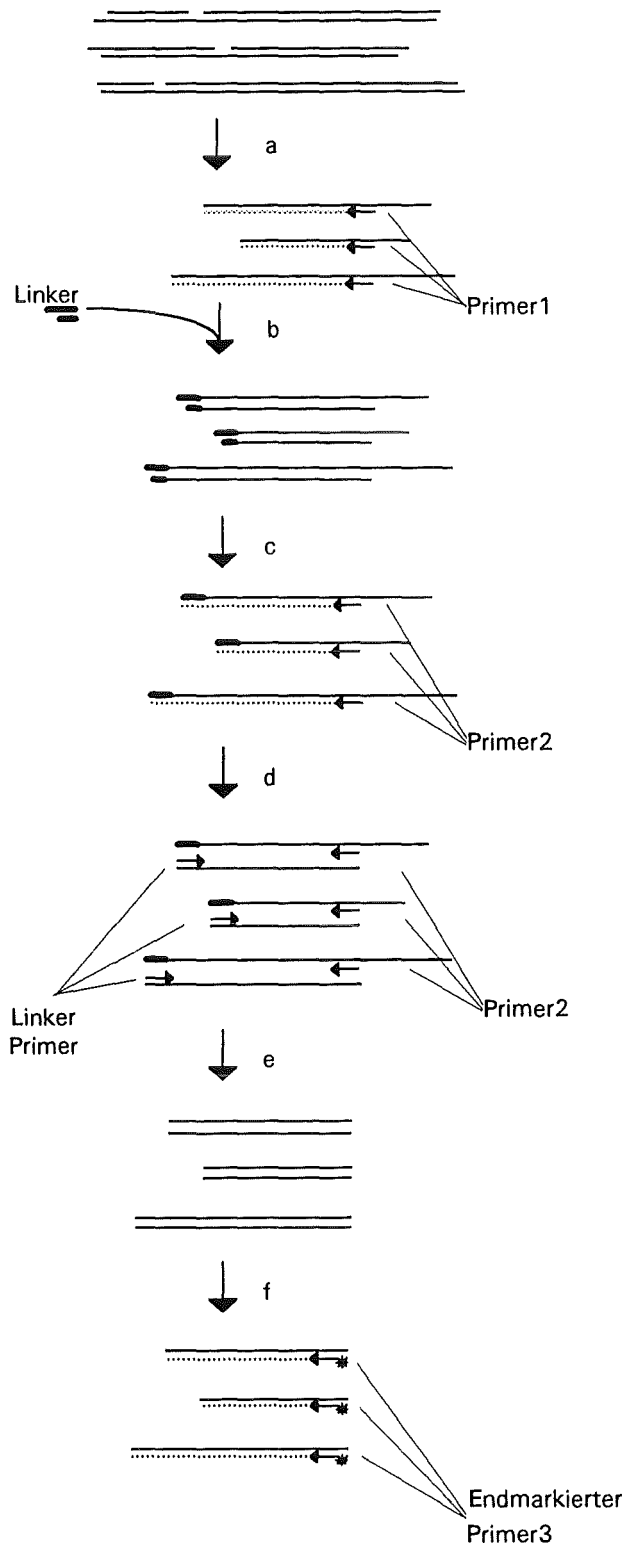
Erkennungssequenz des Faktors durch die spezifische Bindung vor Methylierung geschützt. Die methylierte DNS wird anschließend aus den Zellen präpariert und einer spezifischen Spaltung durch Piperidin unterzogen. Eine Proteinbindung wirkt sich somit letztendlich in einem veränderten Spaltungsmuster der DNS aus: Wird ein Purin durch spezifische Proteinbindung vor Methylierung geschützt, so tritt das Fragment, das nach Spaltung an diesem Nucleotid entstehen würden, seltener auf. In der Nachbarschaft spezifisch bindender Proteine kann es jedoch auch zu verstärkten Methylierungen kommen. In diesem Fall entstehen hypersensitive Stellen die verstärkt gespalten werden.

Die Zellen werden direkt mit Dimethylsulfat (DMS) als DNS-methylierendes Agens behandelt (Maxam und Gilbert, 1980). DMS diffundiert sehr rasch in die Zelle und den Zellkern (Church und Gilbert, 1984), methyliert dort bevorzugt die N7-Position des Guanin in der großen DNS-Rinne und mit geringerer Effizienz auch die N3-Position von Adeninresten in der kleinen DNS-Rinne. Die Behandlungsdauer und Konzentration an DMS wird so gewählt, daß es zu einer partiellen Methylierung der genomischen DNS kommt. Spezifische Proteinbindung an der DNS kann die Methylierung der DNS-Basen entweder abschwächen oder verstärken (Gilbert et al., 1976; Ogata und Gilbert, 1978). Die DNS wird anschließend an den methylierten Stellen spezifisch durch Piperidin gespalten (Maxam und Gilbert, 1980). Parallel zu dieser *in vivo* methylierten DNS wird auch genomische DNS aus unbehandelten Zellen präpariert und anschließend mit DMS modifiziert. Bei dieser *in vitro* methylierten DNS wird das Spaltungsmuster allein durch die Sequenz bestimmt. Die Spaltprodukte werden mit Hilfe der ligationsvermittelten Polymerasekettenreaktion ("ligation mediated polymerase chain reaktion", LMPCR) (Mueller und Wold, 1989) selektiv amplifiziert und radioaktiv markiert. Abb. 7 gibt einen schematischen Überblick über diese Technik.

Nach Auftrennung der Produkte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel und direktem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* methylierten DNS wird sichtbar, wo es aufgrund spezifischer Proteinbindung zu Unterschieden in den Fragmentmustern kommt. Die geringen Unterschiede in den Fragmentmustern sind nur dann sichtbar, wenn vergleichbare Mengen an radioaktiv markierten Fragmenten auf das Gel aufgetragen werden. Eine Schwierigkeit dieser Technik liegt darin, die Bedingungen der Isolierung der genomischen DNS und Amplifikation der Fragmente so zu wählen, daß in den einzelnen Ansätzen wirklich vergleichbare Mengen an Fragmenten entstehen.

Abb. 7 Schematische Darstellung der genomischen "footprint"-Analyse durch ligationsvermittelte PCR (nach Mueller und Wold 1989).

Ausgangsmaterial ist genomische DNS, die nach *in vitro*- bzw. *in vivo*-Methylierung mit Piperidin gespalten wurde. Dies führt zu 5' und 3' endständigen Phosphaten. Im ersten Schritt (a) wird durch Hybridisierung des ersten genspezifischen Oligonukleotids (Primer 1) das Ende der Fragmente festgelegt. Nach Verlängerung dieses Primers bis zur jeweiligen Spaltungsstelle (gepunktete Linie) entsteht eine Population von DNS-Duplexmolekülen mit glatten Enden. An diese glatten Enden wird mit T4 DNS-Ligase ein spezieller Linker ligiert, wodurch jedes dieser Moleküle ein definiertes Ende erhält (b). Der überwiegende Teil der genomischen DNS dient nicht als Substrat für die Ligation, da er keine glatten, doppelsträngigen Enden aufweist. Der Linker besitzt auf der einen Seite überhängende Enden, womit Selbstligation vermieden wird und die Ligation nur in einer Orientierung erfolgen kann. Nach Hybridisierung eines zweiten genspezifischen Primers (Primer 2) (c) und erneuter Strangverlängerung, erhält man DNS-Fragmente, die nun klar definierte Enden besitzen; den Linkerprimer auf der einen und den Primer 2 auf der anderen Seite (d). Diese Konstellation ermöglicht nun die Amplifikation dieser Fragmente durch PCR mit dem Linkerprimer und dem Primer 2 (e). Die so amplifizierten Fragmente werden nach Hybridisierung mit einem ^{32}P -markierten dritten Primer (Primer 3) und anschließender Strangverlängerung radioaktiv markiert (f). Die Fragmente werden anschließend nach Auftrennung über ein denaturierendes Polyacrylamidgel durch Autoradiographie sichtbar gemacht



In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Faktoren NF1, OTF-1 und Fp in NIH 3T3-Zellen *in vivo* an die genomische DNS binden. Des Weiteren wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen NIH 3T3 und GR bestehen, die in den *in vitro* Bindungsstudien nicht festzustellen waren und die die erhöhte Expression in GR-Zellen erklären können.

Prinzipiell könnte man mit dieser Methode direkt die Regulation der endogenen MMTV-Kopien untersuchen. NIH 3T3- und GR-Zellen besitzen jeweils mehrere endogene Kopien der proviralen DNS des MMTV. In NIH 3T3-Zellen wird diese provirale DNS jedoch nicht transkribiert. In GR-Zellen ist nur von zwei der acht Kopien bekannt, daß sie transkriptionell aktiv sind. Da bei der genomischen "footprint"-Analyse jedoch alle endogenen Sequenzen untersucht werden und nicht zwischen aktiven und inaktiven proviralen Sequenzen unterschieden werden kann, wurden für diese *in vivo* "footprint"-Analyse stabil, mit dem pHcwt Konstrukt, transfizierte Einzelklone von GR- und NIH 3T3-Zellen verwendet. Dabei wurden Klone ausgewählt, die nur eine bis drei Kopien des Konstrukts aufgenommen hatten. Die transkriptionelle Aktivität wurde durch einen CAT-Assays getestet.

Die genspezifischen Primer für die selektive Amplifikation wurden so gewählt, daß sie, für den nicht-kodierenden DNS-Strang spezifische Sequenzen im Vektor vor der MMTV-Sequenz erkennen und für den kodierenden DNS-Strang Sequenzen innerhalb des CAT-Gens. Damit wurde gewährleistet, daß nur die transfizierten MMTV CAT-Konstrukte bei der Analyse erfaßt werden und nicht die endogenen MMTV Sequenzen.

Zur besseren Orientierung sind in Abb. 8 die MMTV Sequenzen des pHcwt Konstrukts, die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren NF1, OTF-1, Fp und der Glukokortikoidrezeptoren, sowie die Positionen der genspezifischen Primer in der Sequenz dargestellt.

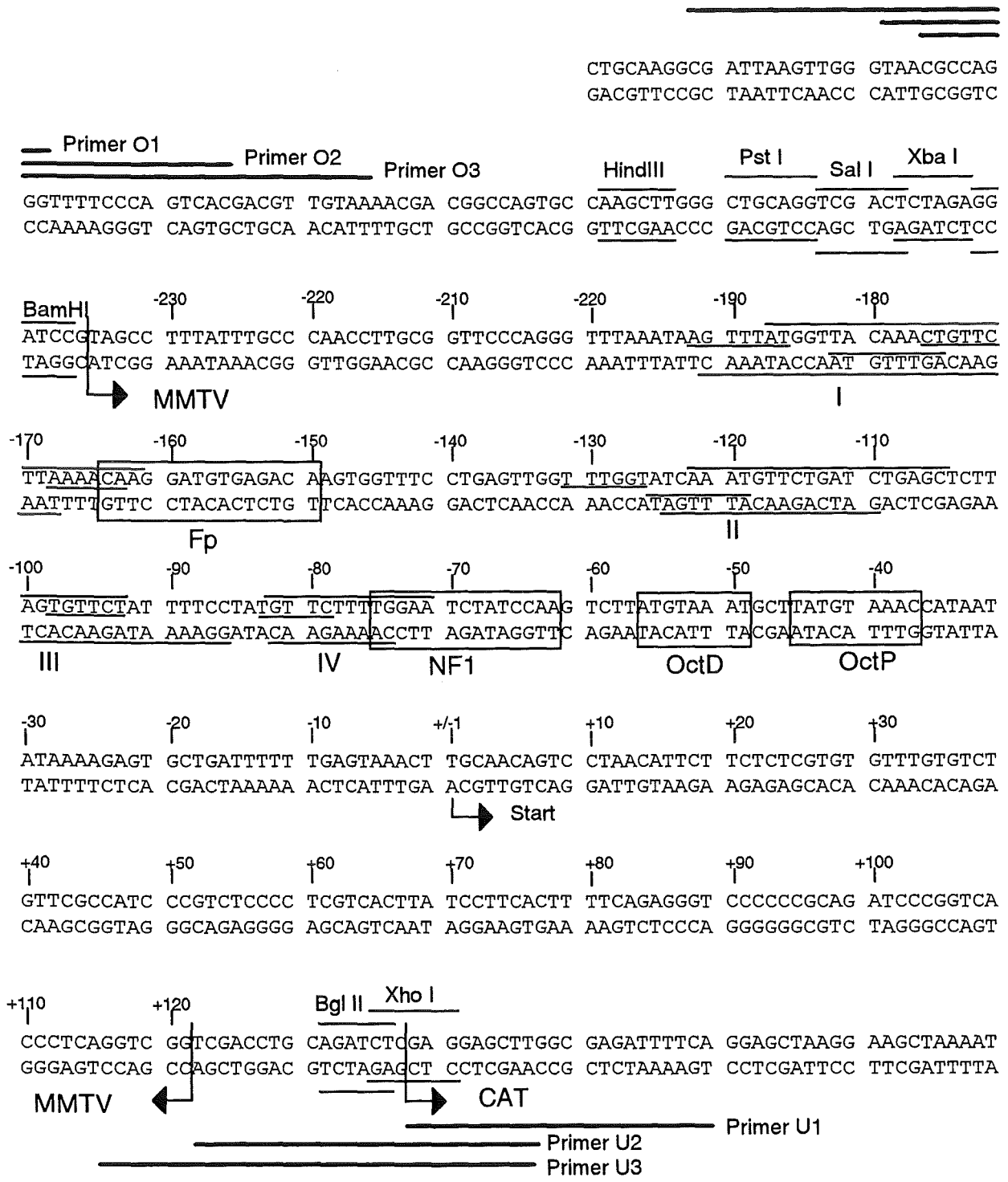


Abb.8 Positionen der für die ligationsvermittelte PCR verwendeten genspezifischen Primer in der Sequenz des pHCwt Konstrukts. Die Zahlen über der Sequenz bezeichnen die Nukleotidpositionen der MMTV Sequenz bezogen auf den Startpunkt der Transkription (+/-1). Die dicken Linien über der Sequenz stehen für die Primer des nicht-kodierenden DNS-Stranges (Primer O1-O3), die dicken Linien unter der Sequenz für die Primer des kodierenden DNS-Stranges (Primer U1-U3). Die Kästchen geben die Positionen der Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren OTF-1, NF1 und Fp an. Die dünnen Linien bezeichnen die Positionen der Hormonrezeptorbindungsstellen I-VI. Ferner sind die Restriktionsschnittstellen der Klonierungsregion des Plasmids eingezeichnet.

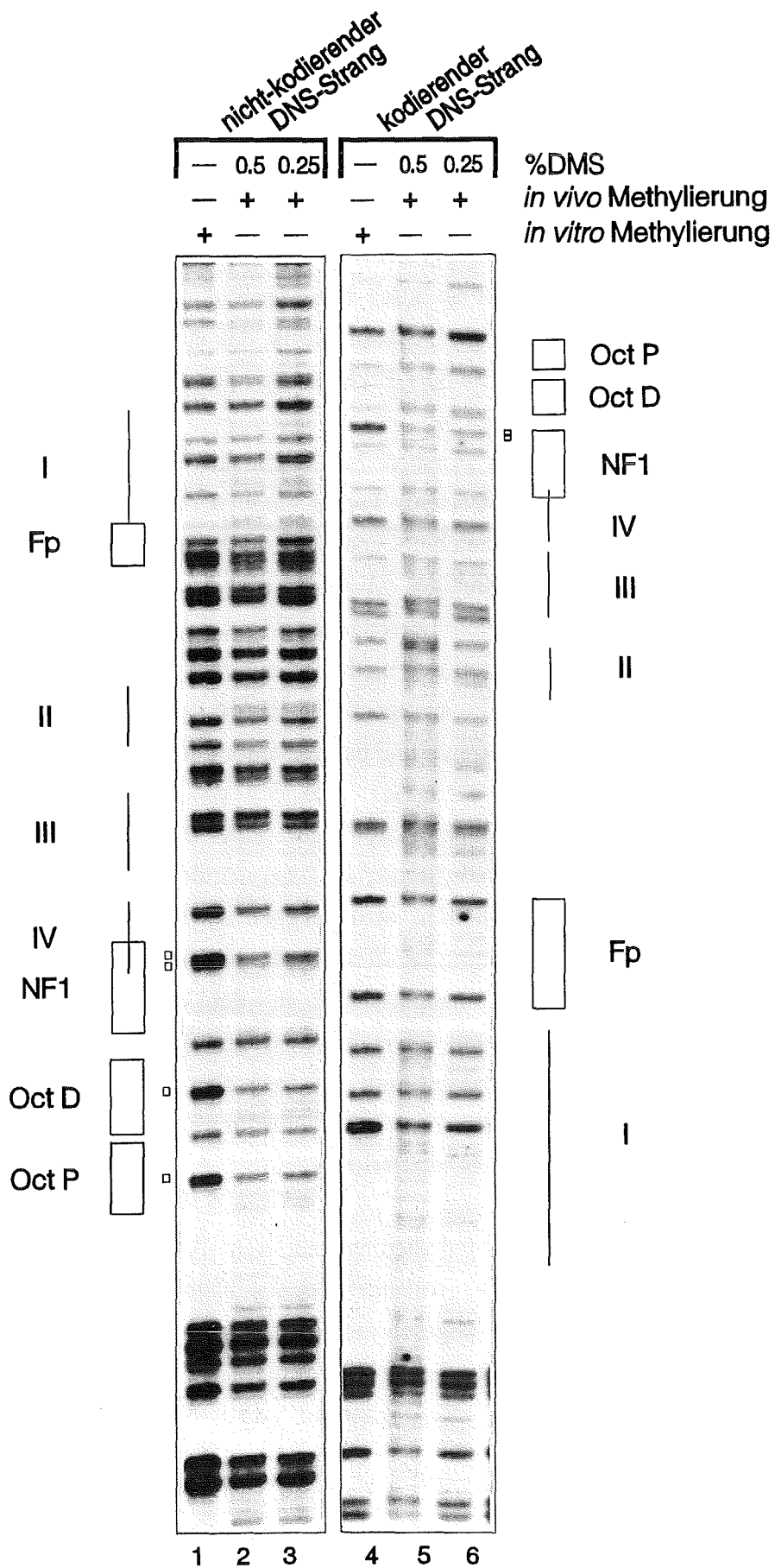
Um die optimalen Bedingungen für die *in vivo* Methylierung herauszufinden wurden zwei verschiedene Konzentrationen an DMS eingesetzt, 0,5 % und 0,25 %. Die Behandlungszeit blieb in beiden Fällen mit 2 Minuten unverändert. Zu hohe Konzentrationen an DMS können auch Stellen in der DNS methylieren an die Proteine gebunden haben.

Vergleicht man bei dieser genomischen "footprint"-Analyse mit NIH 3T3-Zellen die *in vitro* mit der *in vivo* methylierten DNS des nicht-kodierenden DNS-Stranges, so sieht man im Bereich der NF1-Bindungsstelle eine Abschwächung zweier Banden bei Position -73/-74 (siehe Abb. 9, Spur 1 und Spur 2). Im Bereich der Oct-Bindungsstellen ist jeweils ein Guanin vor Methylierung geschützt (Position -54 und -42). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß diese Bindungsstellen *in vivo* von Transkriptionsfaktoren besetzt sind. Vergleicht man das Bandenmuster, das mit 0,5 % bzw. 0,25 % DMS entstanden ist, so ist kein Unterschied festzustellen (vergleiche Spur 2 mit Spur 3).

Betrachtet man nun die Bindungsregion des neuen Faktors Fp, so sind die Guanine in der Bindungsregion nicht beeinflusst. Es sind keine Unterschiede zwischen *in vitro* methylierter und *in vivo*-behandelter DNS zu erkennen (vergleiche Spur 1 mit Spur 2 und 3). Eine Erklärung für diese Ergebnis ist, daß dieser Faktor *in vivo* doch nicht in der Lage ist an die DNS zu binden da beispielsweise die Chromatinstruktur in NIH 3T3-Zellen verändert ist. Es wäre aber auch möglich, daß die Bindungsaffinität des Fp-Faktors zu gering ist, um die Methylierung der DNS *in vivo* zu beeinflussen.

Vergleicht man die *in vitro* und *in vivo* methylierte DNS des kodierenden Stranges, so ist im Bereich der NF1 Bindestelle eine Protektion der beiden Guanine bei Position -64/-65 zu erkennen (vergleiche Spur 4 mit Spur 5 und 6). Das Bandenmuster im Bereich der Oct-Bindungsstellen und dem Fp-Faktor bleibt unverändert, da im kodierenden DNS-Strang innerhalb dieser Bindungsstellen keine Guanine vorkommen.

