

KfK 5284 B
Januar 1994

**Charakterisierung der Rolle des
Transkriptionsfaktors NF 1 in
der Vermittlung der
mammapithelzellspezifischen
Genexpression**

G. Nebl
Institut für Genetik

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Genetik

KfK 5284B

**Charakterisierung
der Rolle des Transkriptionsfaktors NF1
in der Vermittlung der
mammaepithelzellspezifischen
Genexpression**

Gabriele Nebl

Dissertation
genehmigt von der
Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Fridericiana zu 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

Mitglieder der Transkriptionsfaktorenfamilie NF1 vermitteln die mammaepithelzellspezifische Expression von Genen durch eine Bindung an die NF1-Bindungsstelle deren Promotoren. Darüber hinaus sind NF1-Proteine auch an der Vermittlung gewebespezifischer Genexpression anderer Spezifität beteiligt. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus, durch den NF1-Proteine die mammaepithelzellspezifische Genexpression vermitteln, untersucht.

Protein-DNA-Bindungsstudien mit Mammaepithelzell- und Fibroblasten-Zellkernextrakten wiesen keine zelltypspezifischen Unterschiede der NF1-Bindungsaktivitäten nach. NF1-Transkripte von Mammaepithelzellen und Fibroblasten zeigten keine zelltypspezifischen Unterschiede. Durch die Analyse der NF1/X-Transkripte mit einer sensitiven PCR-gekoppelten Methode wurden verschieden gespleißte NF1/X-Transkriptvarianten isoliert. Die Charakterisierung der Funktion der NF1/X-Transkriptvarianten durch eine Expression in kultivierten murinen Zellen zeigte, daß sie die Aktivität eines Promotors in Mammaepithelzellen und in Fibroblasten vermindern. Die erstmals isolierten NF1/X-Transkriptvarianten unterscheiden sich in Mammaepithelzellen und Fibroblasten weder in ihrer Struktur noch in ihrer Funktionalität.

Die Verhinderung der vollständigen Differenzierung von Mammaepithelzellen und der Expression von Milchproteingenen durch die Transformation der Mammaepithelzellen mit dem Ha-rasA-Onkogen konnte mit einer Verminderung der NF1-Bindungsaktivität durch das Ha-rasA-Onkogen in Mammaepithelzellen korreliert werden. Die Verminderung der NF1-Aktivität wurde jedoch auch beobachtet, wenn das Ha-rasA-Onkogen in Fibroblasten exprimiert wurde.

Diese Untersuchungen der Rolle der NF1-Proteine in der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression führen zu dem Schluß, daß mammaepithelzellspezifisch vorkommende NF1-Proteine vermutlich nicht existieren: Die Vertreter dieser Faktoren in Mammaepithelzellen und Fibroblasten sind identisch und es existiert keine mammaepithelzellspezifische Regulation der NF1-Aktivität.

Es ist wahrscheinlich, daß der Transkriptionsfaktor NF1 seinen mammaepithelzellspezifischen Effekt durch eine Interaktion mit einem anderen mammaepithelzellspezifisch exprimierten Faktor vermittelt. Möglicherweise handelt es sich dabei um den kürzlich identifizierten Faktor MAF, denn in den Promotoren einiger Milchproteingene befindet sich direkt neben der NF1-Bindungsstelle eine Bindungsstelle für MAF.

Abstract

Characterization of the role of transcription factor NF1 in the mediation of mammary cell-type specific gene expression.

NF1-proteins mediate mammary cell-type specific gene expression by binding to specific sites on the promoters of genes they regulate. In addition, NF1-proteins also mediate other tissue-type specific gene expression. In this study the mechanism underlying the action of NF1-proteins in the bestowal of mammary cell-type specific gene expression was investigated.

DNA-protein-interaction studies with nuclear extracts from mammary epithelial cells and fibroblasts did not reveal any cell-type specific differences. NF1-transcripts of mammary epithelial cells and fibroblasts also showed no cell-type specific differences. With the use of a sensitive PCR-coupled technique, several alternatively spliced NF1/X-transcript variants were isolated from mammary epithelial cells in culture. The characterization of the function of these NF1/X-variants in mammary epithelial cells and fibroblasts showed that they repress the promoter activity of indicator genes. The newly isolated NF1/X-variants differ neither in structure nor in function in mammary epithelial cells and fibroblasts.

The inhibition of overt differentiation of the mammary epithelium and expression of milk protein genes by the Ha-rasA-oncogene can be correlated with the downregulation of NF1 binding activity by the Ha-rasA-oncogene in mammary epithelial cells. This downregulation of NF1 binding activity was also observed when the Ha-rasA-oncogene was expressed in fibroblasts.

These studies on the structure and function of NF1-proteins led to the conclusion that mammary epithelial cell-type specific expressed NF1-proteins probably do not exist. The members of this family of transcription factors are identical in mammary epithelial cells and fibroblasts.

The transcription factor NF1 most likely mediates mammary epithelial cell-type specific effects via an interaction with other mammary epithelial cell-type specific factors. The recently identified factor MAF could be such a factor, as the promoters of most milk protein genes contain a binding site for MAF close to an NF1 binding site.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die gewebespezifische Genexpression.....	1
1.1.1. Differenzierung:	
Ursache der gewebespezifischen Genexpression.....	1
1.1.2. Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression.....	2
1.3. Die mammaepithelzellspezifische Genexpression.....	3
1.4. Die NF 1-Proteinfamilie.....	5
1.5. Modellvorstellungen darüber, wie NF 1-Proteine an der Vermittlung gewebespezifischer Transkription beteiligt sein könnten.....	7
1.6. Ziel der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1. Bezugsquellen.....	9
2.2. Oligonukleotide.....	11
2.2.1. Klonierung von NF 1/X.....	11
2.2.2. Sequenzierung der PCR-Fragmente.....	12
2.2.3. Sequenzierung der GAL4-NF 1/X-Fusionskonstrukte.....	13
2.2.4. Gelretardationsanalysen.....	13
2.3. Plasmide.....	13
2.4. Eigene Plasmidkonstruktionen.....	14
2.5. Genproben.....	15

2.6. Bakterienstämme und Zelllinien.....	16
2.6.1. Bakterienstamm.....	16
2.6.2. Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen.....	16
2.7. Allgemeine Techniken.....	17
2.7.1. Extraktion von Nucleinsäuren mit Phenol/Chloroform.....	17
2.7.2. Fällung von Nucleinsäuren mit Ethanol.....	18
2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen.....	18
2.7.4. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten.....	18
2.7.5. Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen (Laemmli, 1970).....	20
2.7.6. Reinigung synthetisierter Oligonucleotide.....	21
2.7.7. Hybridisierung komplementärer Oligonucleotidstränge.....	21
2.8. Konstruktionstechniken.....	22
2.8.1. Fragmentierung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonucleasen.....	22
2.8.2. Entfernung des 5'-Phosphatrests von DNA-Fragmenten (Dephosphorylierung).....	22
2.8.3. Phosphorylierung von DNA-Strangenden.....	22
2.8.4. Auffüllen überstehender Enden von DNA-Fragmenten.....	23
2.8.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	23
2.8.6. Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation).....	24
2.8.7. Amplifikation von cDNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	24
2.9. Präparative Methoden.....	25
2.9.1. Präparation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1986).....	25
2.9.2. Transformation kompetenter Bakterien.....	25
2.9.3. Präparation kleiner Mengen von Plasmid-DNA ("Minipräp").....	26
2.9.4. Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxipräp").....	26
2.9.5. Isolierung von Poly-A ⁺ -RNA aus Zellen.....	28
2.9.6. Präparation von Zellkernen.....	28
2.9.7. Präparation von Gesamtzellextrakten.....	29
2.9.8. Präparation von Kernextrakten.....	29
2.9.9. Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese).....	30