Abb. 9 Ein Faktor der CTF/NF1-Familie und OTF-1 binden *in vivo* an die Bindungsstellen im MMTV LTR. Autoradiogramm einer *in vivo* "footprint"-Analyse der MMTV-Sequenzen im pHcwt Konstrukt. Isolierte genomische DNS aus unbehandelten Zellen wurde *in vitro* für 20 Sekunden mit 0,5% DMS behandelt (*in vitro* Methylierung). Intakte Zellen wurden für 2 min mit 0,5 % bzw. 0,25 % DMS behandelt (*in vivo* Methylierung). Die methylierte DNS wurde mit Piperidin gespalten und die entstandenen Fragmente durch die ligationsvermittelte PCR amplifiziert und radioaktiv markiert. Die markierten Fragmente wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert. Die Kästchen neben der Sequenz geben die Positionen der Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren NF1, OTF-1 und Fp an. Die Linien zeigen die Positionen der Hormonrezeptorbindungsstellen (I-VI) an. Die leeren Quadrate zeigen die protektierte Guanine an (□).



Diese genomische "footprint"-Analyse konnte zeigen, daß die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren CTF/NF1 und OTF-1 *in vivo* von Proteinen besetzt sind. Um nachzuweisen, daß *in vivo* ein Faktor der CTF/NF1-Familie und nicht irgendein anderer Faktor an die NF1-Erkennungssequenz bindet, wurde ein Methylierungsinterferenz-Experiment durchgeführt. Durch diese Methylierungsinterferenz-Analyse kann man herausfinden, welche Guanine der Bindungsstelle zu den direkten Kontaktpunkten des Proteins mit der DNS gehören. Stimmen die durch diese Analyse charakterisierten Guanine mit denen aus dem genomischen "footprint" überein, so ist das ein Hinweis dafür, daß *in vitro* und *in vivo* dieselben Faktoren an die NF1-Erkennungssequenz binden.

Das NF1-Oligonukleotid wurde jeweils an einem Ende radioaktiv markiert und mit DMS teilweise methyliert (Maxam und Gilbert, 1980). Dieses modifizierte Oligonukleotid wurde mit Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen inkubiert und nach Auftrennung der Protein/DNS-Komplexe auf einem nativen Polyacrylamidgel, wurde die spezifische Bande und das freie Oligonukleotid aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Oligonukleotide wurden nach der Elution aus dem Gel durch Piperidin spezifisch an den methylierten Basen gespalten (Maxam und Gilbert, 1980). Das entstandene Fragmentgemisch wurde auf einem 20 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel autoradiographiert.

Über die spezifische Protein/DNS-Bindungreaktion findet eine Auswahl der methylierten Oligonukleotide statt: Beeinflusst die Methylierung die Proteinbindung nicht, so entsteht ein spezifischen Komplex in der Geltretardation; wird dagegen ein spezifisches Guanin zur Bindung benötigt, so stört die Methylierung an dieser Stelle die Bindung des Proteins und das modifizierte Oligonukleotid ist hauptsächlich in der Population der freien Oligonukleotide zu finden. Nach Spaltung der isolierten Oligonukleotide entstehen durch diese Auswahl Unterschiede im Spaltungsmustern zwischen dem proteingebundenen und dem freien Oligonukleotid. Dieser Unterschied im Fragmentmuster zeigt auf welche der methylierten Basen mit der Proteinbindung interferieren.

Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Methylierungsinterferenz-Analyse mit dem NF1-Oligonukleotid. In den Ansätzen mit dem proteingebundenen Oligonukleotid sind am nicht-kodierenden DNS-Strang zwei Banden abgeschwächt, die in der Sequenz der Positionen -73 und -74 entsprechen, am kodierenden Strang sind es die Positionen -64 und -65. Diese Guanine stellen folglich wichtige Kontaktstellen der NF1-Proteine mit der Erkennungssequenz dar.

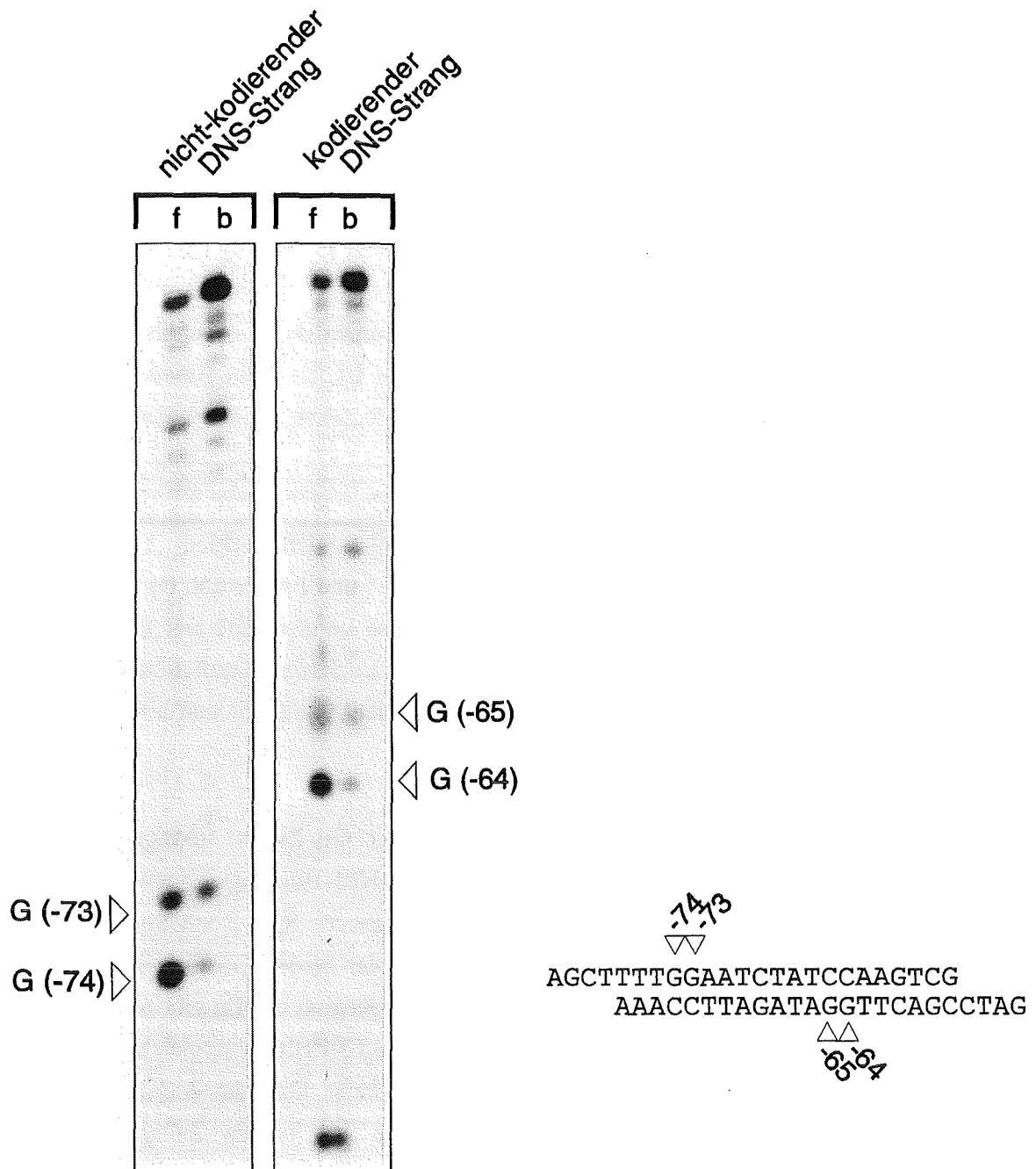


Abb. 10 Autoradiogramm einer Methylierungsinterferenz-Analyse des NF1-Oligonukleotids mit Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen. Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen wurde mit dem methylierten und jeweils an einem Ende radioaktiv markierten NF1-Oligonukleotid inkubiert. Nach Auftrennung der Protein/DNS-Komplexe auf einem nativen Polyacrylamidgel wurden der entstandene Komplexe und das freie Oligonukleotid durch Autoradiographie des Gels lokalisiert und ausgeschnitten. Nach Isolierung der Oligonukleotide aus dem Gel wurden sie durch Piperidin gespalten und die Fragmente auf einem 20 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Sequenz entspricht der des NF1-Oligonukleotids aus der Gelretardations-Analyse. Es wurden die Banden mit einem Pfeil markiert, die in den Ansätzen des proteingebundene Oligonukleotids (b) im Vergleich zu den Ansätzen mit dem freien Oligonukleotid (f) abgeschwächt vorliegen. Die Pfeile zeigen ebenfalls die Positionen der Kontaktstellen des spezifischen Proteins zu dem NF1-Oligonukleotid.

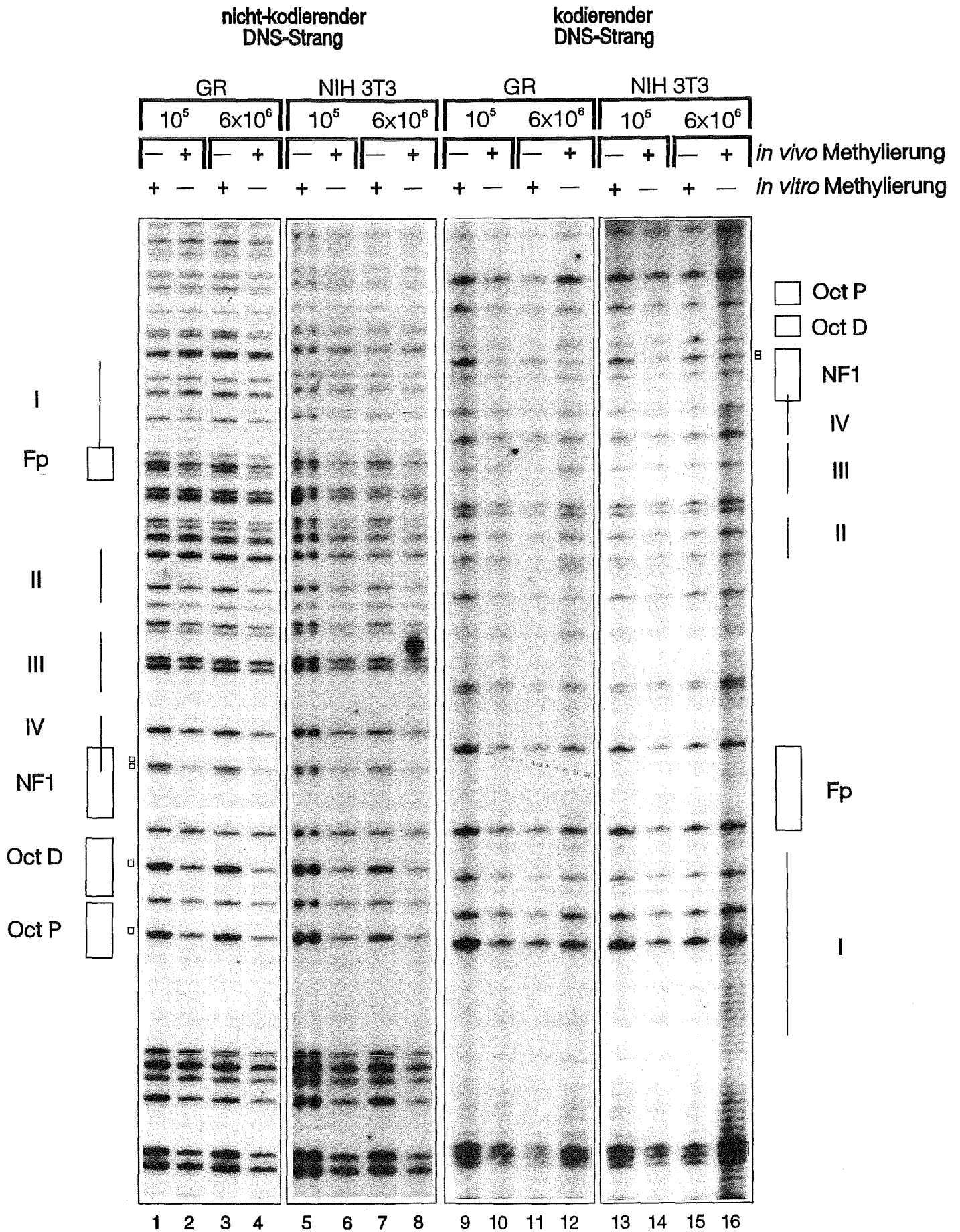
Dieses Ergebnis stimmt mit vergleichbaren Analysen überein, die in der Literatur für NF1-Bindungsstellen veröffentlicht wurden (de Vries et al., 1987). Da es dieselben Positionen sind, die durch die genomischen "footprint"-Analyse ermittelt wurden, kann man davon ausgehen, daß das Protein, das *in vivo* an die DNS bindet, zu der CTF/NF1 Familie gehört.

Vergleich man die Kontaktpunkte des Transkriptionsfaktor OTF-1 *in vitro* mit der DNS, wie sie in der Literatur veröffentlicht sind (Baumruker et al. 1988; Pruijn et al., 1988), mit denen aus dem *in vivo* "footprint"-Experiment, so stimmen diese ebenfalls überein. Die Schlußfolgerung aus dieser *in vivo* "footprint"-Analyse ist, daß die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren CTF/NF1 und OTF-1 in NIH 3T3-Zellen *in vivo* konstitutiv besetzt sind.

Um festzustellen, ob *in vivo* ein zelltypspezifischer Unterschied bezüglich der Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF1, OTF-1 und Fp besteht, der *in vitro* nicht zu erkennen war, wurde die *in vivo* "footprint"-Analyse vergleichend mit GR- und NIH 3T3-Zellen durchgeführt. Zur Analyse der zell-dichte-induzierten Regulation des MMTV wurde die Analyse auch mit Zellen niedriger (1×10^5 Zellen/ 9 cm PS) und hoher Zelldichte (6×10^6 Zellen/ 9 cm PS) durchgeführt.

Am nicht-kodierenden DNS-Strang ist in Abb. 11 mit GR-Zellen niedriger und hoher Zelldichte deutlich die Protektion der zwei Guanine der NF1-Bindungssequenz bei Position -73/-74 zu erkennen (vergleiche Spur 1 mit Spur 2; vergleiche Spur 3 mit Spur 4). Ebenso deutlich ist die Abschwächung der Banden im Bereich der beiden Guanine der Positionen -54 und -42 in den Oct-Bindungsstellen zu sehen. In der Region des Fp gibt es erneut keine Unterschiede. Dasselbe Ergebnis erhält man mit NIH 3T3-Zellen (vergleiche Spur 5 mit Spur 6; und Spur 7 mit Spur 8). Es bestehen folglich keine Unterschiede in der *in vivo*-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren zwischen den beiden Zelltypen und den verschiedenen Zelldichten.

Abb.11 NF1 und OTF-1 binden auch in Zellen niedriger Zelldichte *in vivo* an die Bindungsstellen im HRE. Genomische "footprint"-Analyse mit NIH 3T3- und GR-Zellen niedriger (1×10^5 Zellen/ 9 cm PS) und hoher Dichte (6×10^6 Zellen/9 cm PS). Die DNS wurde *in vitro* für 20 Sekunden mit 0,5% DMS behandelt (*in vitro* Methylierung). Intakte Zellen niedriger und hoher Zelldichte wurden für 2 min mit 0,5% DMS behandelt (*in vivo* Methylierung). Die methylierte DNS wurde mit Piperidin gespalten und die entstandenen Fragmente durch die ligationsvermittelte PCR amplifiziert und radioaktiv markiert. Die markierten Fragmente wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert. Die Kästchen neben der Sequenz geben die Positionen der Faktoren NF1, OTF-1 und Fp an. Die Linien zeigen die Positionen der Hormonrezeptorbindungsstellen (I-VI) an. Die leeren Quadrate stehen für protektierte Guanine (□).



Am kodierenden DNS-Strang ist wiederum bei beiden Zelldichten und beiden Zelltypen die Abschwächung der zwei Guanine der NF1-Bindestelle bei Position -64/-65 zu sehen (vergleiche Spur 9 mit 10, und Spur 11 mit 12 für die GR-Zellen; und Spur 13 mit 14 und Spur 15 mit 16 für die NIH 3T3-Zellen). Im Bereich der Oct- und Fp- Bindungsstellen treten keine Veränderungen auf, da in der Erkennungssequenz keine Guanine enthalten sind.

Die *in vitro* und *in vivo* DNS-Bindungsstudien dieser Arbeit zeigen, daß die Transkriptionsfaktoren NF1 und OTF-1 keine Unterschiede in der Bindungsaffinität in den beiden Zelltypen GR und NIH 3T3 aufweisen. Es liegen die gleichen Mengen an NF1 und OTF-1 in den beiden Zelltypen vor und es existiert keine zelltypspezifische Spezies dieser Faktoren in GR Zellen, die die zelldichte-induzierte höhere Expression des MMTV in GR Zellen vermittelt.

Es wurde ein neuer Faktor Fp gefunden, der zelltypspezifisch nur mit Extrakt aus NIH 3T3-Zellen einen DNase I-"footprint" ergibt. Die Tatsache, daß die Bindung des Fp-Faktor in den *in vivo* "footprint"-Analysen nicht zu sehen ist, zeigt noch nicht, daß er nicht in der Lage ist *in vivo* an die DNS zu binden. Genomische "footprint"-Experimente, bei denen die Hormoninduktion des MMTV untersucht wurde, konnten ebenfalls keine Bindung der aktivierten Hormonrezeptoren an die DNS zeigen, obwohl funktionelle Tests von Mutationen der Hormonrezeptorbindungsstellen zeigten, daß für die Hormoninduktion die Bindung des aktivierten Rezeptors an die DNS notwendig ist. Die Bindungsaffinität des aktivierten Rezeptors an die DNS ist jedoch zu gering, um mit dieser Methode die Bindung an die DNS festzustellen. Möglicherweise ist auch die Bindungsaffinität des Fp-Faktors zu gering um die Methylierung in der genomischen "footprint"-Analyse zu beeinflussen. Die funktionelle Bedeutung dieses Fp-Faktors für die Expression des MMTV wird in einem späteren Kapitel dieser Arbeit erörtert.

Zunächst wird jedoch mit Hilfe der Hypersensitivität der genomischen DNS gegenüber DNase I und der Restriktionsendonuklease Sac I die Chromatinstruktur des MMTV in NIH 3T3- und GR-Zellen untersucht. Mit diesen Analysen kann untersucht werden, ob die Chromatinstruktur des MMTV in NIH 3T3-Zellen überhaupt die Bindung von Transkriptionsfaktoren zuläßt oder ob sie sich in einem "inaktiven" Zustand befindet. Der Verpackungsgrad der DNS im Chromatin kann, über die Verfügbarkeit der DNS für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Genexpression regulieren.

2.2.2 Die Chromatinverpackung des MMTV LTR läßt Bindung von Transkriptionsfaktoren im Bereich des HRE zu

Die DNS der Eukaryonten liegt im Zellkern nicht isoliert vor, wie sie in den *in vitro* Experimenten verwendet wird. Sie liegt in einem Komplex mit Proteinen vor, den man als Chromatin bezeichnet. Bestandteile des Chromatins sind basische Proteine, die Histone, und die genomische DNS. Im intakten Chromatin ist die DNS in zwei superhelikalen Windungen um einen Proteinkern gewunden, der aus je zwei Molekülen der Histone H2a, H2b, H3 und H4 (Histon-Octamer) besteht. Die Verpackung erfolgt aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Struktur wird durch ein Molekül Histon H1 vervollständigt. Eine solche Struktureinheit wird als Nukleosom bezeichnet (Finch et al., 1975). Diese nukleosomenverpackte DNS wird weiter spiralig zu Fasern aufgewunden, wodurch eine sehr enge Packung des Chromatin entsteht (Felsenfeld und McGhee, 1986). Die Bindungen zwischen den Histonen und der DNS beruhen auf elektrostatischen Wechselwirkungen und sind relativ schwach, so daß die Methylierung der DNS durch DMS nicht beeinträchtigt wird. Daher sieht man im genomischen "footprint"-Experiment keinen Einfluß der Nukleosomen auf das Bandenmuster.