2.9.10. Radioaktive Markierung.....	31
2.10. Zellkultur.....	32
2.10.1. Trypsinierung, Auftauen und Einfrieren der Zellen.....	32
2.10.2. Transfektionen.....	32
2.11. Analytische Methoden.....	34
2.11.1. Nachweis der Aktivität der β -Galaktosidase in Gesamtzellextrakten.....	34
2.11.2. Nachweis der Aktivität der Chloramphenicol- Acetyltransferase in Gesamtzellextrakten (Gorman et al., 1982).....	34
2.11.3. Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951).....	35
2.11.4. Northern Blot.....	36
2.11.5. Messung der nukleären Transkriptionsrate durch "Nuclear-run-on"-Analyse.....	37
2.11.6. Gelretardationsanalyse (Barberis et al., 1987).....	39
2.11.7. Immunpräzipitation kovalent verknüpfter Protein-DNA- Komplexe.....	39
2.11.8. Verknüpfung von Proteinen mit modifizierten Oligonukleotiden (UV-crosslink).....	40
2.11.9. Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Sanger et al., 1977).....	41
2.11.10. RNase-Protektionsanalyse (Melton et al., 1984).....	42
2.11.11. Untersuchung von stabil transfizierten Zellklonen auf das Vorhandensein der transfizierten DNA-Sequenzen im Genom der Zellen.....	44
 3. Ergebnisse.....	 45
3.1. NF 1-Proteine in Mammaepithelzellen und Fibroblasten.....	45
3.1.1. Nachweis von NF 1-Proteinen in murinen Mammaepithelzelllinien und Fibroblasten.....	46
3.1.2. Charakterisierung der NF 1-Proteine muriner Mammaepithelzelllinien und Fibroblasten.....	49
3.1.3. Nachweis von NF 1-Transkripten in murinen Mammaepithelzelllinien und Fibroblasten.....	53

3.2. Regulation der NF1-Expression.....	58
3.2.1. Verminderung der NF1-Expression in den RAC 311C-6E-Zellen: Eine direkte Folge der Expression des Ha-rasA-Onkogens?.....	59
3.2.1.1. Expression des Ha-rasA-Onkogens in der Mammaepithelzelllinie HC11 reduziert die NF1-Expression.....	60
3.2.1.2. Die Expression des Onkogens neuT beeinflußt nicht die NF1-Genexpression.....	63
3.2.2. Mechanismus der Verminderung der NF1-Transkriptmenge.....	65
3.2.2.1. Messung der nukleären Transkriptionsrate der NF1-Gene C und X in RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen.....	65
3.2.2.2. Messung der Abbauraten der NF1/C- und NF1/X-Transkripte in RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen.....	67
3.2.3. Verminderung der NF1-Transkriptmenge beeinflußt die NF1-Bindungsaktivität: Korrelation der NF1/C-Bindungsaktivität mit der NF1/C-Transkriptmenge in den RAC-Zelllinien 311C und 311C-6E.....	70
3.2.4. Die verfügbare Menge des Transkriptionsfaktors NF1 begrenzt die Transkription abhängiger Gene.....	72
3.2.5. Die Ha-rasA-Onkogen-Expression reprimiert die NF1-Expression auch in Fibroblasten.....	76
3.3. Klonierung der NF1/X-cDNA.....	78
3.3.1. Isolierung der für die carboxyterminale Hälfte des murinen NF1/X-Proteins kodierenden cDNA.....	79
3.3.2. Nachweis der NF1/X-Transkriptvarianten in HC11- und NIH 3T3-Zellen.....	82
3.3.3. Isolierung der für das Aminoende der murinen NF1/X-Proteine kodierenden cDNA.....	87
3.3.4. Funktionsanalyse der mNF1/X-Proteinvarianten.....	93
4. Diskussion.....	99
4.1. Die Vielfalt der NF1-Transkripte der Mammaepithelzellen.....	99

4.2. Die funktionellen Eigenschaften der NF1-Proteine.....100

4.3. Die Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression durch
NF1-Proteine.....103

4.4. Die Beeinflussung der mammaepithelzellspezifischen
Genexpression durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens.....106

5. Literatur.....109

Abkürzungen.....119

1. Einleitung

1.1. Die gewebespezifische Genexpression

1.1.1. Differenzierung: Ursache der gewebespezifischen Genexpression

Jeder vielzellige Organismus ist aus unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut und jeder Zelltyp übt, allein oder im Verband mit anderen Zellen (Gewebe), eine definierte Funktion im Organismus aus. Zu diesen Funktionen gehören unter anderem die Bewegung des Organismus, die Synthese und Speicherung von Reservestoffen und die Produktion der Nahrung für die Nachkommen (z.B. die Milch der Säugetiere). Solche Leistungen können von Zellen erbracht werden, weil sie eine für ihren Zelltyp charakteristische Auswahl der in jeder Zelle vorhandenen Gene exprimieren. Dadurch werden einige Gene ausschließlich in einem Zelltyp oder Gewebe exprimiert. Diese Form der Genexpression wird als zelltyp- oder gewebespezifisch bezeichnet.

Die gewebespezifische Expression eines Gens in einer Zelle indiziert den Endpunkt des Differenzierungsprozesses dieser Zelle. In einem ersten Schritt des Differenzierungsprozesses, in der Regel während früher Stadien der Embryogenese, erfolgt die Festlegung des Zelltyps (Prägung), zu dem sich eine omnipotente Zelle entwickeln wird. Der Abschluß der Differenzierung mit der Ausbildung typischer struktureller Merkmale und dem Einstellen der Zellteilungsaktivität findet manchmal erst im adulten Organismus statt. Die einmal erfolgte Prägung einer Zelle wird aber immer unverändert aufrechterhalten.

Tumorzellen entstehen, weil durch eine Veränderung des genetischen Materials Zellen ihren Differenzierungsprozess nicht vollständig durchlaufen oder die erreichte vollständige Differenzierung nicht aufrechterhalten können. Differenzierungsspezifische Gene werden von Tumorzellen nicht oder nur sehr stark vermindert exprimiert (Falcone et al., 1985, Coppola et al., 1986, Olson et al., 1987, Jehn et al., 1992).

1.1.2. Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression

Eines der nach wie vor wichtigsten Arbeitsgebiete der modernen Genetik ist die Aufklärung des Mechanismus, der die kontrollierte gewebespezifische Expression eines Gens gewährleistet. In den meisten der heute bekannten Fälle erfolgt die gewebespezifische Expression eines Gens durch eine Aktivierung seiner Transkription. Um die Transkription eines Gens zu ermöglichen, muß zunächst das Chromatin an der Stelle, an der das Gen in dem Genom verpackt ist, aufgelockert werden. Dann erst kann die Aktivierung der Transkription des Gens durch sogenannte Transkriptionsfaktoren erfolgen. Weitaus besser als ein nicht auszuschließender Einfluß der Chromatinstruktur auf die gewebespezifische Genexpression ist derzeit die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an diesem Vorgang untersucht. Die Transkriptionsfaktoren binden sequenzspezifisch an den als Promotor bezeichneten Bereich, der 5' vor der kodierenden Sequenz des Gens liegt. An ein Thymidin- und Adeninreiches Sequenzelement (die TATA-Box), das wenige Nukleotide 5' der Transkriptionsstartstelle lokalisiert ist, binden die ubiquitären basalen Transkriptionsfaktoren, die als TFII A, B, C, usw. bezeichnet werden und die RNA-Polymerase II (Übersicht: Peterson und Tjian, 1992). Weiter 5' gelegen im Promotor sind in der Regel mehrere Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren, durch deren Interaktion mit den basalen Transkriptionsfaktoren, die an die Sequenz der TATA-Box gebunden sind, die Aktivierung der Transkription bewirkt wird. Einige Gene besitzen darüber hinaus sogenannte Enhancerelemente, die aus beliebigem Abstand und beliebiger Orientierung zu der Startstelle der Transkription des Gens dessen Transkription aktivieren. Auch an die Enhancerelemente binden Transkriptionsfaktoren (Serfling et al., 1985, Sassone-Corsi und Borelli, 1986). Die Gewebespezifität der Aktivierung der Transkription wird durch Transkriptionsfaktoren, die an Promotor oder Enhancerelemente binden, verursacht. Einige der bekannten Transkriptionsfaktoren sind nur in dem Zelltyp, in dem sie die Transaktivierung von Genen bewirken, vorhanden. Beispiele dafür sind die Transkriptionsfaktoren MyoD, Myf5 und Myogenin, die nur in Muskelzellen vorkommen und dort die gewebespezifische Transkription der Muskelfilamentgene regulieren (Übersicht: Weintraub et al., 1991) und der Leberzellfaktor HNF1, der z.B. die Fibrinogentranskription reguliert (Courtois et al., 1987). Für die meisten dieser zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren ist nicht bekannt, wie ihre Expression reguliert wird. Im Falle der MyoD-

Expression jedoch wird sie durch extrazelluläre Faktoren während dem Blastulastadium der Embryogenese festgelegt.