In einer solchen Verpackung ist die genomische DNS regulatorischen Proteinen nicht direkt zugänglich. Sie ist in einem "inaktiven" Zustand, da sie nicht transkribiert wird. Transkriptionel aktives Chromatin ist daher nicht so stark verpackt, was sich in einer Hypersensitivität der DNS gegenüber Nukleasen zeigt. Dieses "aktive" Chromatin wird zum Beispiel durch pankreatische DNase I, einer Endonuklease, leichter angegriffen, als fest verpacktes Chromatin (Elgin, 1988; Gross und Garrad, 1988). Dieser Effekt wird durch eine geänderte Struktur des Chromatin ermöglicht. Dabei ist nicht geklärt, ob die Nukleosomenstruktur aufgelöst oder nur verändert ist. Ebenfalls ungeklärt ist bislang die Regulation dieser veränderten Chromatinstruktur (Übersichtsartikel Felsenfeld 1992). Es gibt jedoch Hinweise, daß die Histone selbst an der Regulation des Verpackungsgrades beteiligt sind.

Eine Reihe von Veröffentlichungen berichten über die Organisation des MMTV LTR und den Einfluß der Chromatinstruktur auf die Hormoninduktion des MMTV. Danach ist der MMTV LTR in einer Folge von sechs Nukleosomen organisiert. Die Anordnung der Nukleosomen erfolgt dabei so, daß das HRE innerhalb des Nukleosom B zu liegen kommt und somit nicht direkt für die Bindung der aktivierten Hormonrezeptorproteine zugänglich ist (siehe Abb.12). Der hormoninduzierte Glukokortikoidrezeptor soll eine Verdrängung des Nukleosom B bewirken und ermöglicht dadurch die Bindung von NF1. (Richard-Foy und

Hager 1987, Codingley et al., 1987, Archer et al., 1992). Sowohl für die NF1- als auch für die benachbarten OTF-1-Bindungsstellen konnte gezeigt werden, daß sie für die Hormoninduktion des MMTV benötigt werden (Brüggemeier et al., 1990 und 1991)

MMTV LTR

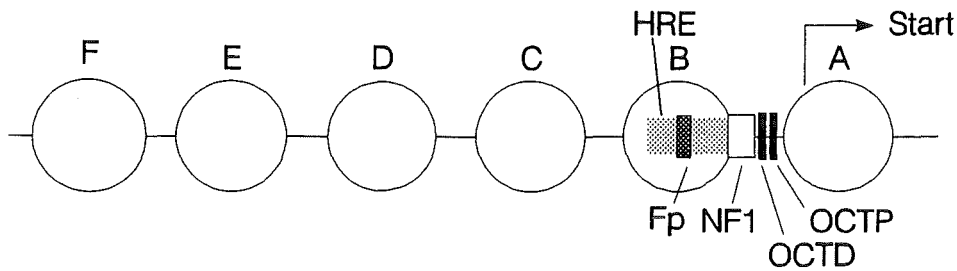


Abb. 12 Schematische Darstellung der Chromatinstruktur des MMTV LTR. Die Nukleosomen sind mit A bis F bezeichnet. Die schraffierten Kästchen stehen für das HRE und die Bindungsstellen für Fp, NF1 und OTF-1. Der Pfeil zeigt die Startstelle der Transkription an.

Die *in vivo* "footprint"-Experimente zeigen jedoch, daß NF1 und OTF-1 auch in Abwesenheit von Hormon an die DNS binden können. Die Bindungsstelle für OTF-1 liegt in dem Bereich zwischen Nukleosom A und B, und die NF1-Bindungsstelle liegt in diesem Bereich an der Grenze zu Nukleosom B. Es besteht daher die Möglichkeit, daß beide Faktoren an die Linker-DNS zwischen den Nukleosomen im intakten Chromatin binden können. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß andere Faktoren existieren, die ebenfalls zu einer Verdrängung des Nukleosom B führen und dadurch die Bindung von NF1 ermöglichen. In NIH 3T3-Zellen wäre ein möglicher Kandidat hierfür der Faktor Fp, der im Bereich des Nukleosom B bei Position -151 bis -164 seine Bindungsstelle hat. Ob Unterschiede zwischen der Chromatinstruktur von NIH 3T3- und GR-Zellen bestehen, die die Zelltypspezifität beeinflusst, wird durch die Hypersensitivitäts-Experimente analysiert. Dabei wird untersucht ob der MMTV in NIH 3T3-Zellen in einem inaktivem Zustand vorliegt, der dazu führt, daß der MMTV in diesen Zellen nicht exprimiert wird.

Zur Feststellung der Hypersensitivität gegenüber DNase I werden Zellkerne präpariert und mit steigenden Mengen an DNase I verdaut. Die DNase I dringt in die Kerne ein und kann an aufgelockerten Chromatinstellen die DNS schneiden. Die genomische DNS wird aus den

Kernen präpariert, gereinigt und anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen. Die Restriktionsenzyme werden dabei so gewählt, daß das Fragment den gesamten regulatorischen Bereich des Genkonstruktes enthält und ein Fragment definierter Länge entsteht. Besteht innerhalb dieses regulatorischen Bereiches eine aufgelockerte Chromatinstruktur, so kann die DNase I dort die DNS verdauen und es entstehen ein kürzeres DNS-Fragment. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNS-Fragment auf einem Agarosegel werden die Fragmente auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen DNS-Sonde hybridisiert. Nach Autoradiographie der Membran werden das Restriktionsfragment und zusätzlich durch den DNase I-Verdau entstehende kürzere DNS-Fragmente sichtbar. Eine genaue Lokalisation der hypersensitiven Stelle im Promotor gibt Aufschluß über die Chromatinverpackung in diesem Bereich.

Um zelltypspezifische Unterschiede der Hypersensitivität festzustellen, wurden die Zellkerne aus Massenkulturen stabil transfizierter NIH 3T3- und GR-Zellen präpariert. Dabei wurde ein Genkonstrukt verwendet, bei dem die gesamte Sequenz des MMTV-LTR vor das CAT-Reportergen kloniert worden war (pLTR CAT 9). Durch den Restriktionsverdau mit den Enzymen Hind III und Nco I entstand ein Restriktionsfragment von 1929 bp Länge, das den gesamten MMTV LTR enthält. Die DNS-Sonde erkennt spezifisch Sequenzen im CAT-Gen (siehe schematische Darstellung in Abb. 13).

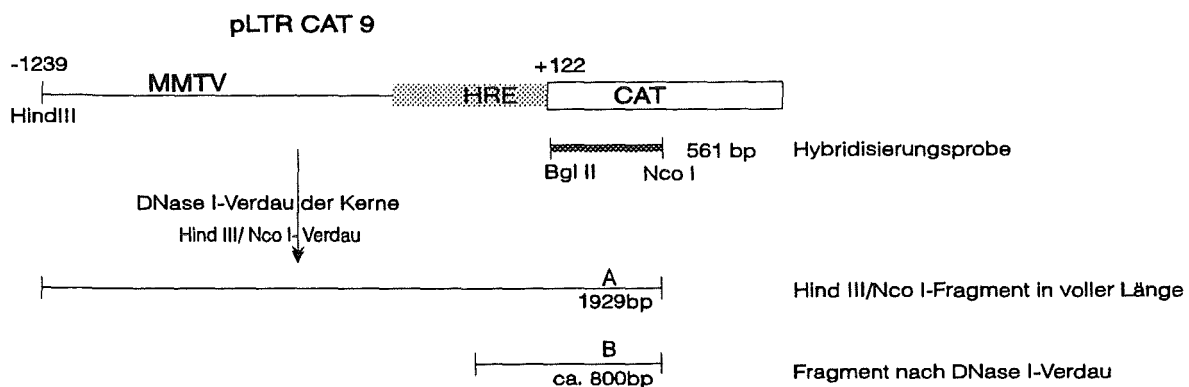


Abb. 13 Schematische Darstellung der DNase I-Hypersensitivität mit pLTR CAT 9. Das pLTR CAT 9 Konstrukt ist schematisch dargestellt. Die Zahlen und Restriktionsschnittstellen geben die Grenzen der MMTV Sequenzen an (-1239 Hind III/+122 Bgl II). Die Hybridisierungsprobe ist ein 561 bp langes Fragment aus dem CAT-Gen (Bgl II/Nco I). Nach dem DNase I-Verdau der Kerne, wurde die genomische DNS isoliert und mit Hind III und Nco I verdaut. Dabei entstand ein 1929 bp langes Fragment, das durch die Hybridisierungsprobe erkannt wird. Tritt im Bereich des HRE eine hypersensitive Stelle auf, so entsteht ein kürzeres Fragment von ca. 800 bp, das ebenfalls von der Hybridisierungsprobe erkannt wird.

Die Behandlung von Kernen aus GR- und NIH 3T3-Zellen mit DNase I führt zum Verdau einer hypersensitiven Stelle in der genomischen DNA. Daher ist in dem Autoradiogramm der DNaseI-Hypersensitivitäts-Analyse neben dem ausgewählten Hind III/ Nco I-Restriktionsfragment von 1929 bp (siehe Abb. 14, A) eine zusätzliche Bande von ca. 800 bp Länge zu sehen.

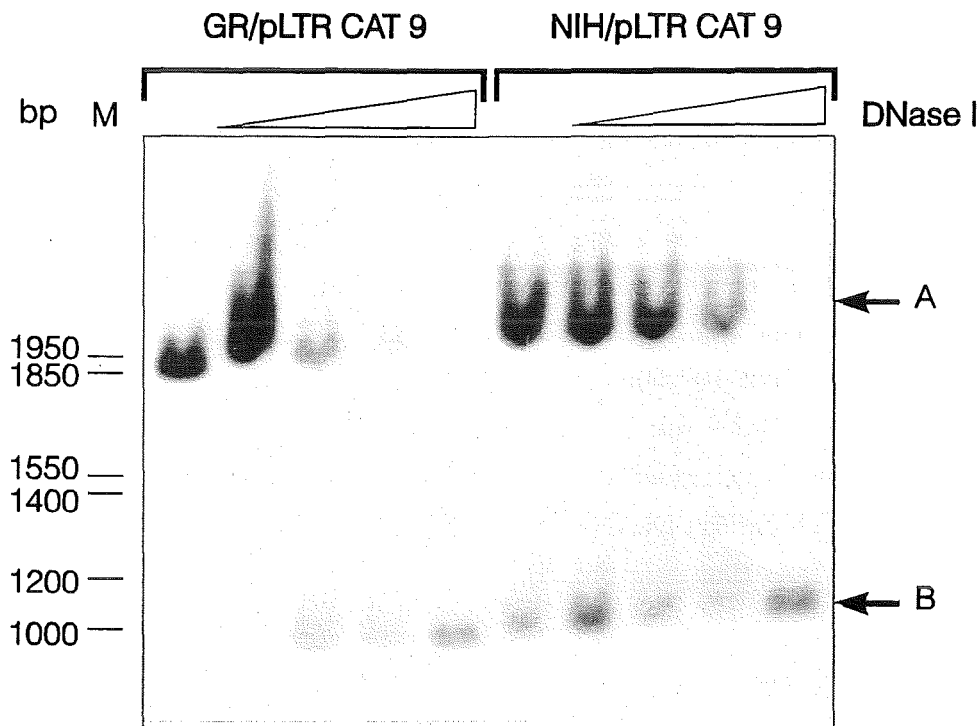


Abb. 14 In GR- und NIH 3T3-Zellen tritt innerhalb des MMTV LTR im Bereich des HRE eine DNase I hypersensitive Stelle auf. Autoradiogramm einer DNase I-Hypersensitivitäts-Analyse mit Zellkernen aus speziell transfizierten GR- und NIH 3T3-Zellen. Nach Behandlung der Kerne entsteht neben der Bande aus dem Restriktionsverdau mit 1929 bp Länge (\leftarrow A), eine zusätzliche Bande mit einer Länge von ca. 900 bp (\leftarrow B). Die entstandenen Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1,2 %igen Agarosegel auf eine Hybond N⁺-Membran transferiert und mit einer spezifischen CAT-Probe hybridisiert. DNS-Größenmarker (M),

Diese DNase I hypersensitive Stelle tritt sowohl in GR- als auch in NIH 3T3-Zellen auf. Da die Auflösung des Gels nicht ausreicht, kann deren genaue Position hier nicht festgestellt werden. Sie liegt jedoch im Bereich des HRE. In beiden Zelllinien ist die Chromatinstruktur im Bereich des HRE aufgelockert, so daß die genomische DNS durch DNase I verdaut werden kann. Die unterschiedliche transkriptionelle Aktivität des MMTV in diesen beiden Zelltypen kommt somit nicht durch einen unterschiedlichen Verpackungsgrad des Chromatins zustande. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, daß obwohl der gesamte MMTV

LTR untersucht wurde, speziell im Bereich des HRE und daher der Bereich des Nucleosom B in aufgelockerter Form vorliegt.

Um die Position der hypersensitiven Region genauer einzugrenzen, wurde die Hypersensitivität gegenüber dem Restriktionsenzym Sac I untersucht, das bei Position -102 im Bereich des HRE im MMTV LTR eine Schnittstelle besitzt. Hierzu wurden nur NIH 3T3-Zellen verwendet, da zwischen den beiden Zelltypen kein Unterschied im Bezug auf die Hypersensitivität gegenüber DNase I sichtbar war.

Hierzu wurden Kerne aus NIH 3T3-Zellen, die mit pLTR CAT 9 bzw. pHCwt stabil transfiziert waren, mit dem Restriktionsenzym Sac I verdaut. Das Nucleosom B liegt nach Chromatinkartierung mit Micrococcus Nuclease zwischen Position -75 und -221 (Bresnick et al., 1991). Damit befindet sich die Schnittstelle für Sac I bei Position -102 ungefähr in der Mitte des Nucleosom B. Das Enzym ist nur dann in der Lage die genomische DNS zu schneiden, wenn in diesem Bereich die Chromatinstruktur aufgelockert ist.

Die schematische Darstellung des Experiments zeigt welche Fragmente durch den Hind II/ Nco I-Restriktionsverdau und durch zusätzlichen Verdau mit Sac I entstehen können (siehe Abb. 15).

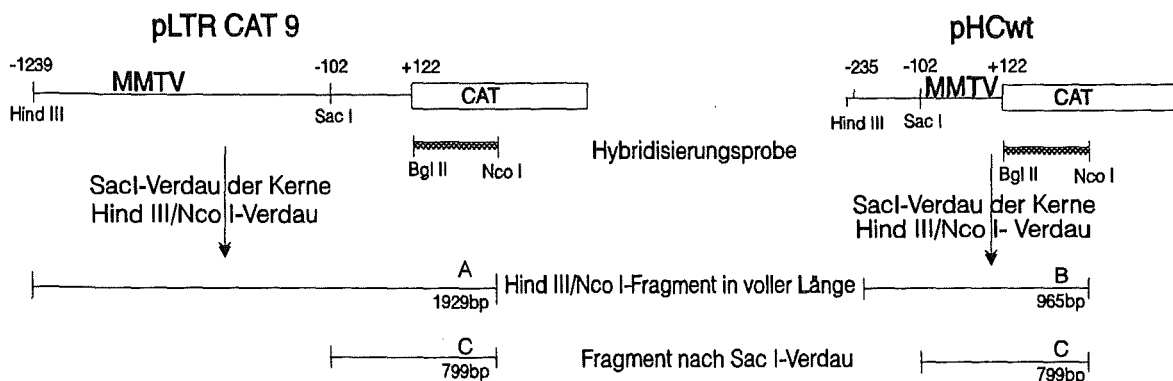


Abb. 15 Schematische Darstellung der Sac I-Hypersensitivität mit pLTR CAT 9 und pHCwt. Das pLTR CAT 9 und das pHCwt Konstrukt sind schematisch dargestellt. Die Zahlen und Restriktionsschnittstellen geben die Grenzen der MMTV Sequenzen (-1239 Hind III/+122 Bgl II; -235 Hind III/+122) und die Position der Sac I-Schnittstelle (-102) an. Die Hybridisierungsprobe ist ein 561 bp langes Fragment aus dem CAT-Gen (Bgl II/Nco I). Nach dem Sac I-Verdau der Kerne, wurde die genomische DNS isoliert und mit Hind III und Nco I verdaut. Dabei entstand ein 1929 bp langes Fragment aus pLTR CAT 9 (A) und ein 965 bp langes Fragment aus pHCwt (B), die jeweils durch die Hybridisierungsprobe erkannt werden. Tritt im Bereich des HRE eine hypersensitive Stelle auf, so entsteht aus beiden Konstrukten ein kürzeres Fragment von 799 bp, das ebenfalls von der Hybridisierungsprobe erkannt wird.

Die Sac I-Hypersensitivitäts-Analyse der NIH 3T3-Zellen mit dem pLTR CAT 9-Konstrukt führte einerseits zu dem Hind III/ NcoI-Restriktionsfragment mit der Länge von 1929 bp (Abb. 16, Spur 1) und andererseits zu dem durch Sac I-Verdau verkürzten Fragment von ca. 799 bp Länge (siehe Spur 2 bis 4). Mit den pHcwt-enthaltenden NIH 3T3-Zellen wurde ebenfalls sowohl das Restriktionsfragment in der Ausgangsgröße von 965 bp Länge (Abb. 16, Spur 5) als auch eine durch Sac I-Verdau zusätzlich entstandene 799 bp Bande erhalten (siehe Spur 6 bis 8). Die Länge der zusätzlichen Banden entspricht genau dem Fragment, das durch Sac I-Verdau der DNS bei Position -102 des MMTV LTR entsteht. Die Verpackung des Chromatin läßt somit den Verdau mit Sac I zu. Die Länge der MMTV-Sequenzen in den beiden verwendeten Konstrukten spielt offensichtlich keine Rolle.

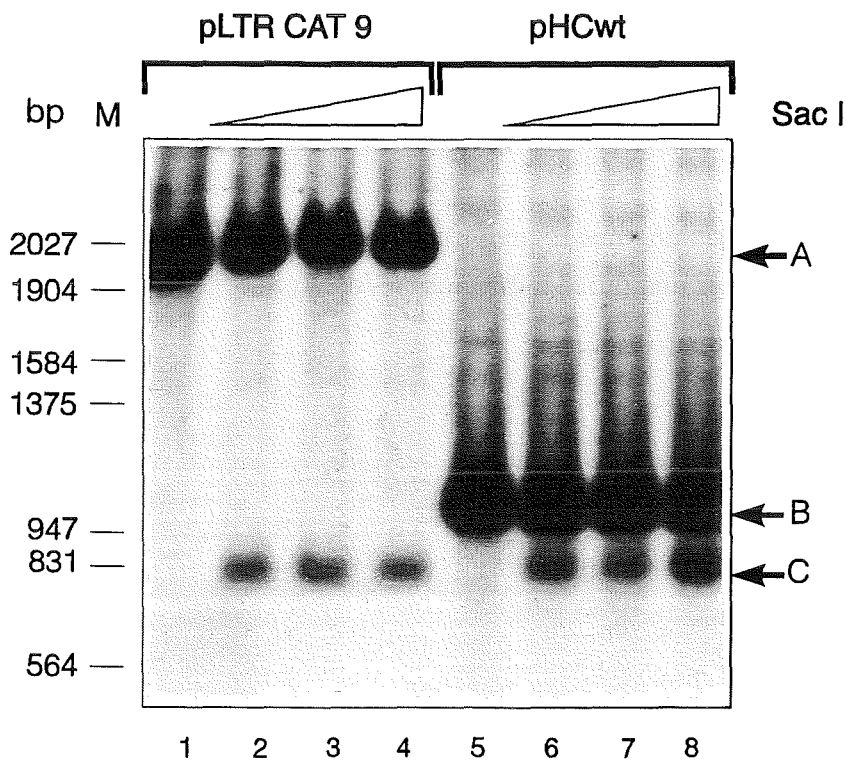


Abb. 16 In NIH 3T3-Zellen tritt innerhalb des MMTV LTR im Bereich des HRE eine DNase I hypersensitive Stelle auf. Nach dem Sac I-Verdau der Kerne entsteht neben der Bande aus dem Restriktionsverdau von pLTR CAT 9 mit 1929 bp Länge (\leftarrow A), eine zusätzliche Bande mit einer Länge von 799 bp (\leftarrow C). Bei den Zellen mit dem pHcwt Konstrukt ergibt der Restriktionsverdau eine Bande mit 965 bp Länge (\leftarrow B) und dieselbe 799 bp-Bande aus dem Sac I-Verdau (\leftarrow C). Die entstandenen Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 0,8 %igen Agarosegel auf eine Hybond N⁺-Membran transferiert und mit einer spezifischen CAT-Probe hybridisiert. M, DNS-Größenmarker

Durch die Hypersensitivitäts-Experimente mit zwei verschiedenen Enzymen ergeben sich deutliche Hinweise für aufgelockertes Chromatin im MMTV im Bereich des Nukleosom B. Es bestehen zwischen den beiden Zelltypen GR und NIH 3T3 jedoch keine zelltypspezifischen Unterschiede, die die unterschiedliche Expression des MMTV in diesen Zelllinien erklären könnten. Die aufgelockerte Chromatinstruktur des Nukleosom B ermöglicht wahrscheinlich die Bindung der Transkriptionsfaktoren NF1 bzw. OTF-1 und auch des Faktors Fp in NIH 3T3- und GR-Zellen. Durch diese Analysen kann jedoch nicht festgestellt werden, ob der Fp-Faktor *in vivo* an die DNS bindet. Wie es zu der Auflockerung des Chromatins kommt und durch welche der Faktoren die Chromatinstruktur reguliert wird, kann nicht erklärt werden. Fest steht jedoch, daß die Bindung dieser Faktoren im Bereich des Nukleosom B auch ohne Vorbehandlung mit Hormon möglich ist.