Die Vermittlung der gewebespezifischen Transaktivierung eines Promotors kann gemeinsam durch mehrere Transkriptionsfaktoren erfolgen. Solche Promotoren erreichen ihre maximale Aktivität erst wenn alle Transkriptionsfaktoren an den Promotor gebunden haben, jeder einzelne Transkriptionsfaktor vermittelt eine Teilaktivität (Lichtsteiner et al., 1987, Costa et al., 1989, Mink et al., 1990).

1.3. Die mammaepithelzellspezifische Genexpression

Die Differenzierung der Mammarydrüse unterscheidet sich von der Differenzierung vieler anderer Gewebe, denn sie erfolgt relativ spät und in mehreren, zeitlich deutlich versetzten Abschnitten: während der Embryonalentwicklung erfolgt die Prägung der Mammarydrüsenzellen zu Mammaepithel- und Myoepithelzellen, die neben Fett- und Bindegewebszellen die wichtigsten Strukturelemente der Mammarydrüse darstellen. Dabei werden einfache Milchgangsysteme angelegt, die sich erst mit Erlangung der Geschlechtsreife weiter verzweigen. Während einer Schwangerschaft erreicht das Milchgangsystem den höchsten Differenzierungsgrad und die Mammaepithelzellen entwickeln sich zu milchproduzierenden Zellen. Nach Beendigung der Laktation des Säuglings bilden die Mammaepithelzellen die zellulären Elemente (u.a. Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat), die zu der Milchproduktion gebraucht wurden, wieder zurück, einige der Mammaepithelzellen sterben sogar ab. Im Falle einer späteren Schwangerschaft entwickeln sich die verbliebenen Mammaepithelzellen wieder zu milchproduzierenden Zellen. Die Mammarydrüse ist also nur dann voll entwickelt, wenn sie benötigt wird: zu der Laktation von Säuglingen (Übersicht: Pitelka, 1983).

In den Mammaepithelzellen der Mammarydrüse werden die Milchproteingene exprimiert. Dazu gehören z.B. die Kaseine, das α -Laktalbumin und das saure Molkeprotein (engl. Whey Acidic Protein, WAP), die in je nach Tierart unterschiedlichen Anteilen in der Milch vorhanden sind. In manchen

Mausstämmen wird außerdem die provirale Form des Maus Mamma Tumor Virus MMTV mammaepithelzellspezifisch exprimiert.

Die mammaepithelzellspezifische Genexpression kann primär nur in den Mammaepithelzellen der intakten Mammarydrüse beobachtet werden. Die experimentelle Entnahme von Mammaepithelzellen und deren Kultur in Zellkultursystemen führt in der Regel zu dem Verlust der Fähigkeit Gene mammaepithelzellspezifisch zu exprimieren. Nur die Anwendung aufwendiger und technisch schwierig zu handhabender Kulturbedingungen kann dies verhindern. Mammaepithelzelllinien bieten gegenüber der Verwendung von Mammarydrüsen und Primärzellen den Vorteil, daß sie keine Kontaminationen von Zellen anderer Gewebetypen enthalten, führen aber die mammaepithelzellspezifische Genexpression meist nur unter den bereits erwähnten aufwendigen Kulturbedingungen aus (Streuli et al., 1991). Eine entscheidende Ausnahme ist die Zelllinie HC11, die die Milchproteingene in normaler Zellkultur exprimiert, ohne daß zusätzliche Kulturbedingungen gewährleistet sein müssen (Ball et al., 1988). Somit bietet sie, bei gleichen Expressionscharakteristiken wie die Mammaepithelzellen intakter Mammarydrüsen die Vorteile der klonalen Reinheit, der einfachen experimentellen Manipulierbarkeit und, nicht zuletzt, des Verzichts auf das Opfer von Tieren und wird daher in vielen Labors für das Studium der mammaepithelzellspezifischen Genexpression erfolgreich verwendet.

Die Expression der mammaepithelzellspezifisch exprimierten Gene wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert und erfolgt sowohl reproduktionsstadienspezifisch unter dem Einfluß von Hormonen als auch gewebespezifisch unter der Kontrolle gewebespezifischer Faktoren. Stadienspezifität und Gewebespezifität dieser Transkription können über räumlich nicht trennbare Promotorelemente (wie bei dem β -Kaseingen) und auch über deutlich voneinander getrennte Promotorbereiche (wie bei dem MMTV-Provirus) vermittelt werden (Schmitt-Ney et al., 1991, Hynes et al., 1983, Mink et al, 1990).