Um die Bedeutung des neuen Faktors Fp für die Regulation des MMTV festzustellen wurde der Faktor durch weitere Bindungsstudien genauer charakterisiert und durch Mutationsanalyse die Funktion des Proteins studiert.

3. Charakterisierung des Repressors

3.1. Der neue Faktor Fp bindet spezifisch an die Sequenzen von -151 bis -164 des MMTV LTR

Um den Faktor, der durch die DNase I-Protektionsanalyse entdeckt wurde, weiter zu charakterisieren, wurde die Sequenz entsprechend zu dem Bindungsbereich (Position -145 bis -169) als synthetisches Oligonukleotid hergestellt. Dieses Oligonukleotid wurde radioaktiv endmarkiert und in einer Gelretardations-Analyse mit Kernextrakt aus konfluent wachsenden NIH 3T3- und GR-Zellen inkubiert. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurde mit einem 100-fachen Überschuß an unmarkiertem homologem (Fp) und sequenzfremdem Oligonukleotid (F3) kompetiert.

Proteine aus NIH 3T3-Extrakt bilden mit dem markierten Oligonukleotid drei unterschiedlich wandernde Komplexe A, B und C (siehe Abb. 17, Spur 1). Überraschenderweise wurden dieselben Komplexe nach Inkubation des Fp-Oligonukleotids mit Kernextrakt aus GR-Zellen erhalten (siehe Spur 4). Nach Konkurrenz mit dem homologen Oligonukleotid (siehe Spur 2 und 5) verschwindet nach Inkubation mit Zellextrakten beider Zelltypen jedoch nur der Komplex A. Die Konkurrenz mit dem nicht-homologen Oligonukleotid F3 beeinflusst keine der Banden (Spur 3 und 6). Daher wird nur die Bindung des Komplex A als spezifisch bezeichnet. Bei Komplex B und C handelt es sich um unspezifische Bindungen.

Komplex A besteht aus einer Doppelbande, wobei aus diesem Experiment nicht bestimmt werden kann, ob es sich um zwei unterschiedliche Proteine, um Multimere eines Proteins oder um Modifikationen eines Proteins handelt.

Vergleicht man die Komplexe, die mit den verschiedenen Kernextrakten entstehen, so ist in diesem Experiment kein Unterschied zwischen NIH 3T3- und GR-Zellen zu erkennen.

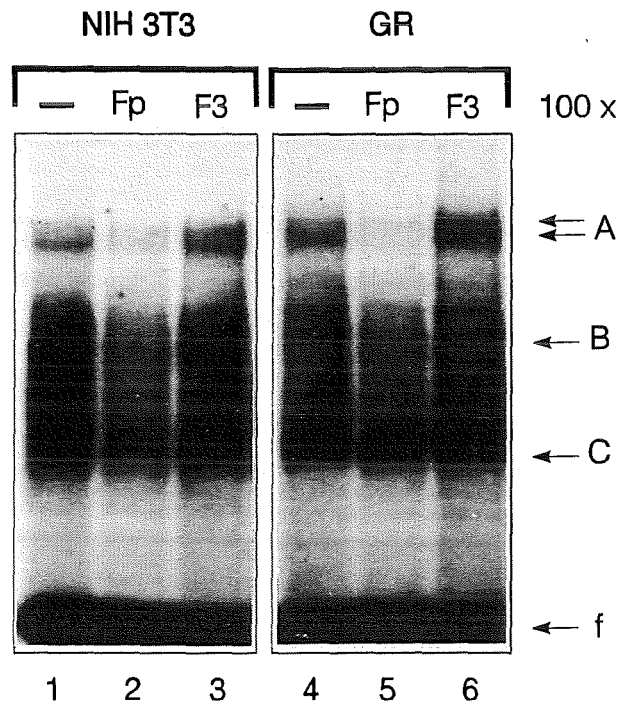


Abb. 17 Kernextrakte aus NIH 3T3- und GR-Zellen bilden einen spezifischen Komplex mit dem Fp-Oligonukleotid. Autoradiogramm einer Gelretardations-Analyse mit je 10 μ g Kernextrakt aus konfluenten NIH 3T3- und GR-Zellen und 10 fmol (20000cpm) endmarkiertem Fp-Oligonukleotid. Die angegebenen Kompetitoren (Fp und F7) wurden im 100-fachen molaren Überschuß eingesetzt. A, B und C bezeichnen die entstandenen Protein/DNS-Komplexe; f, das freie Oligonukleotid.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der DNase I-Protektionsanalyse, in der keine Bindung des Faktors in den Ansätzen mit Extrakten aus GR-Zellen zu sehen war. Es war nicht möglich mit Kernextrakten aus GR-Zellen, die eine spezifische Bande im Gelretardations-Experiment ergaben, auch eine Veränderung in der DNase I-Protektionsanalyse zu erhalten. Der Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen könnte auf die unterschiedliche Sensitivität der beiden Analysetypen zurückzuführen sein, da eine Veränderung im Fragmentmuster der DNase I-Protektionsanalyse erst sichtbar wird wenn über 50 % der markierten DNS-Fragmente das Protein gebunden haben. In der Gelretardations-Analyse reichen geringe Mengen an Protein aus, um zu einem retardierten Komplex zu führen.

Somit sind beide Analysen von der Menge des spezifischen Proteins im Kernextrakt abhängig. Bei der Durchführung der Gelretardations-Analyse wurde festgestellt, daß das spezifische Protein sehr temperaturempfindlich ist und leicht degradiert. Frisch präparierter Kernextrakt wurde daher sofort aliquotiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die

Aliquots wurden nach dem Auftauen sofort verwendet und nicht wieder eingefroren. Die Inkubation des Kernextraktes mit dem Oligonukleotid wurde auf Eis durchgeführt und die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Kühlraum bei 4 C. Diese Temperatursensitivität macht es sehr schwierig immer mit Kernextrakt gleicher Qualität zu arbeiten. Die Menge des Fp-Faktors könnte daher in GR-Zellen gegenüber NIH 3T3-Zellen verringert sein.

Die Fp-Faktoren, die in GR- und NIH 3T3-Zellen vorhanden sind, könnten zur selben Familie von Transkriptionsfaktoren gehören. Geringe zelltypspezifische Unterschiede der Fp-Proteine könnten durch das geringe Auflösungsvermögen des nativen Polyacrylamidgels der Gelretardationsanalyse nicht feststellbar sein. Für eine genauere Analyse der Fp-Proteine wurde ein "UV-Crosslink"-Experiment durchgeführt, bei dem die relative Molekülmasse der Fp-Proteine aus NIH 3T3- bzw. GR-Zellen im spezifischen Komplex A ermittelt wurde.

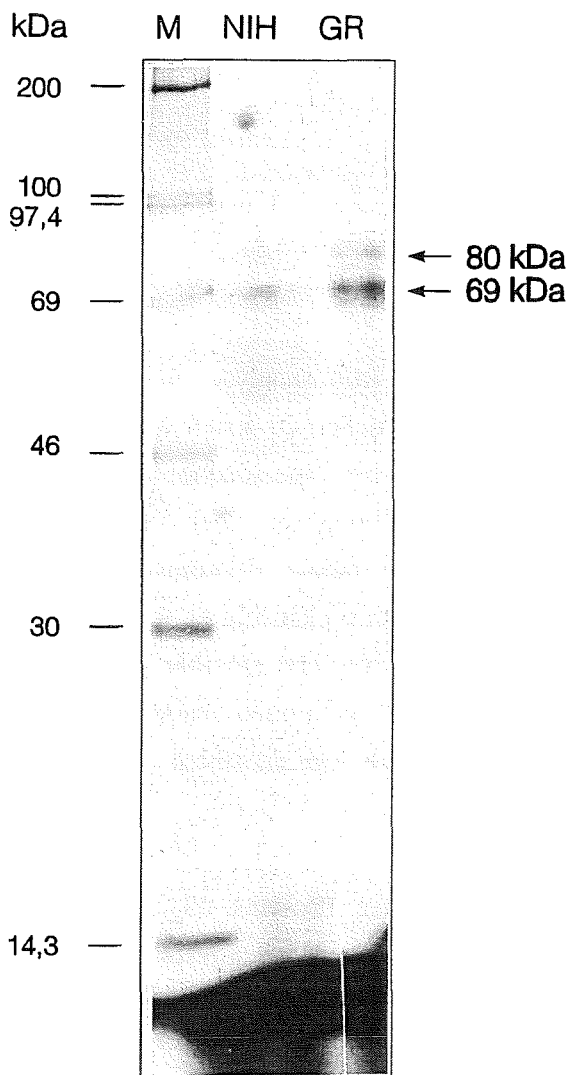


Abb. 18 An das Fp-Oligonukleotid binden zwei Proteine. Autoradiogramm einer "UV-Crosslink"-Analyse. Nach einem präparativen Gelretardationsexperiment mit 50 µg Kernextrakt und 50 fmol (100000cpm) endmarkiertem modifiziertem Fp-Oligonukleotid wurden die Protein/DNS-Komplexe und das freie Oligonukleotid nach 30 min UV-Bestrahlung (304 nm) des Gels und Exposition auf einen Röntgenfilm ausgeschnitten und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Autoradiogramm des 10 %igen Gels der SDS-PAGE M, Protein-Größenmarker. kDa, Einheit der Molekülmasse.

Das Experiment ergab, daß zwei Proteine an das Fp-Oligonukleotid binden (siehe Abb. 17). Die relative Molekülmasse der Proteine beträgt ca. 69 und 80 kDa. Die Bande bei ca. 12 kDa stammt von den freien Oligonukleotiden, die nicht mit Proteinen vernetzt wurden. Um allein die relativen Molekülmassen der beiden Proteine zu erhalten, wurde die Masse des gebundenen Oligonukleotids abgezogen. Es ergeben sich daraus die korrigierten Molekülmassen von 57 und 68 kDa für die beiden Fp-Proteine.

Diese beiden Proteine entsprechen den Proteinen, die im Gelretardations-Experiment zu der Doppelbande in dem Komplex A führen. Es kann sich hierbei um zwei verschiedene Proteine handeln oder das größere Protein könnte eine Modifikation des kleineren sein. Es besteht auch die Möglichkeit, daß das kleinere Protein ein proteolytisches Fragment des größeren Proteins ist, das noch eine unveränderte DNS-Bindedomäne besitzt. Durch diese "UV-Crosslink"-Analyse war jedoch wiederum kein Unterschied zwischen NIH 3T3- und GR-Zellen feststellbar.

Um Kontaktstellen des Proteins innerhalb der 24 Basenpaare des Oligonukleotids herauszufinden, wurde eine Methylierungsinterferenz-Analyse durchgeführt, wie sie schon für das NF1 Oligonukleotid beschrieben wurde (siehe S. 64/65). Da eine Trennung der beiden Banden in Komplex A in dem nativen Polyacrylamidgel der Gelretardations-Analyse nicht möglich war, wurde in diesem Experiment der gesamte Komplex A ausgeschnitten und die Doppelbande gemeinsam analysiert.

In dem Ergebnis zeigt sich, daß es nur zu einer schwachen Interferenz zwischen den Guaninen des Oligonukleotids und dem spezifischen Komplex kommt (siehe Abb.19). Die Unterschiede zwischen proteingebundenem (b) und freiem Oligonukleotid (f) sind gering. Am nicht-kodierenden DNS-Strang ist das Guanin bei Position -164 in der Fraktion der gebundenen Oligonukleotiden etwas abgeschwächt, am kodierenden DNS-Strang sind die Guanine an Position -160 und -161 (siehe Abb. 19)

Diese schwache Interferenz kann durch eine geringe Bindungsaffinität des Proteins zur DNS erklären werden, wodurch ebenfalls verständlich wird, weswegen die Bindung des Fp-Proteins nicht in der genomischen "footprint"-Analyse zu sehen war.

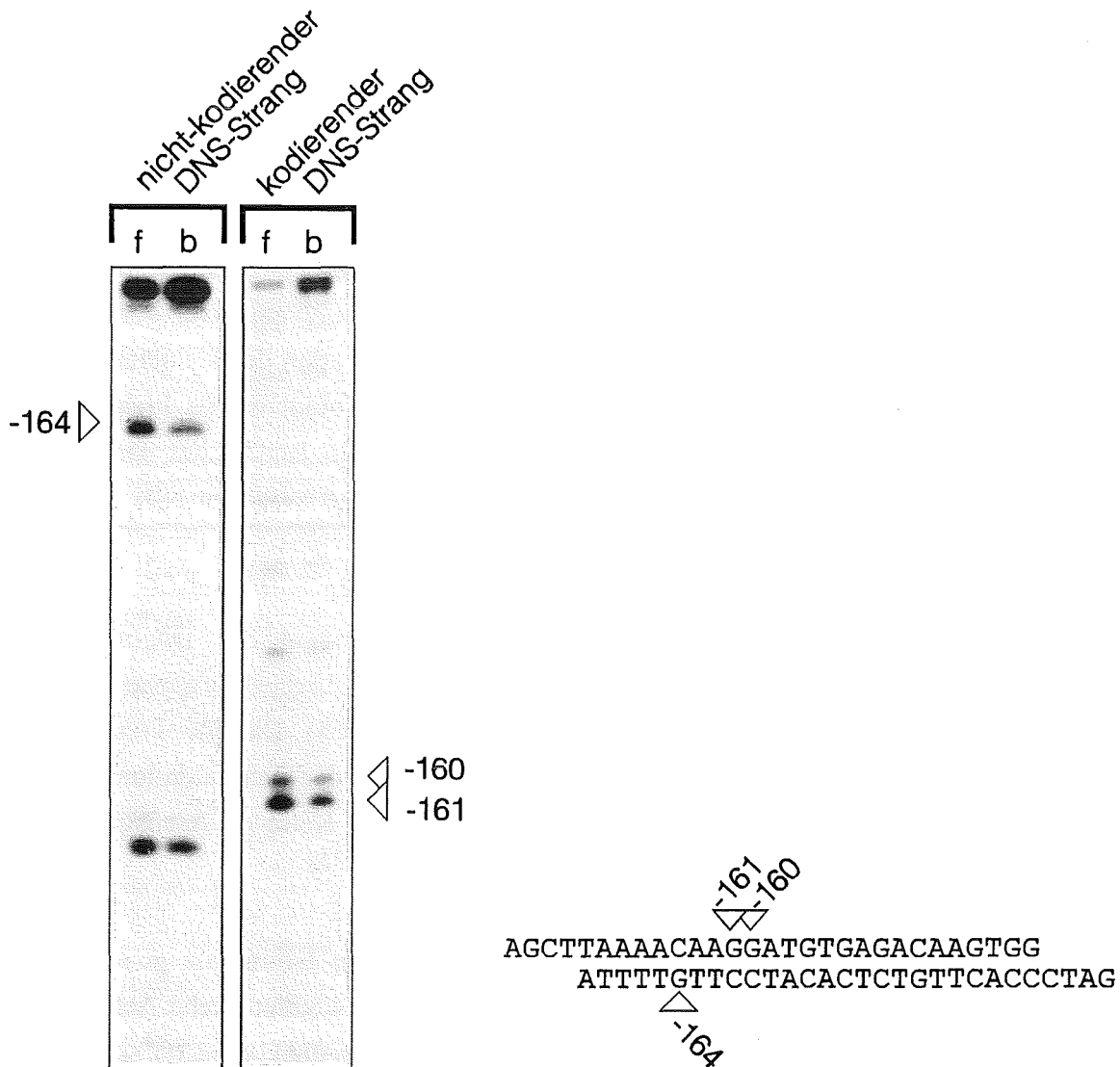


Abb. 19 Kontaktpunkte des Fp-Proteins innerhalb seiner Erkennungssequenz, das Fp-Protein hat eine geringe Bindungsaffinität zu der DNS. Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen wurde mit dem methylierten und jeweils an einem Ende radioaktiv markierten Fp-Oligonukleotid inkubiert. Nach Auftrennung der Protein/DNS-Komplexe auf einem nativen Polyacrylamidgel wurden der entstandene Komplex A und das freie Oligonukleotid durch Autoradiographie des Gels lokalisiert und ausgeschnitten. Nach Isolierung der Oligonukleotide aus dem Gel wurden sie durch Piperidin gespalten und die Fragmente auf einem 20 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Autoradiogramm des denaturierenden Polyacrylamidgels. Die mit einem Pfeil markierten Banden, der Ansätze mit dem gebundenen Protein (b), sind im Vergleich zu den Ansätzen mit der freien DNS (f) abgeschwächt. Die Sequenz entspricht der des Fp-Oligonukleotids. Die Pfeile zeigen die Kontaktstellen des gebundenen Proteins zu dem Oligonukleotid.

Durch diese Methylierungsinterferenz-Analyse wurden die Kontaktpunkte der Fp-Proteine innerhalb der Erkennungssequenz herausgefunden und eine geringe Bindungsaffinität des Fp-Proteins zur DNS festgestellt.

3.2. Die Mutante des Fp-Oligonukleotids ist nicht mehr in der Lage die Fp-Proteine zu binden

Mit der Information aus der Methylierungsinterferenz-Analyse wurde ein mutiertes Oligonukleotid hergestellt, bei dem Basen in der spezifischen Erkennungssequenz des Fp-Proteins ausgetauscht wurden. Zur Erleichterung für eine anschließende Klonierung wurde der Basenaustausch so vorgenommen, daß eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstE II entstand.



Abb.20 Sequenzvergleich des Fp-Oligonukleotids mit der Mutanten mFp. Das Kästchen gibt den Bindungsbereich aus der DNase I-Protektionsanalyse an. Die Sterne bezeichnen die Kontaktpunkte aus der Methylierungsinterferenz-Analyse (*). Die ausgetauschten Basen in der Mutante mFp sind durch den grauen Hintergrund gekennzeichnet.

Diese Mutante wurde in einem Gelretardations-Experiment als Kompetitor eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Mutante noch in der Lage ist, den spezifischen Komplex zu binden. In Abb. 21 sind zunächst in Spur 1 und 5 die Komplexe zu sehen, die mit Kernextrakten aus NIH 3T3- bzw. GR-Zellen und dem Fp-Oligonukleotid entstehen (A,B und C). Während ein 100-facher Überschuß des Fp-Oligonukleotids den Komplex A kompetieren kann (Spur 2 und 6), ist das mutierte Oligonukleotid mFp dazu nicht in der Lage. Auch bei 100-fachem Überschuß des mFp-Oligonukleotids bleibt der Komplex A mit dem markierten Oligonukleotid bestehen (Spur 3 und 7). Das mFp-Oligonukleotid verhält sich in diesem Gelretardations-Experiment wie das sequenzfremde Oligonukleotid F3 (Spur 4 und 8).

Dieses Ergebnis zeigt, daß die eingeführte Mutation die spezifische Bindung der Fp-Proteine verhindern kann. Die Fp-Proteine zeigen keine Bindungsaffinität zu dem mutierten Oligonukleotid mFp.

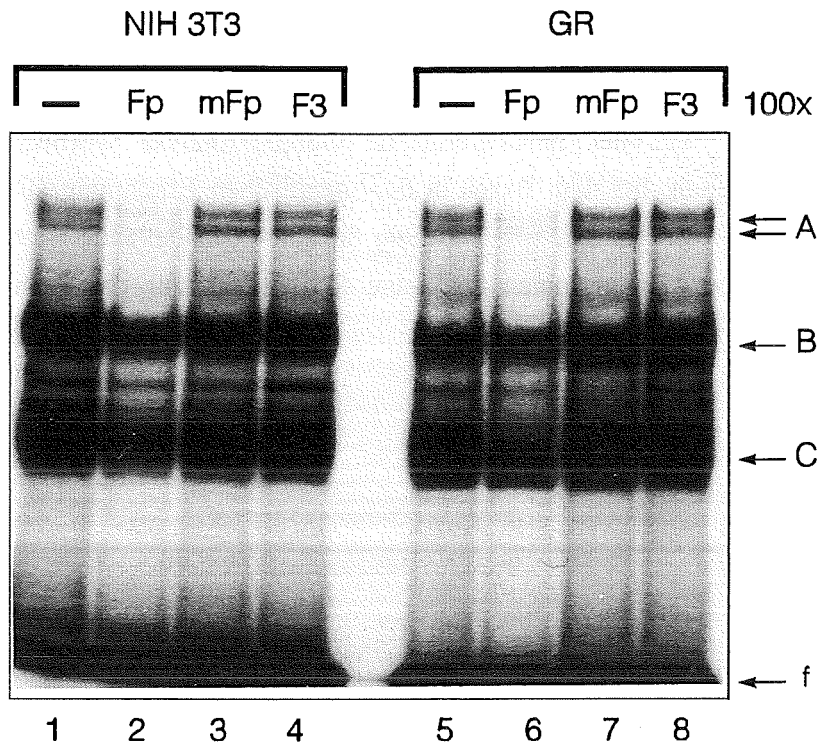


Abb. 21 Das mutierte Oligonukleotid mFp ist nicht in der Lage den spezifischen Komplex A am Fp-Oligonukleotid zu kompetieren. Gelretardations-Analyse mit je 10 µg Kernextrakt aus konfluent wachsenden NIH 3T3- und GR- Zellen und 10 fmol (20000cpm) endmarkiertem Fp-Oligonukleotid. Die angegebenen Kompetitoren (Fp, mFp und F7) wurden im 100-fachen molaren Überschuß eingesetzt. A, B und C bezeichnen die entstandenen Protein/DNS-Komplexe; f, das freie Oligonukleotid.

3.3. Funktionelle Analyse der Mutation der Fp-Bindungsstelle im Kontext des MMTV HRE

Die bisher durchgeführten Bindungsstudien lieferten wichtige Resultate für die funktionelle Charakterisierung der Fp-Faktoren. Letztendlich entscheidend für die Bedeutung der neuen Faktoren ist die Analyse der Funktion der Proteine. Hierzu wurde die spezifische Erkennungssequenz der Proteine im Kontext des gesamten HRE im pHcwt-Konstruktes mutiert (siehe Abb. 22). Der Basenaustausch erfolgte unter Verwendung des mutierten Oligonukleotid mFp, zu dem die Fp-Proteine nachweislich keine Bindungsaffinität mehr besitzen. Nach stabiler Transfektion des neuen Plasmids, pHcMfP, in GR- und NIH 3T3-Zellen konnte die funktionelle Bedeutung der Fp-Proteine in diesen Zelltypen analysiert werden. Mindestens 100 Einzelklone wurden zu einer Massenkultur zusammengenommen, um klonale Effekte auszuschließen.

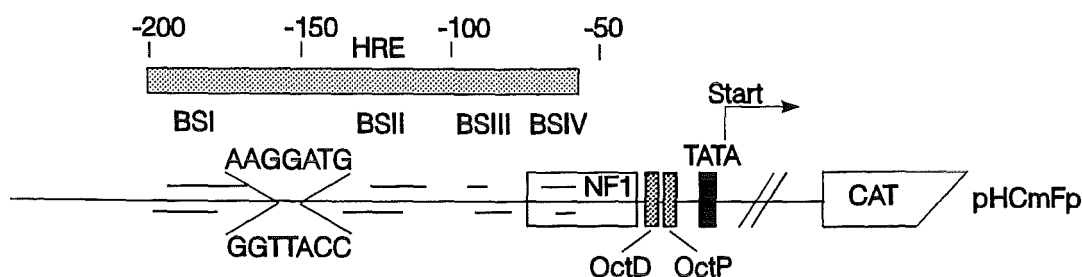


Abb. 22 Schematische Darstellung der Mutanten pHcMfP. Die unterschiedlich schraffierten Kästchen zeigen die Position des HRE, NF1, OctD, OctP und der TATA-Box. Mit BSI bis BSIV sind die Positionen der Hormonrezeptorbindungsstellen eingezeichnet. Die Sequenz über der dünnen Linie entspricht der Wildtypsequenz der Fp-Bindungsstelle, darunter steht die mutierte Sequenz des mFp.

Die Bedeutung der Fp-Proteine für die zelltypspezifische Expression des MMTV wurde durch Vergleich der Expression des Konstrukts pHcMfP mit der des pHcwt-Konstrukts in GR- und NIH 3T3-Zellen gezeigt. Um einen Einfluß der Fp-Proteine auf die zell-dichte-induzierte Expression des MMTV festzustellen, wurde die Expression der Konstrukte auch bei niedriger und hoher Zelldichte verglichen. Da die eingeführte Mutation im Bereich des HRE in direkter Nachbarschaft der ersten Hormonrezeptorbindungsstelle liegt, wurde ebenfalls untersucht, ob die Mutation einen Einfluß auf die Hormoninduktion des Konstruktes ausübt.

Stabil mit dem pHcwt- bzw. dem pHcMfP-Konstrukt transfizierte GR- und NIH 3T3-Zellen wurden in niedriger (1×10^5 Zellen/ 9 cm PS) und hoher Zelldichte (6×10^6 Zellen/ 9 cm PS) ausgesät und nach 48 h geerntet. Für die Hormoninduktion wurden die Zellen 16 h vor der Ernte mit 10^{-7} M Dexamethason induziert. Aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und anschließend in einem CAT-Assay die CAT-Aktivität bestimmt.

In GR-Zellen wird das pHcwt-Konstrukt wie erwartet in Zellen hoher Dichte stärker exprimiert als in Zellen niedriger Dichte (siehe Abb. 23, Spur 1 und 2 oben). Diese zell-dichte-abhängige Expression bleibt auch nach Induktion mit Hormon unbeeinflusst (siehe Spur 3 und 4). Das pHcMfP-Konstrukt verhält sich in GR-Zellen genauso wie das pHcwt-Konstrukt, die eingeführte Mutation hat keinen Einfluß auf die zell-dichte-induzierte Expression des MMTV Konstruktes (siehe Spur 5 und 6, und 7 und 8). Der Basalwert der Expression in Zellen niedriger Dichte steigt jedoch leicht (ca. um den Faktor 2) an (vergleiche Spur 1 mit Spur 5).

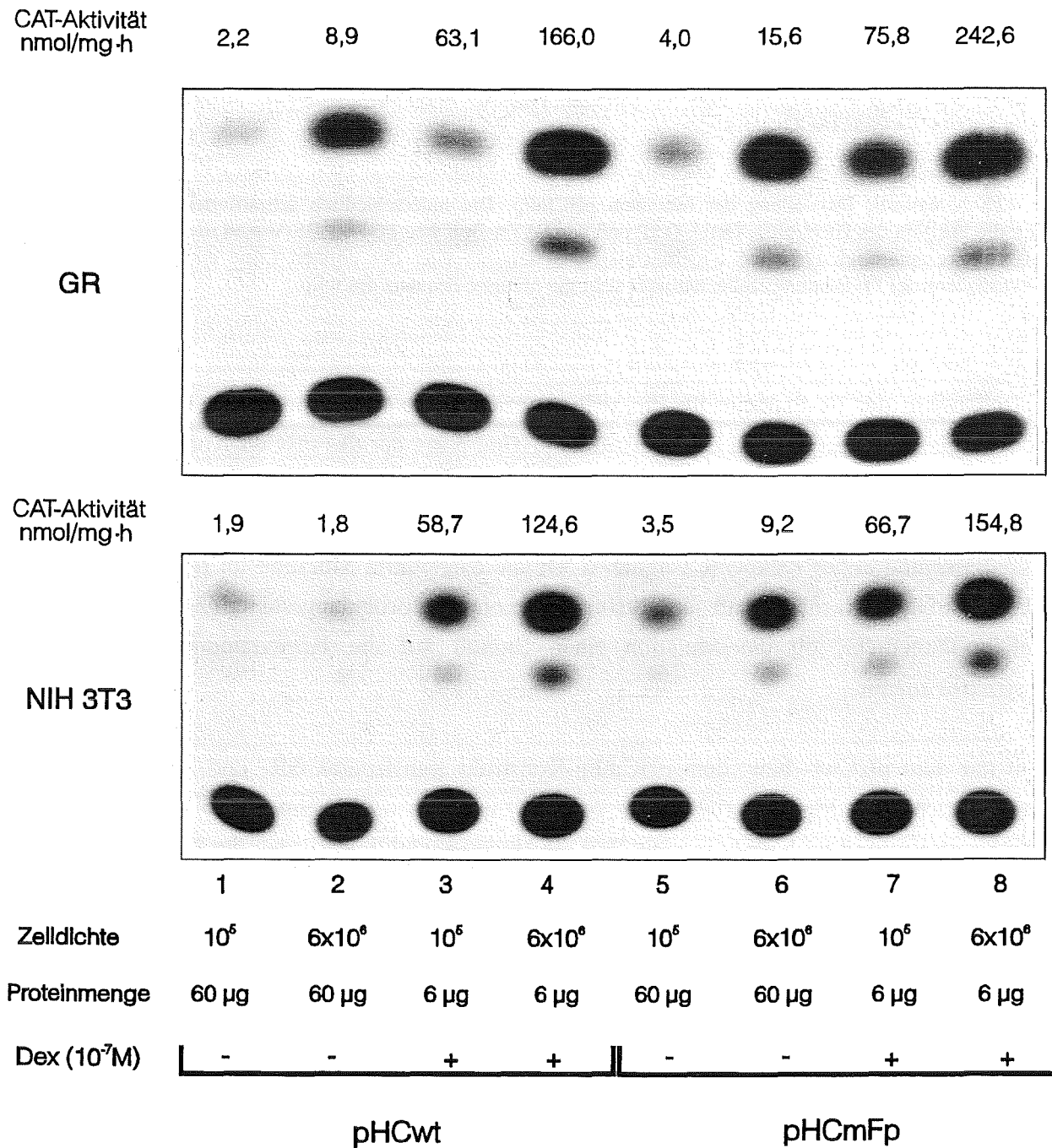


Abb. 23 Die Mutation im HRE erhöht die Expression eines MMTV LTR CAT Konstrukt in dicht kultivierten NIH 3T3-Zellen. Autoradiogramm eines CAT-Assays. Massenkulturen von GR- bzw. NIH 3T3-Zellen, die stabil mit pHCwt bzw. pHCmFp transfiziert worden waren, wurden mit 1×10^5 bzw. 6×10^6 Zellen/ 9 cm Gewebekulturschale ausgesät, nach 48 h geerntet und die CAT Aktivität bestimmt. Die Induktion mit 10^{-7} M Dexamethason erfolgte 16 h vor der Ernte. Exemplarisch wird ein typisches Ergebnis eines CAT-Assays dargestellt. Das Ergebnis wurde in mindestens fünf unabhängigen Experimenten reproduziert.

Die Zelldichte-Induktion ist nach Hormoninduktion in GR-Zellen weiterhin bei beiden Konstrukten vorhanden (vergleiche Spur 3 mit 4 und Spur 7 mit 8). Die eingeführte Mutation der Fp-Bindungsstelle im Kontext des HRE hat somit keinen Einfluß auf die Hormoninduktion. Da im CAT-Assay von den dexamethason-induzierten Zellen nur ein Zehntel der Proteinmenge eingesetzt wurde, die für die uninduzierten Zellen verwendet wurde, kann man die Spots in der Autoradiographie nicht direkt vergleichen. Deshalb wurden zusätzlich die errechneten CAT-Aktivitäten angegeben, in denen die Enzymaktivität auf die eingesetzte Menge an Protein bezogen wird.

In NIH 3T3-Zellen ist die Expression der beiden Konstrukte pHCwt und pHCmFp verschieden. Während das pHCwt Konstrukt bei niedriger und hoher Zelldichte gering exprimiert wird (siehe Spur 1 und 2), zeigt das pHCmFp-Konstrukt in dichten NIH 3T3-Zellen eine stärkere Expression als in Zellen niedriger Dichte (Spur 5 und 6). Der Faktor der Zelldichte-Induktion ist mit 3,2 etwas niedriger als in den GR-Zellen. Auch bei NIH 3T3-Zellen ist der Basalwert der Zellen niedriger Dichte bei Expression der Mutanten um ca. den Faktor 2 höher, was bereits bei den GR-Zellen zu sehen war. In NIH 3T3-Zellen kommt es durch die Mutation folglich zu zwei Effekten. Die Basalexpression in Zellen niedriger Dichte steigt leicht an und die Mutante pHCmFp zeigt bei hoher Zelldichte eine erhöhte Expression. Diese zelllichte-induzierte höhere Expression der Mutanten pHCmFp zeigt, daß es sich bei dem Fp-Protein um einen Repressor handelt, der in NIH 3T3-Zellen die Expression des MMTV unterdrückt.

Wurden die transfizierten NIH 3T3-Zellen mit Hormon induziert, so zeigte das pHCwt-Konstrukt als auch das pHCmFp Konstrukt eine zelllichte-induzierte Expression (vergleiche Spur 3 mit 4 und Spur 7 mit 8). Da dieser Effekt auch in pHCwt transfizierten Zellen auftritt, ist er unabhängig von der eingeführten Mutation in der Fp-Bindungsstelle. Möglicherweise verdrängt die Bindung des hormoninduzierten Rezeptors an die benachbarte Rezeptorbindungsstelle I den Repressor und führt so zu einem ähnlichen Effekt wie die eingeführte Mutation. Der Repressor beeinflusst somit nur die basale Expression des MMTV und hat keinen Einfluß auf die Hormoninduktion.

Diese Mutationsanalyse zeigt, daß es sich bei dem Fp-Protein um einen Repressor handelt, der zelltypspezifisch in NIH 3T3-Zellen die zelllichte-induzierte Expression des MMTV unterdrückt. Der Repressor erfüllt jedoch noch eine zweite Funktion, da er zelltyp-unabhängig die basale Expression bei niedriger Zelldichte reprimiert. Zur Aufklärung der Mechanismen, die zu dieser zelltypspezifischen und basalen Repression führen, ist eine weitere Charakterisierung des Fp-Faktors nötig.

3.4. Der Faktor Fp ist ein Mitglied der ets-Familie der Transkriptionsfaktoren

Sequenzvergleich der Erkennungssequenz des Fp-Proteins, 5'-AGGATGTG-3', mit der anderer Transkriptionsfaktoren ergab eine auffallende Homologie mit der Erkennungssequenz der ets-Familie. Bereits über 30 verwandte Proteine sind in dieser Familie zusammengefaßt, die als besonderes Merkmal eine konservierte DNS-Bindungsdomäne, die sogenannte "ets-Domäne", besitzen. Diese Domäne wurde in Proteinen vieler verschiedener Spezies vom Menschen bis zu Drosophila gefunden (Watson et al., 1988a; Karim et al., 1990; Gutman und Wasylyk, 1991; Seth et al., 1992). Die ets-Domäne, die 85 Aminosäuren umfaßt, hat keine strukturelle Homologie mit anderen DNS-Bindemotifen, wie Zink-Finger, "leucine zipper", Homeodomäne und "helix-turn-helix"-Motif. Diese Proteine haben als Kontaktpunkte in der Erkennungssequenz die Sequenzfolge 5'-GGA-3', die auch für die Fp-Proteine von Bedeutung ist. Die benachbarten Sequenzen in der Erkennungssequenz sind jedoch variabel und sind für die Bindungsspezifität der einzelnen Ets-Proteine verantwortlich. (Übersichtsartikel: Macleod et al., 1992; Wasylyk et al. 1993).

Um den Verwandtschaftsgrad des Fp-Proteins mit verschiedenen Ets-Transskriptionsfaktoren festzustellen und zu untersuchen, ob das Fp-Protein mit einem bereits bekannten Ets-Protein identisch ist, wurden verschiedene Erkennungssequenzen der ets-Familie als synthetische Oligonukleotide hergestellt und in Gelretardations-Experimenten als Kompetitoren eingesetzt. Hierzu ausgewählt wurde die TCR α -Sequenz, aus dem T-Zellrezeptor α Enhancer, die bevorzugt von Ets-1 gebunden wird (Ho, I.-C. et al., 1990). Eine weitere ets-Erkennungssequenz aus dem Interleukin 2 Enhancer NF-AT ("nuclear factor of activated T cells"), an die der Faktor Elf-1 bindet (Thompson et al., 1991). Als dritte Sequenz wurde aus dem Polyoma Virus Enhancer, die PEA3-Sequenz, gewählt, die von Ets-1, Ets-2, Erg und Elk-1 erkannt wird und somit die geringste Bindungsspezifität besitzt (Wasylyk et al. 1990)

Vergleicht man die Sequenzen der ausgewählten Oligonukleotide, so stimmt die Erkennungssequenz des TCR α -Oligonukleotid zu 100% mit der des Fp-Proteins überein. Erst in den benachbarten Sequenzen unterscheiden sich die beiden Oligonukleotide. Die Übereinstimmung mit den anderen Erkennungssequenzen NF-AT und PEA3 ist geringer (siehe Abb. 24).

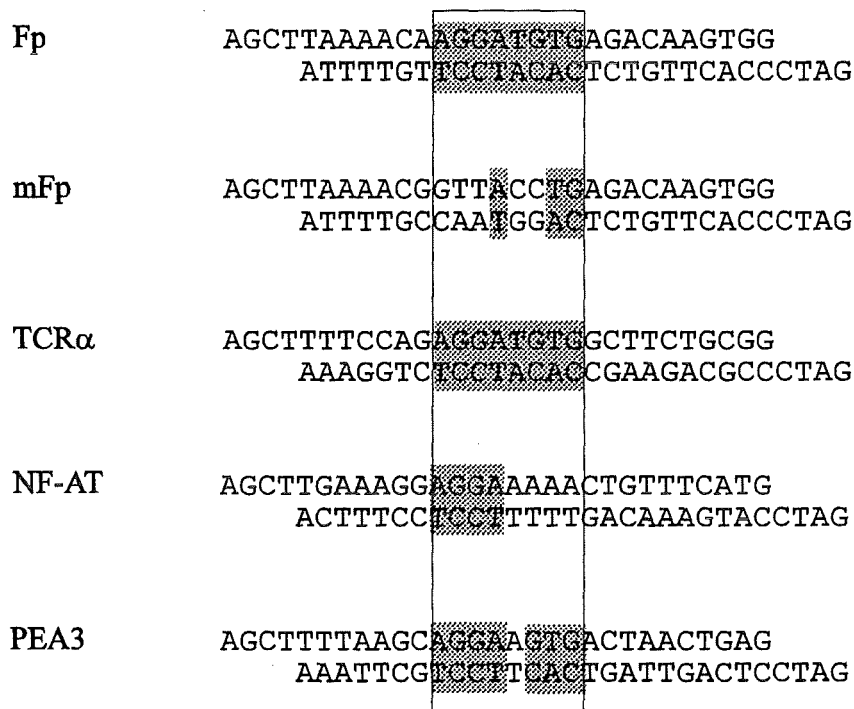


Abb.24 Sequenzvergleich verschiedener ets-Oligonukleotide mit dem Fp- und dem mFp-Oligonukleotid. TCR α aus dem Enhancer des T-Zellrezeptor α ; NF-AT, aus dem Interleukin 2 Enhancer; PEA3, aus dem Enhancer des Polyoma Virus. Der Kasten umrahmt die ets-Erkennungssequenzen der Oligonukleotide, die grau hinterlegten Flächen zeigen die Basen an, die mit der Fp-Erkennungssequenz übereinstimmen.

Nach Inkubation des radioaktiv markierten Fp-Oligonukleotids mit Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen entsteht der spezifische Komplex A, der durch ein Überschuß an unmarkiertem Fp-Oligonukleotid kompetiert wird und der durch Competition mit der Mutanten mFp unbeeinflusst bleibt (siehe Abb. 25, Spur 1, 2 und 3). Die ebenfalls in 100-fachem molaren Überschuß eingesetzten Oligonukleotide PEA3, TCR α und NF-AT sind ebenfalls in der Lage die spezifische Doppelbande zu kompetieren (siehe Spur 4, 5 und 6). Das sequenzfremde Oligonukleotid F3 beeinflusst die spezifische Bindung nicht (Spur 7).

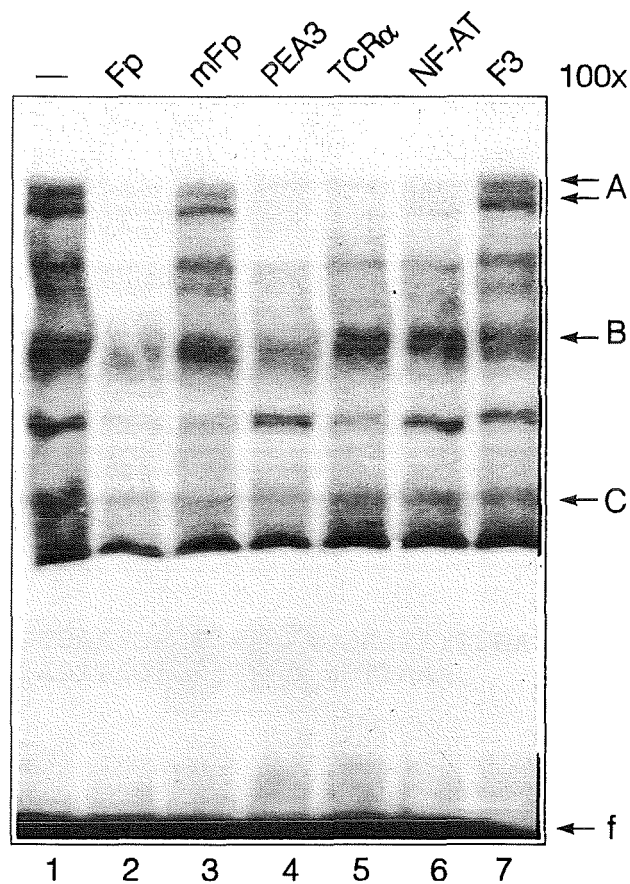


Abb. 25 Die ets-Oligonucleotide PEA3, TCR α und NF-AT sind in der Lage den spezifischen Komplex am Fp-Oligonucleotid zu kompetieren. Autoradiogramm einer Gelretardations-Analyse mit 10 μ g Kernextrakt aus konfluenten NIH 3T3-Zellen und 10 fmol (20000cpm) radioaktiv endmarkiertes Fp-Oligonucleotid. Die angegebenen Kompetitoren wurden im 100-fachen molaren Überschuß zugegeben. A, B und C bezeichnen die entstandenen Protein/DNS-Komplexe, f das freie Oligonucleotid.

Die Kompetition des spezifischen Komplex A am Fp-Oligonucleotid durch die verschiedenen ets-Oligonucleotide zeigt, das die Fp-Proteine an die Erkennungssequenzen der verschiedenen Ets-Proteine binden können. Dadurch wurde gezeigt, daß die Fp-Proteine zur Familie der Ets-transkriptionsfaktoren gehören.

In den folgenden Gelretardations-Analysen mit radioaktiv markiertem PEA3, TCR α und NF-AT und Kernextrakt aus NIH 3T3-Zellen, wurden über Kreuz Kompetitionen durchgeführt, um über die Bindungsaffinität der spezifisch bindenden Proteine Aussagen über den Verwandtschaftsgrad der verschiedenen Ets-Proteine und der Fp-Faktoren abzuleiten.

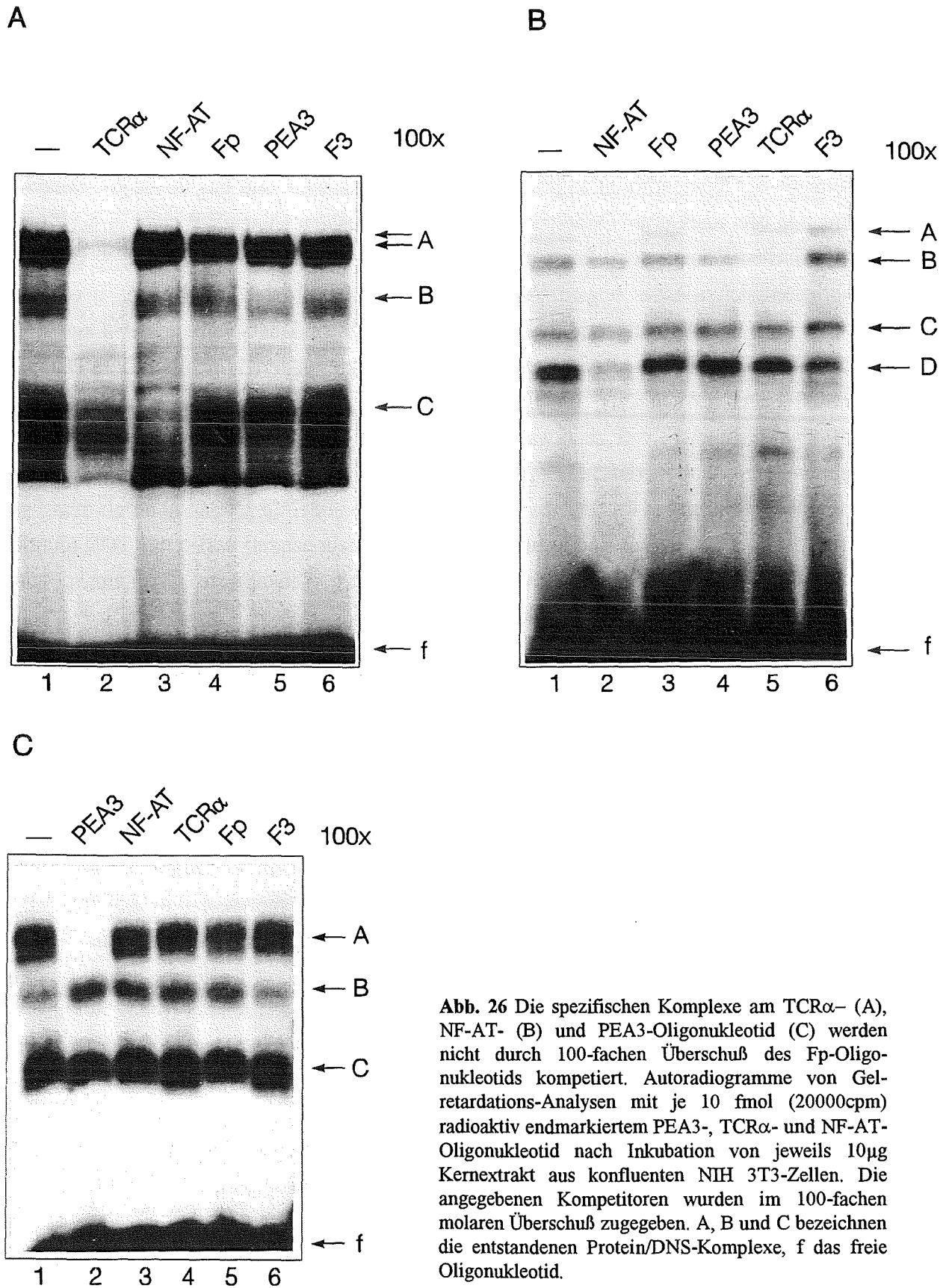


Abb. 26 Die spezifischen Komplexe am TCR α - (A), NF-AT- (B) und PEA3-Oligonukleotid (C) werden nicht durch 100-fachen Überschuß des Fp-Oligonukleotids kompetiert. Autoradiogramme von Gelretardations-Analysen mit je 10 fmol (20000cpm) radioaktiv endmarkiertem PEA3-, TCR α - und NF-AT-Oligonukleotid nach Inkubation von jeweils 10 μ g Kernextrakt aus konfluenten NIH 3T3-Zellen. Die angegebenen Kompetitoren wurden im 100-fachen molaren Überschuß zugegeben. A, B und C bezeichnen die entstandenen Protein/DNS-Komplexe, f das freie Oligonukleotid.

Durch die Kompetition mit einem Überschuß an homologem unmarkiertem Oligonukleotid wurden die spezifischen Komplexe an den radioaktiv markierten Oligonukleotiden festgestellt. An dem TCR α -Oligonukleotid sind das die Komplexe A und B (siehe Abb. 26 A, Spur 2), an dem NF-AT-Oligonukleotid ist es der Komplex D (siehe Abb. 26 B, Spur 2) und an dem PEA3-Oligonukleotid der Komplex A (siehe Abb. 26 C, Spur 2).

Die anderen als Kompetitoren zugesetzten ets-Oligonukleotide und das Fp-Oligonukleotid sind bei den drei markierten Oligonukleotiden bei 100-fachem Überschuß nicht in der Lage die spezifischen Komplexe zu kompetieren (siehe Abb. 26 A, B und C, Spur 3, 4, und 5). Sie verhalten sich wie das sequenzfremde F3 Oligonukleotid (siehe Abb. 26 A, B und C, Spur 6). Das Fp-Oligonukleotid war erst bei 200-fachem Überschuß in der Lage den spezifischen Komplex A des TCR α -Oligonukleotids zu kompetieren (nicht gezeigte Daten). Da die Erkennungssequenzen im TCR α -Oligonukleotid und im Fp-Oligonukleotid zu 100 % übereinstimmen, war zu erwarten, daß diese Oligonukleotide sich gegenseitig die Proteinbindung kompetieren können. Daß die Affinität der spezifisch an das TCR α -Oligonukleotid bindenden Proteine zu dem TCR α -Oligonukleotid größer ist als zu dem Fp-Oligonukleotid zeigt, daß es sich nicht um das selbe Protein handelt das an das TCR α - und das Fp-Oligonukleotid bindet und daß zusätzlich benachbarte Sequenzen der Erkennungssequenz die Bindungsaffinität beeinflussen.

Die Schlußfolgerung aus diesen kreuzweise durchgeführten Kompetitionsversuchen in der Gelretardations-Analyse ist, daß die verwendeten Oligonukleotide Fp, TCR α , PEA3 und NF-AT spezifische Proteine binden, die untereinander verwandt, jedoch nicht identisch sind. Die spezifischen Fp-Proteine haben eine Bindungsaffinität zu allen verwendeten ets-Oligonukleotiden. Jedoch zeigt keines der spezifischen Proteine am TCR α , PEA3 und NF-AT-Oligonukleotid eine vergleichbare Bindungsaffinität zu dem Fp-Oligonukleotid. Das bedeutet, daß die Fp-Proteine in die Familie der Ets-Proteine gehören, daß es sich aber sehr wahrscheinlich weder um das Ets-1-, das Ets-2-, das Erg-, das Elk-1- noch um das Elf-1-Protein handelt, die spezifisch an das PEA3-, TCR α - bzw. NF-AT-Oligonukleotid binden können. Eine eindeutige Aussage zur Charakterisierung der spezifischen Proteine wäre erst nach Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen die bereits bekannten Ets-Proteine möglich gewesen, die jedoch nicht zur Verfügung standen.

Um auf einem anderen experimentellen Weg die Zugehörigkeit der Fp-Proteine zu der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren zu zeigen wurde ein monoklonaler Antikörper, der gegen die ets-Domäne gerichtet ist (Pan-ets Antikörper) (Yoganathan et al. 1992) in ein Gelretardations-Experiment eingesetzt. Der Antikörper wurde mit dem Kernextrakt für die Gelretardations-Analyse für 2 h vorinkubiert. Nach Zugabe des markierten Oligonukleotids

wurde für weitere 30 Minuten inkubiert, um die Bindung der Proteine an das Oligonukleotid zuzulassen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel.

Zunächst wurde mit Wettbewerbsansätzen der spezifische Komplex A aus NIH 3T3-Extrakt am Fp-Oligonukleotid hervorgehoben (siehe Abb. 27, vergleiche Spur 1 mit 2 und 3). Zu den weiteren Ansätzen, ohne Wettbewerber, wurden steigende Mengen des Pan-ets Antikörpers eingesetzt (siehe Spur 4, 5 und 6).

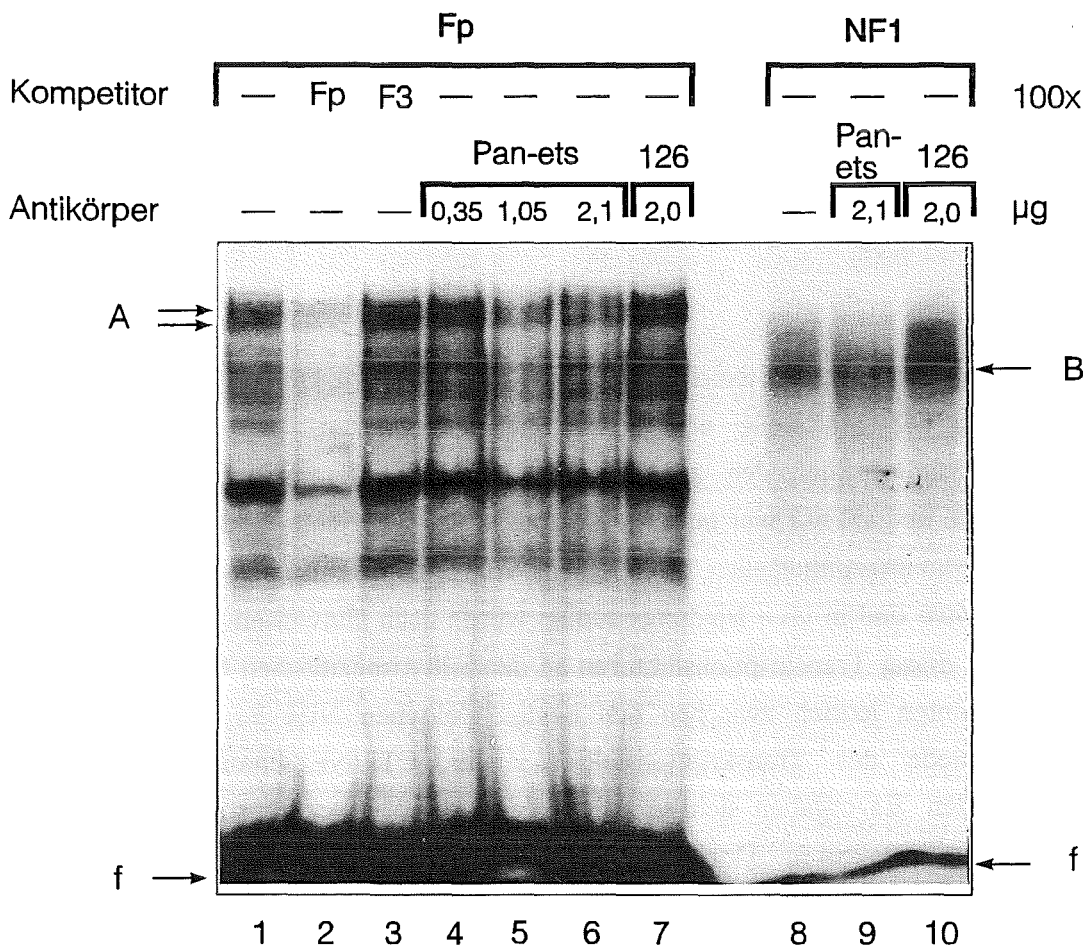


Abb. 27 Der Pan-ets Antikörper erkennt die Fp-Proteine und schwächt die Bindung am Fp-Oligonukleotid ab. Autoradiogramm einer Gelretardationsanalyse mit je 10 µg Kernextrakt aus konfluent wachsenden NIH 3T3-Zellen und 10 fmol (20000 cpm) endmarkiertem Fp-Oligonukleotid. Die Kernextrakte wurden mit den monoklonalen Antikörper Pan-ets und 126 für 2 h vorinkubiert. Die Wettbewerber Fp und F3 wurden im 100-fachen molaren Überschuß zugegeben. A und B bezeichnen die spezifischen Komplexe; f, das freie Oligonukleotid.

Da der Antikörper die DNS-Binderegion der Ets-Proteine erkennt, kann das Protein, das von dem Antikörper gebunden wird, nicht mehr an die DNS binden. Daraufhin ist eine Abschwächung des spezifischen Komplex A zu erkennen (siehe Spur 5 und 6). Im Gegensatz dazu beeinflusst die Anwesenheit eines anderen monoklonalen Antikörpers, der gegen den Aminoterminus des Progesteronrezeptors gerichtet ist (126) die Bindung des Komplex A nicht. Zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten monoklonalen Antikörper wurde gezeigt, daß diese Antikörper die Bindung der Proteine, die spezifisch an das NF1-Oligonukleotid binden nicht abschwächen (siehe Abb. 27, Spur 8, 9 und 10).

Aufgrund der Bindungsspezifität zu den verschiedenen ets-Erkennungssequenzen und durch Reaktion mit dem ets-spezifischen monoklonalen Antikörper konnte gezeigt werden, daß die Fp-Proteine zu der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren gehören und daß sie sich von den Ets-Proteinen unterscheiden, die spezifisch an die TCR α -, NF-AT- und PEA3-Erkennungssequenz binden. Erst nach Reinigung der Fp-Faktoren und Klonierung des Gens kann durch Sequenzvergleich festgestellt werden, um welche Faktoren es sich handelt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Sequenzen des MMTV LTR von Position -235 bis +122 bezüglich der Startstelle der Transkription ausreichen, um zelltypspezifische Expression in Mamaepithelzellen zu vermitteln. Von den Transkriptionsfaktoren der CTF/NF1-Familie und OTF-1 war bekannt, daß sie an der zell-dichte-induzierte Expression des MMTV in Mammaepithelzellen, die ebenfalls von diesen Sequenzen ausgeht, beteiligt sind. Durch *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien wurde nach Hinweisen gesucht, die auch eine Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der zelltypspezifischen Expression zeigen können. Es konnten jedoch zwischen den beiden Zelltypen NIH 3T3 und GR keine Mengenunterschiede der Transkriptionsfaktoren der CTF/NF1-Familie und OTF-1 festgestellt werden. Es ergaben sich auch keine Hinweise auf zelltypspezifische Spezies dieser Transkriptionsfaktoren. Durch die DNase I-Protektionsanalyse wurde der neue Faktor Fp entdeckt, der die zell-dichte-induzierte Expression des MMTV in NIH3T3-Zellen unterdrückt und damit zu einer zelltypspezifischen Expression führt. Der Faktor Fp gehört aufgrund seiner Bindungsspezifität zu der typischen ets-Erkennungssequenz und durch Reaktion mit einem ets-spezifischen Antikörper zu der ets-Familie der Transkriptionsfaktoren. *In vitro* Bindungsstudien zeigen, daß die Fp-Proteine, obwohl sie nur in NIH 3T3-Zellen als zelltypspezifischer Repressor aktiv sind, auch in GR-Zellen vorkommen.

Mögliche Mechanismen zur Erklärung der zelltypspezifischen Regulation, die vom MMTV HRE ausgehen, werden in der anschließenden Diskussion beschrieben.

Diskussion

Die Steuerung der Expression des genetischen Programms einer Zelle wird durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen DNS-Elementen vermittelt. Um die regulatorischen Mechanismen möglichst direkt zu untersuchen und dabei auch die Organisation der genomischen DNS im Chromatin zu berücksichtigen, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Analysetechniken angewandt. In dieser Arbeit wurde am Beispiel des Maus Mamma Tumor Virus der regulatorische Einfluß des MMTV HRE auf die zelltypspezifische Expression des Virus in Mammaepithelzellen studiert.

1. Positive und negative Regulationsmechanismen der zelltypspezifischen Expression des MMTV

Im LTR des MMTV befinden sich mehrere Regulationselemente, die jedes für sich alleine aktivierend bzw. reprimierend wirken können. Zwischen Position -1094 bis -739 des MMTV LTR befindet sich der E1 Enhancer, der als Aktivator mammazellspezifische Expression vermitteln kann (Mink et al., 1992). Die Ergebnisse der stabilen Transfektionsexperimente in dieser Arbeit zeigen, daß die MMTV LTR Sequenzen von Position -253 bis +122 ausreichen, um zelltypspezifische Expression in Mammaepithelzellen zu vermitteln. Im Gegensatz zu den Sequenzen des E1 Enhancers wirkt dieses Element jedoch reprimierend auf die Expression. Ein weiteres regulatorisches Element befindet sich zwischen Position -427 bis -364 im MMTV LTR. Deletion beziehungsweise Mutation dieses Elements führen zu einer erhöhten Expression des MMTV. Diese Sequenzen haben somit ebenfalls einen negativ regulatorischen Einfluß auf die Expression des MMTV und werden als NRE (negativ regulatorisches Element) bezeichnet (Morley et al., 1987; Mink et al., 1990; Lee et al., 1991).

Der E1 Enhancer enthält Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren. Dabei besteht das Minimalmodul der mammaspezifischen Aktivierung aus einer Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor der CTF/NF1-Familie und der Erkennungssequenz des Transkriptionsfaktors MAF (mammazellspezifisch aktivierender Faktor). Über seine spezifische Erkennungssequenz und durch Konkurrenzexperimente wurde dieser Faktor als Mitglied der ets-Familie charakterisiert (Huck, 1993). Innerhalb der Sequenzen von Position +235

bis +122 des MMTV LTR befinden sich Bindungsstellen für einen Faktor der CTF/NF1-Familie und OTF-1, die für die Expression in Mammaepithelzellen benötigt werden. In dieser Arbeit konnte die Bindungsstelle für den neu definierten Repressor Fp im HRE identifiziert werden, der die Expression des MMTV zelltypspezifisch unterdrückt. Das NRE enthält zwei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die jedoch nicht mit der Bindungsstelle für den Repressor Fp innerhalb des HRE übereinstimmen. Die regulatorischen Proteine dieses NRE sind noch nicht identifiziert. Es wurde jedoch bereits gezeigt, daß die effektivste Repression der MMTV Expression durch das Zusammenwirken des NRE und den Sequenzen des HRE vermittelt wird (Lee et al., 1991). Das MMTV LTR enthält somit verschiedene positive und negative Squencelemente durch deren Zusammenspiel die Expression des MMTV reguliert wird.

2. Die Rolle der Transkriptionsfaktoren NF1 und OTF1 bei der zelltypspezifischen Genregulation des MMTV

Durch Punktmutationen im Bereich der NF1 und OTF-1 Bindungsstellen war gezeigt worden, daß diese Faktoren wichtig sind für die erhöhte Expression des MMTV in Mammaepithelzellen (Nierlich, 1989; Härtig 1993). Daher wurde zunächst untersucht ob diese Faktoren auch an der Vermittlung der zelltypspezifischen Expression des MMTV beteiligt sind. Interessanterweise beinhalten beide Zelltypspezifität vermittelnde Sequenzen des MMTV, sowohl der E1 Enhancer als auch die Sequenzen des HRE, eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor der CTF/NF1-Familie. Im Unterschied zu der palindromischen NF1-Bindungssequenz des HRE TGG C/A (N)₅ TCCA befindet sich im E1 Enhancer die halbpalindromische Erkennungssequenz TGGCA. Die zelltypspezifische Expression, die sowohl vom E1 Enhancer als auch vom HRE ausgeht, könnte durch eine größere Menge der NF1-Faktoren bzw. das Auftreten einer mammspezifischen NF1-Spezies in Mammaepithelzellen erklärt werden. Die Vergleichende *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien zwischen der Mammaepithelzelllinie GR und der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 zeigten jedoch keine qualitativen und quantitativen Unterschiede der NF1-Faktoren. Es können jedoch zelltypspezifische Modifikationen existieren, die durch die angewandten Untersuchungen nicht entdeckt werden konnten. Es ist weiterhin möglich, daß ein zelltypspezifischer Cofaktor für NF1 existiert.

Faktoren der CTF/NF1-Familie sind für sich alleine nur schwache transkriptionelle Aktivatoren. Möglicherweise sind Faktoren der CTF/NF1-Familie alleine nicht in der Lage zelltypspezifische Expression zu vermitteln, aber in Kooperation mit anderen Faktoren

können sie eine wichtige Rolle spielen. Es sind eine Reihe von Genen bekannt in denen CTF/NF1-Faktoren im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren zelltypspezifische Expression vermitteln. So zum Beispiel in dem leberspezifischen Enhancer des Albuminogen (Jackson et al., 1993), bei der adipocyten-spezifischen Genexpression (Graves et al., 1991) und ebenso, wie bereits beschrieben, im E1 Enhancer durch Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor MAF.

In der direkten Nachbarschaft der NF1-Bindungsstelle im HRE befinden sich zwei Oktamer-Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor OTF-1 (Brüggemeier et al., 1991), der durch direkte Wechselwirkung mit dem NF1-Faktor die zelltypspezifische Expression vermitteln könnte. OTF-1 ist ein ubiquitär verbreiteter Transkriptionsfaktor. Dagegen kommt ein weiteres Familienmitglied der Oktamer-bindenden Faktoren, OTF-2, nur in lymphatischen Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle bei der zelltypspezifischen Regulation der Immunglobulingene (Staudt et al., 1986; Scheidereit et al., 1987). Die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Bindungsstudien ergaben jedoch keinerlei Hinweise für einen zelltypspezifisch bindenden Oktamerfaktor bzw. Mengenunterschiede des Faktors in Mammaepithelzellen und Fibroblasten. Daß die NF1- und OTF-1- Faktoren jedoch gemeinsam für die erhöhte basale Expression zuständig sind geht aus der funktionellen Analyse der Punktmutanten der NF1 und OTF-1 Bindungsstellen hervor (Härtig et al., 1993), denn die Mutation nur einer der beiden Bindungsstellen führt dazu, daß keine basale Expression mehr festzustellen ist.

Es ist bislang nicht bekannt ob es zu direkten Wechselwirkungen zwischen dem NF1-Faktor und dem ebenfalls im HRE bindenden Repressor Fp kommt. Die funktionelle Analyse der Mutation in der Repressorbindungsstelle führt in Fibroblasten zu einer erhöhten basalen Expression des MMTV, die der in Mammaepithelzellen entspricht. Aus den hier dargestellten Daten geht hervor, daß die Transkriptionsfaktoren NF1 und OTF-1 an der Vermittlung der erhöhten basalen Expression des MMTV beteiligt sind, daß jedoch die zelltypspezifische Expression durch die Wirkung des Repressors Fp vermittelt wird.

3. Mögliche Mechanismen der zelltypspezifischen Repression durch den Faktor FP

Repression als Regulationsmittel der Genexpression ist ein weit verbreiteter Mechanismus. In Bakterien wird eine Vielzahl von Genen durch Repression reguliert. Das klassische Beispiel ist die Regulation des Lac-Operon (Jacob und Monod, 1961; Gilbert und Müller-

Hill, 1966). Bei Hefen wird zum Beispiel der Paarungstyp-Locus MAT zur Festlegung des Zelltyps durch Repression reguliert (Übersichtsartikel: Herskowitz, 1989). In Eukaryoten existieren bislang wenige Beispiele für die Regulation der Genexpression durch Repression. Ein Beispiel für Repression bei Eukaryonten ist die zelltypspezifische Regulation der Expression der Immunglobulin-Gene (IgH) in B-Zellen. Wird eine B-Zelle mit einer nicht lymphatischen Zelle oder einer T-Zelle fusioniert, so wird die zelltypspezifische Expression der IgH Gene verhindert (Imler et al., 1987; Zaller et al., 1988). Behandelt man hingegen nicht-lymphatische Zellen, die mit einem IgH-Gen transfiziert worden waren, mit einem Proteinsyntheseinhibitor, so wird die Expression des Immunglobulin-Gens aktiviert (Ishihara et al., 1984). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß in nicht lymphatischen Zellen ein Repressor existiert, der die Expression der Immunglobulingene unterdrückt. Die genauen Mechanismen der Repression sind nicht bekannt. In anderen zelltypspezifisch exprimierten Genen konnten in den regulatorischen Sequenzen Bereiche identifiziert werden, die als Silencer die Genexpression unterdrücken. So zum Beispiel im Albumin-Enhancer der Maus, der eine leberspezifische Expression vermittelt (Herbst et al., 1989), im Hühnchen Lysozym-Gen konnten zwei Silencer-Elemente charakterisiert werden (Banahmad et al., 1987) und auch im Gen des Wachstumshormon von Ratten wurden negativ-wirkende Elemente ermittelt, die an der Regulation der zelltypspezifische Expression beteiligt sind (Larsen et al., 1986). In den aufgeführten Beispielen ist es jedoch bislang nicht gelungen zelltypspezifische Repressoren zu identifizieren und klonieren und damit den genauen Wirkungsmechanismus aufzuklären.

Prinzipiell existieren zu der Wirkung reprimierender Transkriptionsfaktoren mehrere Beispiele, die bei der Regulation verschiedener Gene verwirklicht sind. Wenn die Bindungsstelle des Repressor mit der Bindungsstelle eines spezifischen transkriptionellen Aktivators oder eines generellen Transkriptionsfaktors, wie TFIID, überlappt so kompetiert der Repressor mit dem Aktivator um die Bindungsstelle. In diesem Fall hängt die Transkriptionsrate vom Verhältnis Repressor zu Aktivator und den Bindungsaffinitäten der beiden Faktoren ab. (Übersichtsartikel Levine und Manley, 1989). Dieser Mechanismus ist vor allem bei Bakterien weit verbreitet. Eine weitere Möglichkeit ist, daß der Repressor an die DNS bindet, mit einem benachbarten sequenzspezifischen Aktivator durch Protein/Protein-Wechselwirkung interagiert und dadurch verhindert, daß der Aktivator seine Funktion erfüllen kann. Dieser Mechanismus wird als "Quenching" bezeichnet und spielt bei der Festlegung des Paarungstyps bei Hefen eine Rolle (Keleher et al., 1988). Bei der dritten Variante der Repression bindet das reprimierende Protein selbst nicht an die DNS verhindert aber über den direkten Protein/Protein-Kontakt mit einem transkriptionellen Aktivator die Aktivierung der Transkription. Ein Beispiel hierfür ist die

Repression der AP1 vermittelten Aktivität des Collagenase-Promotors durch den Glukokortikoidrezeptor (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Eine weitere Möglichkeit der Repression wird durch den direkten Kontakt des Repressors mit den Faktoren des basalen Transkriptionsapparates erreicht, wodurch die Transkriptionsrate verringert wird. Dieser Mechanismus wird als "direkte" Repression beschrieben. Dieses Beispiel wird für das Repressorprotein Eve ("Even-skipped") in *Drosophila* angenommen (Han und Manley, 1993).

Da die Bindungsstelle des Repressors Fp im MMTV HRE nach den bisherigen Analysen nicht mit einer anderen Bindungsstellen überlappt, kommt die Konkurrenz als Mechanismus der Repression im MMTV nicht in Frage. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können keine Wechselwirkungen des Repressors Fp mit anderen Proteinen im MMTV LTR nachgewiesen werden. Die Repression kann folglich durch Protein/Protein-Interaktion mit den aktivierenden Transkriptionsfaktoren NF1 bzw. OTF-1 erfolgen oder durch direkten Kontakt mit den Faktoren des Transkriptionsapparates, der aus dem TATA-Box bindenden Faktor (TBP), den Initiationsfaktoren TFIIA, -B, -E, -H, -G, -F und der RNA-Polymerase II besteht. Durch die relative Nähe dieser Faktoren im Promotor des MMTV sind beide Möglichkeiten vorstellbar.

Durch die Bindungsstudien konnte keine zelltypspezifische Verteilung der Fp-Proteine festgestellt werden. Die Regulation der Expression des MMTV erfolgt daher wahrscheinlich nicht durch eine zelltypspezifische Expression des Repressors. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß in den unterschiedlichen Zelltypen verschiedenen Fp-Proteine vorliegen, die durch die angewandten Analysetechniken nicht unterschieden werden konnten.

Aus diesen Überlegungen heraus können verschiedene Modellvorstellungen entwickelt werden, die die zelltypspezifische Genexpression durch den Repressor Fp erklären. Dabei wird zunächst die Existenz verschiedener Fp-Proteine in den unterschiedlichen Zelltypen angenommen, die beide zu der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren gehören. Jedoch nur das spezifisch in Fibroblasten vorkommende Protein erfüllt die Repressorfunktion. Damit ist die Regulation der Repressor-Expression für die zelltypspezifische Expression des MMTV zuständig (siehe Abb. 30, A). Es könnte jedoch auch in beiden Zelltypen dasselbe FP-Protein vorkommen, das in Fibroblasten zelltypspezifisch modifiziert wird und dadurch nur dort funktionell aktiv ist. Die Zelltypspezifität wird dann durch die Regulation der Modifikation bestimmt (siehe Abb. 30, B). Bei den ersten beiden Beispielen ist es möglich, daß die Repression durch Protein/Protein-Wechselwirkung mit den Transkriptionsfaktoren NF1 bzw. OTF-1 oder direkt mit Faktoren des Transkriptionsapparates erfolgt. Eine

weitere Möglichkeit wäre, daß ein zelltypspezifischer Koaktivator für das Fp-Protein existiert, der die Repression direkt auf den Transkriptionsapparat überträgt (siehe Abb. 30, C). In allen drei Beispielen kommt es in Mammaepithelzellen zu keiner Repression und von den Faktoren NF1 und OTF1 geht die erhöhte Expression des MMTV aus.

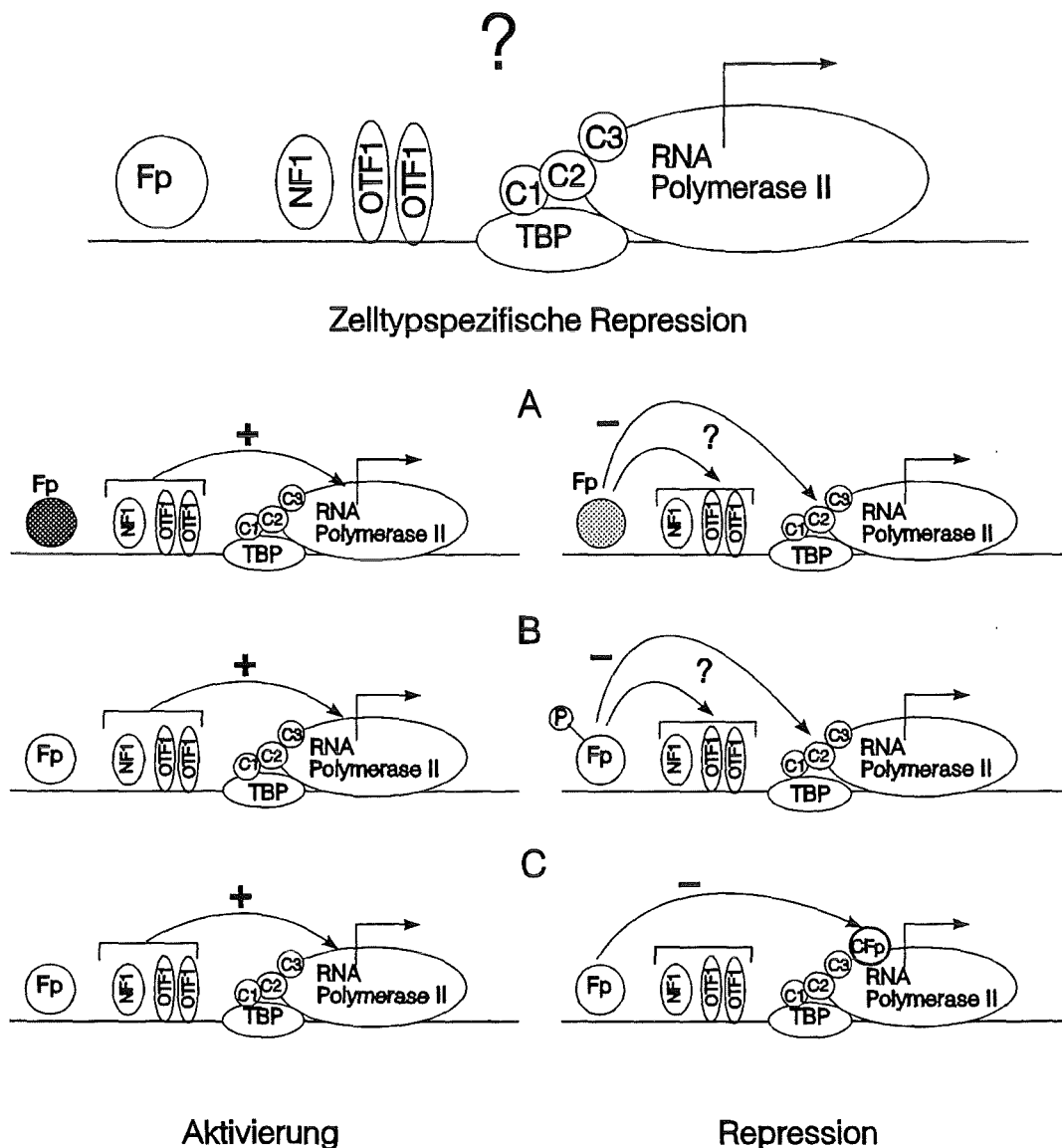


Abb. 28 Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen zur zelltypspezifischen Repression des MMTV. **A.** Zelltypspezifische Repression durch verschiedene zelltypspezifische FP-Proteine. **B.** Zelltypspezifische Repression durch zelltypspezifische Modifikation des FP-Proteins. **C.** Zelltypspezifische Repression durch die Kooperation mit einem zelltypspezifischen Koaktivator, CFp. Die Transkriptionsfaktoren Fp, NF1 und OTF-1 werden durch die geometrischen Formen dargestellt und einige Koaktivatoren werden mit C1 bis C3 bezeichnet. Der basale Transkriptionsapparat wird stark vereinfacht durch das TATA-Box bindende Protein (TBP) und der RNA-Polymerase II dargestellt. Das Negativzeichen - zeigt die Repression an, + steht für Aktivierung.

Welcher dieser postulierten Mechanismen bei der Repression des MMTV verwirklicht ist, kann erst nach Reinigung und Klonierung des Repressors entschieden werden. Zur Analyse spezifischer Wechselwirkungen mit anderen Proteinen sind spezifische Antikörper nötig, die erst nach der Reinigung des Faktors hergestellt werden können.

Der Repressor Fp gehört aufgrund seiner Bindungsspezifität und durch die Reaktion mit einem ets-spezifischen Antikörper zur Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren. Es handelt sich hierbei um eine sehr heterogene Familie, die als gemeinsames strukturelles Merkmal die ets-Bindedomäne besitzt. Das Expressionsmuster der Gene verschiedener Mitglieder der ets-Familie variiert zwischen verschiedenen Geweben und die Regulation der Expression findet auf der Ebenen der Transkriptionsinitiation, des alternativen Spleißens, der posttranskriptionellen Modifikation (Koizumi et al., 1990) oder der Proteinstabilität statt (Übersichtsartikel Macleod et al., 1992; Wasylyk et al., 1993). Von diesen Regulationsmechanismen für Ets-Proteine ausgehend ist es vorstellbar, daß die postulierten Repressionsmechanismen für den Fp-Faktor, bei dem ein zelltypspezifischer Faktor bzw. eine zelltypspezifische Modifikation vorliegt, in der Zelle verwirklicht sind.

Die Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie wirken in einer Reihe von Genen als transkriptionelle Aktivatoren. Dies konnte am Beispiel des Moloney Maus Sarcoma Virus (MSV) und des menschlichen T-Zell Leukemie Virus (HTLV-1) gezeigt werden, die beide im LTR eine ets-Bindungsstelle besitzen, an die die Faktoren Ets-1 und Ets-2 binden können (Gunther et al., 1990; Bosselut et al., 1990). Ets-1 kann in Hela Zellen die Expression des Stromolysin-1 Gens der Ratten aktivieren (Wasylyk et al., 1991).

In manchen Genen erfolgt diese Aktivierung in Kooperation mit anderen Proteinen, wie für den Polyomavirus Enhancer gezeigt werden konnte. Hier kommt es durch Protein/Protein-Interaktion zwischen dem Ets-Faktor PEA3 und dem benachbart bindenden AP1-Komplex zu einer Aktivierung des Polyomavirus Enhancers (Wasylyk et al., 1990). Ein weiteres Beispiel für Aktivierung durch Protein/Protein-Interaktion ist die Aktivierung c-fos Promotors durch den ternären Komplex an dem auf Serum reagierendes Element (SRE). Der an das SRE bindende Faktor SRF bildet mit Mitgliedern der Ets-Familie einen ternären Komplex, wobei sowohl Protein/Protein- als auch Protein/DNS-Wechselwirkungen zur Bildung des Komplexes nötig sind. In dem ternären Komplex am SRE wurden mit Elk-1, SAP1 und SAP2 verschiedene Faktoren der Ets-Familie gefunden, wobei die Funktion, die von dem Komplex ausgeht durch die unterschiedliche Zusammensetzung reguliert werden kann (Hipskind et al., 1991; Janknecht und Nordheim, 1992, Dalton und Treisman, 1992). Diese

Beispiele zeigen, daß Ets-Proteine zur transkriptionellen Aktivierung von Genen vielfältige Wechselwirkungen mit anderen regulatorischen Proteinen eingehen.

Die gewebespezifische Expression einiger Ets-Faktoren führt zu der Schlußfolgerung, daß sie an der Regulation gewebespezifische Expression beteiligt sind. Der Ets-Faktor PU.1 wird nur in Makrophagen und B-Zellen gefunden (Klemsz et al., 1990) und Ets-1 hauptsächlich in T-Zellen (Bhat et al., 1987 und 1989). Ets-1 reprimiert in ruhenden T-Zellen die Expression des T-Zellrezeptor- β Gens (Pognonec et al., 1989). Ets-1 kann somit einerseits aktivierend wirken, wie im Beispiel des Stromolysin Promotors gezeigt wurde und andererseits reprimieren, wie im Beispiel des T-Zellrezeptor- β Gens. Die Wirkung von Ets-1 ist somit vom jeweiligen Promotor Kontext und vom Zelltyp abhängig. Durch Aktivierung ruhenden T-Zellen kommt es zu einer verringerten Ets-1 Expression und zu einer verstärkten Phosphorylierung des Ets-1 Proteins. Diese Phosphorylierung bewirkt eine verringerte DNS-Bindungsaffinität des Ets-1. Beide Mechanismen führen zu einer De-repression des T-Zellrezeptor- β Gens (Pognonec et al. 1989). Dieses Beispiel zeigt, daß neben der Aktivierung auch die Repression von Genen zu dem Funktionsspektrum der Ets-Proteine gehören.

Die Untersuchungen des MMTV LTR haben gezeigt, daß die zelltypspezifische Expression des MMTV sowohl durch aktivierende als auch durch reprimierende Faktoren reguliert wird. Dabei spielen bei beiden Mechanismen Faktoren der Ets-Familie eine Rolle. Es handelt sich hierbei um den mammazellspezifischen Aktivator MAF, der an der Vermittlung der zelltypspezifischen Expression des MMTV in Mammaepithelzellen beteiligt ist und um den in dieser Arbeit identifizierten Repressor Fp, der in Fibroblasten die Expression des MMTV durch Repression unterdrückt. Die zelltypspezifische Expression des MMTV wird durch das komplexe Zusammenspiel mehrerer Faktoren reguliert.

Literaturverzeichnis

- Abt, D., Chong, T., Liu, Y. und Bernard, H.-U. (1993). Nuclear Factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus Type 16. *J. Virol.* **67**:4455-4463.
- Alton, N. und Vapnek, D. (1977). Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon TN9. *Nature (London)* **282**:864-869.
- Andres, A., Schönenberger, C., Groner, B., Henninghausen, L., LeMeur, M. und Gerlinger, P. (1987). Ha-ras oncogene expression directed by milk protein gene promoter: tissue specificity, hormonal regulation and tumor induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 1299-1303.
- Archer, T. K., Lefebvre, P., Wolford, R. G. und Hager, G. L. (1992). Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. *Science* **255**:1573-1576.
- Ausubel, F., Brent, R. Kingston, R., et al., (eds) (1991). *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley and Sons, New York.
- Baniahamad, A. Muller, M., Steiner, Ch. und Renkawitz, R. (1987). Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *EMBO J.* **6**:2297-2303.
- Baumruker, T., Sturm, R. und Herr, W. (1988). OBP 100 binds remarkably degenerate octamer motifs through specific interactions with flanking sequences. *Genes. Dev.* **2**:1400-1413.
- Bentvelzen, P. (1974). Host-virus interaction in murine mammary carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* **355**:236-259.
- Bhat, N. K., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Ascione, R. und Papas, T. S. (1987). Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 3161-3165.
- Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizum, S., Fisher, R. J. und Papas, T. S. (1989). Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: Regulatory role of the protooncogene ETS1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:3723-3727.
- Bittner, J. J. (1936). Some possible effects of nursing on mammary tumor incidence in mice. *Science* **84**:162-168.

- Borgmeyer, U., Nowock, J. und Sippel, A. E. (1984). The TGGCA-binding protein: a eukaryotic nuclear protein recognizing a symmetrical sequence on double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4295-4311.
- Borsselut, R., Duvall, J. F., Gregonne, A., Bailly, M. Hemar, A., Brady, J. und Ghysdael, J. (1990). The product of the c-ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *EMBO J.* **9**:3137-3144.
- Bresnick, E. H., Bustin, M., Marsaud, V., Richard-Foy, H. und Hager, G. L. (1991). The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucleic Acids Res.* **20**: 273-278.
- Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. und Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterisation of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**:47-52.
- Brüggemeier, U., Kalff, M., Franke, S., Scheidereit, C. und Beato M. (1991). Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell* **64**:565-572.
- Brüggemeier, U., Rogge, L., Winnacker, E.-L. und Beato, M. (1990). Nuclear factor I acts as a transcription factor on the MMTV promoter but competes with steroid hormone receptors for DNA binding. *EMBO J.* **9**:2233-2239.
- Cato, A. C. B. und Weinmann, J. (1988). Mineralocorticoid regulation of transcription of transfected mouse mammary tumor virus DNA in cultured kidney cells. *J. Cell. Biol.* **106**:2119-2125.
- Cato, A. C. B., Henderson, D. and Ponta, H. (1987). The hormone response element of the mouse mammary tumor virus mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* **6**:363:368.
- Cato, A. C. B., Miksicek, R., Schütz, G., Arnemann, J. und Beato, M. (1986). The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesteron induction. *EMBO. J.* **5**:2237-2240.
- Cato, A. C. B., Skroch, P., Weinmann, J., Butkeraitis, P. und Ponta H. (1988). DNA sequences outside the receptor-binding sites differentially modulate the responsiveness of the mouse mammary tumor virus to various steroid hormones. *EMBO J.* **7**:1403-1410.
- Church, G. M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1991-1995.
- Cohen, J. C. und Varmus, H. E. (1980). Proviruses of mouse mammary tumor virus in normal and neoplastic tissues from GR and C3Hf mouse strains. *J. Virol.* **35**:298-305.

- Cordingley, M. G., Riegel, A. T. und Hager, G. L. (1987). Steroid dependent interaction of transcription factors with the inducible promoter of mouse mammary tumor virus in vivo. *Cell* **48**:1-10.
- Dalton, St. und Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the serum response element. *Cell* **68**:597-612.
- Darnell, J. E., Jr. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* **297**:365-371.
- de Vries, E., von Driel, W., van der Heuvel, S. J. L. und van der Vlied, P. C. (1987). Contact point analysis of the nuclear faktor 1 recognition site reveals symmetrical binding at one half of the DNA helix. *EMBO J.* **6**:161-168.
- Dickerson, C., Smith, R., Brookes, S. und Peters, G. (1984). Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the common integration region int-2. *Cell* **37**:529-536.
- 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. *Nucleic Acids Res.* **11**:1475-1489.
- Donehower, L. A., Huang, A. L. und Hager, G. L. (1981). Regulatory and coding potential of the mouse mammary tumor virus long terminal redundancy. *J. Virol.* **37**:226-238.
- Doppler, W., Groner, B. und Ball, R. K. (1989). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:104-108.
- Dynan, W. S. (1989). Modularity in promoters and enhancers. *Cell* **58**:1-4.
- Dynlacht, B. D., Hoey, T. und Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**:563-576.
- Elgin, S. C. R. (1988). The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.* **263**:19259-19262.
- Fasel, N., Pearson, K., Buetti, E. und Diggelmann, H. (1982). The region of mouse mammary tumor virus DNA containing the long terminal repeat includes a long coding sequence and signals for hormonally regulated transcription. *EMBO J.* **1**:3-7.
- Felsenfeld, G. (1992). Chromatin an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature (London)* **355**:219-223.
- Felsenfeld, G. und McGhee, J. D. (1986). Structure of the 30nm chromatin fibre. *Cell* **44**:375-347.
- Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M. und Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of Chromatin. *Nature* **269**:29-36.

- Gilbert, W. und Müller-Hill, B. (1966). Isolation of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**:1891-1898.
- Gilbert, W., Maxam, A. und Mirzabekov, A. (1976). Contacts between the Lac repressor and DNA revealed by methylation. In *Control of ribosome synthesis, Alfred Benzon Symposium IX* (ed. N.O. Kjølgaard und o. Maaloe), pp 139-148. Academic Press, New York.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol-acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**:1044-1051.
- Gounari, F., De Francesco, R., Schmitt, J., van der Vliet, P. C., Cortese, R. und Stunnenberg, H. (1990). Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* **9**:559-556.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-467.
- Graves, R. A., Tontonoz, P., Ross, S. R. und Spiegelmann B. M. (1991). Identification of a potent adipocytin-specific enhancer: involvement of an NF1-like factor. *Genes Dev.* **5**: 428-437.
- Groner, B. und Hynes, N. E. (1980). Number and location of mouse mammary tumor virus proviral DNA in mouse DNA of normal tissue and of mammary tumors. *J. Virol.* **33**:1013-1025.
- Gross, D. S. und Garrard, W. T. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:159-197.
- Gunther, C. V., Nye, J. A., Bryner, R. S and Graves, B. J. (1990). Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes. Dev.* **4**:667-679.
- Gutman, A. und Waslyk, B. (1991). Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Genet.* **7**: 49-54.
- Han, K und Manley, J. L. (1993). Transcriptional repression by the Drosophila Even-skipped protein: definition of a minimal repression domain. *Genes. Dev.* **7**:491-503.
- Hanahan, D. (1983). Techniques for the transformation of E. coli. In *DNA cloning*. (D. M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford, **1**: 109-135.
- Härtig, E., Nierlich, B., Mink, S., Nebl, G. und Cato, A. C. B. (1993). Regulation of expression of mouse mammary tumor virus through sequences located in the hormone response element: involvement of cell-cell contact and a negative regulatory factor. *J. Virol.* **67**:813-821.

- Henrad, D. und Ross, S. (1988). Endogenous mouse mammary tumor virus is expressed in several organs in addition to the mammary gland. *J. Virol.* **62**:3046-3049.
- Herbst, R. S., Friedman, N., Darnell, J. E. und Babiss, L. E. (1989). Positive and negative regulatory elements in the mouse albumin enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:1553-1557.
- Herskowitz, I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* **432**:749-757.
- Hipskind, R. A., Rao, V. N., Mueller, C. G. F., Reddy, E. S. P. und Nordheim, A. (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62^{TCF}. *Nature* **354**:531-534.
- Ho, I.-C., Bhat, N. K., Gottschalk, L. R., Lindstein, T., Thompson, C. B., Papas, T. S. und Leiden J. M. (1990). Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T-cell receptor α gene enhancer. *Science* **250**:814-818.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989). Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
- Huck, C. (1993). Charakterisierung der Faktoren, die in die mammaspezifische Expression des Maus Mamma Timor Virus involviert sind. Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- Hynes, N. E., Groner, B. und Michalides, R. (1984). Mouse mammary tumor virus: transcriptional control and involvement in tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* **41**:155-185.
- Hynes, N. E., Van Ooyen, N., Kennedy, P., Herrlich, P., Ponta, H. und Groner, B. (1983). Subfragment of the large terminal repeat cause glucocorticoid responsive expression of mouse mammary tumor virus and an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:3637-3641.
- Imler, J.-L., Lemaire, C., Wasylyk, C. und Wasylyk, B. (1987). Negative regulation contributes to tissue specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **7**:2448-2567.
- Ishihara, T., Kudo, A. und Watanabe, T. (1984). Induction of immunoglobulin gene expression in mouse fibroblasts by cycloheximide treatment. *J. Exp. Med.* **160**: 1937-1942.
- Jackson, D. A., Rowader, K. E., Stevens, K., Jiang, D., Milos, P. und Zaret, K. S. (1993). Modulation of liver-specific transcription by interaction between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2401-2410.

- Janknecht, R. und Nordheim, A. (1992). Elk-1 protein domains for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* **20**:3317-3324.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, St. 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, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J. und Tjian, R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48**:79-89.
- Jones, N. C., Rigby, P. W. J. und Ziff, E. B. (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses, *Genes & Dev.* **2**:267-281.
- Karim, F. D., Urness, L. D., Thummel, C. S., Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., van Beveren, C., Maki, R. A., Gunther, C. V., Nye, J. A. und Graves, B. J. (1990). The ETS- domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.* **4**:1451-1453.
- Keleher, C. A., Goutte, C. und Johnson, A. D. (1988). The yeast cell-type specific repressor $\alpha 2$ acts cooperatively with a non-cell-type specific protein. *Cell.* **53**:927-936.
- Klemsz, A. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C. und Maki, R. A. (1990). The macrophage and B cell specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**:113-124.
- Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, Ch, Bhat, N. K., Seth, A. und Papas, T. S. (1990). Isoforms of the human ets-1 protein: generation by splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* **5**:675-681.
- Kornberg, R. D. und Lorch, Y. (1991). Irresistible force meets immovable object: transcription and the nucleosome. *Cell* **67**:833-835.
- Kugler, W., Wagner, U. und Ryffe, G. (1988). Tissue specificity of liver gene expression: a common liver specific promoter element. *Nucl. Acids Res.* **16**:3165-3174.
- Laemmli, U. D. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-684.
- Larsen, P. R. Harney, J. W. und Moore, D. D. (1986). Repression mediates cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**:8283-8287.
- Lee, J. W., Moffitt, P. G. Morley, K. L. und Peterson, D. O. (1991). Multipartite structure of a negative regulatory element associated with the Steroid hormone-inducible Promoter. *J. Biol. Chem.* **15**:24101-24108.

- Lichtensteiner, S. und Schibler, U. (1989). A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. *Cell* **57**:1179-1187.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Proteinmeasurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Macleod, K., Leprince, D. und Stehelin, D. (1992). The ets gene family. *TIBS* **17**:251-256.
- Maniatis, T., Goodburn, S. und Fischer, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**: 1237-1245.
- Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1980). Sequencing of end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* **65**:499-560.
- Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J. und Tjian, R. (1987). The prolin-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* **58**:741-753.
- Messing, J., Crea, R. und Seeburg, P. H. (1981). A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acid Res.* **9**:309-321.
- Miksicek, R., Borgmeyer, U. und Nowock, J. (1987). Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* **6**:1355-1360.
- Mink, S. Ponta, H. und Cato, A. C. B. (1990). The long terminal repeat region of the mouse mammary tumor virus contain multiple regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **18**:2017-2024.
- Mink, S., Härtig, E., Jennewein, P., Doppler, W. und Cato A. C. B. (1992). A mammary cell-specific enhancer in the mouse mammary tumor virus DNA is composed of binding sites for CTF/NF1 and a transcription factor, novel mammary cell-activating factor. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4906-4918.
- Mitchell, P. J. und Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific binding proteins. *Science* **245**:371-378.
- Moore, R., Casey, G., Brookes, S., Dixon, M., Peters, G. und Dickerson, C. (1986). Sequence, topography and protein coding potential of mouse int-2: a putative oncogene activated by mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* **5**: 519-524.
- Morley, K. L., Toohey, M. G. und Peterson, D. O. (1987). Transcriptional repression of a hormone responsive promoter. *Nucl. Acid Res.* **15**:6973-6988.
- Mueller, P. R. und Wold, B. (1989). *In vivo* footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246**:780-786.

- Munos, B. und Bolander, F. F. (1989). Prolactin regulation of mouse mammary tumor virus (MMTV) expression in normal mouse mammary epithelium. *Mol. Cell. Endocrinol.* **62**:23-29.
- Nandi, S. und McGrath, C. M. (1973). Mammary neoplasia in mice. *Adv. Cancer Res.* **17**:353-414.
- Nierlich, B. (1989). Einfluß der Zelldichte auf die MMTV-Expression in Mammatumorzellen. Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- Nowock, J., Borgmeyer, U., Püschel, A. W., Rupp, A. W. und Sippel, A. E. (1985). The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer. *Nucleic Acids Res.* **13**:2045-2061.
- Nusse, R. (1986). The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion. *Trends Genet.* **2**:244-247.
- Nusse, R. und Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated on the same region of the host genome. *Cell* **31**:99-109.
- Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D. und Graves, B. J. (1992). Interaction of murine Ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* **6**:975-990.
- Owens, B., Smith, H. S. und Hackett A. J. (1974). Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**:261-269.
- Payar, F., DeFranco, D., Firestone, G. L., Edgar, B., Wrangle, Ö., Okret, S., Gustafson, J.-A. und Yamamoto, K. R. (1983). Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* **35**: 381-392.
- Pina, B., Brüggemeier, U. und Beato, M. (1990). Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* **60**:719-731.
- Pitelka, D. R. (1989). The mammary gland. In: *Cell and Tissue Biology. A Textbook of histology.* Sixth edition. (Ed.: Weiss, L.), Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich.
- Pognonec, P., Boulukos, K. E., Gesquiere, J. C., Stehlin, D. und Ghysdael, J. (1988). Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. *EMBO J.* **7**:977-983.
- Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N. E. und Groner, B. (1985). Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat can be

- Pruijn, G. J. M., van Miltenburg, R. T., Claessens, J. A. J. und van der Vliet (1988). Interaction between the octamer-binding protein nuclear factor III and the adenovirus origin of DNA replication. *J. Virol.* **62**:3092-3102.
- Ptashne, M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* **322**:697-701.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**:683-689.
- Richard-Foy, H. und Hager, G. L. (1987). Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promoter. *EMBO J.* **6**:2321-2328.
- Ringold, G. Lasfargues, E. Y., Bishop, J. M. und Varmus, H. E. (1975). Produktion of mammary tumor virus by cultured cells in the absence and presence of hormones; assay by molecular hybridization. *Virology* **65**:135-147.
- Rosenfeld, P. J. und Kelly, T. J. (1986). Purification of nuclear factor 1 by DNA recognition site affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **261**:1398-1408.
- Ross, S. und Solter, D. (1985). Glucocorticoid regulation of mouse mammary tumor virus sequences in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 5880-5884.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York..
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P. C. und Tjian, R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature (London)* **334**: 218-224.
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H. M. und Beato M. (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotid sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature (London)* **304**:749-752.
- Scheidereit, C., Heguy, A. und Roeder, R. G. (1987). Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell* **51**:783-793.
- Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R. K. und Groner, B. (1991). β -casein gene promoter activity is regulated by hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**:3745-3755.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, St., Ransone, L. J., Bolado, J., Yanf, N., Verma, I. M. und Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**:1217-1226.

- Seth, A., Ascione, R., Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G. J., Bhat, N. K. und Papas, T. S. (1992). *Cell Growth Differ.* **3**:327-334.
- Staudt, L. M., Singh, H., Sen, R., Sharp, P. A. und Baltimore, D. (1986). A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature* **323**:640-643.
- Stewart, T. A., Hollingshead, P. G. und Pitts, S. L. (1988). Multiple regulatory domains in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat revealed by analysis of fusion genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 473-479.
- Thompson, C. C., Brown, T. A. und McKnight, S. L. (1991). Convergence of Ets- and Notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* **253**:762-768.
- Topper, Y. J. und Freeman, C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Reviews* **60**:1049-1105.
- Varmus, H. E., Bishop, J. M., Nowinski, R. C. und Sarkar, N. H. (1972). Mammary tumor virus-specific nucleotide sequences in mouse DNA. *Nature (London)* **238**:189-191.
- von der Ahe, D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schütz, G. und Beato, M. (1985). Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature* **313**: 706-709.
- 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., Leprince, D. und Stehlin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-fos and c-jun for transcriptional activation. *Nature* **346**:191-193.
- Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R. und Wasylyk, B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non nuclear oncoproteins. *EMBO J.* **10**:1127-1134.
- Watson, D. K., McWilliams, M. J., Lapis, P., Lautenberger, J. A., Schweinfest, C. W. und Papas, T. S. (1988). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7862-7866.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, E. und Lassar, A. L. (1991). Myo D: a nodal point during the specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**: 761-766.
- 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.

- Yoganathan, T., Bhat, N. K. und Sells, B. H. (1992). A positive regulator of the ribosomal protein gene, factor belongs to the ETS oncoprotein family. *J. Biochem.* **287**:349-353.
- Zaller, D. M., Yu, H. und Eckhardt, L. A. (1988). Genes in the presence of an immunoglobulin enhancer or promoter are negatively regulated by T-lymphoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* **8**:1932-1939.
- Zhou, D. und Yen, T. S. (1991). The ubiquitous transcriptionfactor oct-1 and the liverspecific factor HNF-1 are both required to activate transcription of a hepatitis B virus promoter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1353-1359.