Untersuchungen des mammaepithelzellspezifisch aktiven Promotors des MMTV-Provirus haben zu der Entdeckung eines Enhancerelements geführt, das die gewebespezifische Aktivität dieses Promotors mitbestimmt. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die an das Mammaepithelzell-Enhancerelement binden können, wurden in einer ähnlichen Kombination auch in den Promotoren einiger Milchproteingene (verschiedener Tierarten) gefunden, wodurch ihre

Bedeutung für die Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression unterstrichen wird.

In dem Mammaepithelzell-Enhancerelement des MMTV-Promotors wurden durch DNA-Bindungsstudien Bindungsstellen für fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert. Mutationsanalysen zeigten, daß die Kombination von Bindungsstellen für zwei der fünf Transkriptionsfaktoren die minimale Einheit darstellt, die für die Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression nötig ist. Es handelt sich dabei um die Bindungsstellen für den Mammazell-Aktivierungs-Faktor MAF und den nukleären Faktor 1 NF1. Die Bindungsstellen der anderen Transkriptionsfaktoren erhöhen die Aktivität des Enhancerelements, beeinflussen die Zelltypspezifität der Aktivität jedoch nicht (Mink et al., 1992).

MAF ist ein Protein, das aufgrund von DNA-Bindungsstudien zu der Familie der ets-Proteine gezählt werden kann. Zu der ets-Familie gehören z.B. die Transkriptionsfaktoren PEA 3, ets1 und 2, erg, elk1 und 2, Fli-1 (Huck, 1993).

NF1 gehört zu der NF1-Proteinfamilie.

1.4. Die NF1-Proteinfamilie

Das NF1-Protein wurde erstmals von Nagata et al., 1983 beschrieben. Diese Arbeitsgruppe identifizierte es als ein zelluläres Protein, das das zellparasitäre Adenovirus für die Durchführung seiner Replikation verwendet. Spätere Arbeiten charakterisierten das NF1-Protein als ein sequenzspezifisch an DNA bindendes Protein, identifizierten die DNA-Bindungssequenz, die in den Promotoren vieler zellulärer Gene vorhanden ist und schließlich wurde gezeigt, daß NF1 sowohl die Replikation des Adenovirusgenoms induziert als auch die Transaktivierung zellulärer Gene vermittelt (Leegwater et al., 1985, Gronostajski et al., 1985, Jones et al., 1987).

Die Isolierung von NF1-Proteinen durch mehrere Arbeitsgruppen zeigte, basierend auf dem Vergleich der NF1-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, daß es nicht nur ein NF1-Protein gibt, sondern wahrscheinlich in jeder Tierart vier verschiedene Klassen von NF1-Proteinen (Santoro et al., 1988, Gil et al., 1988, Paonessa et al., 1988, Meisterernst et al., 1989, Inoue et al., 1990, Rupp et al.,

1990). Alle NF1-Proteine stimmen in einer 189 Aminosäuren-langen, unmittelbar an ihrem Aminoende gelegenen, Domäne überein. Die Übereinstimmung in der Sequenz dieser Domäne ist sehr groß, denn, bei dem Vergleich von NF1-Proteinen verschiedener Klassen und Tierarten (Huhn, Maus, Mensch, Ratte, Schwein) sind 98% der Aminosäuren identisch. Diese Domäne vermittelt den Proteinen die Fähigkeit sequenzspezifisch an DNA zu binden, zu dimerisieren und reicht aus, die Replikation des Adenovirusgenoms zu induzieren (Mermod et al., 1989, Gounari et al., 1990).

Unterschiede zwischen den NF1-Proteinen bestehen in der Aminosäuresequenz der carboxyterminalen Hälften der Proteine. Diese Unterschiede treten zwischen den vier Proteinklassen auf, es wurden aber auch Unterschiede zwischen den Proteinen einer Klasse beschrieben. Dann handelt es sich um Varianten eines Proteins, die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts entstehen.

Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF1 sind in den Promotoren vieler zellulärer Gene vorhanden. In diesen Promotoren befindet sich die NF1-Bindungsstelle in unmittelbarer Nähe der TATA-Box (weniger als 100 Nukleotide entfernt) oder aber in Enhancerelementen des Promotors. Beispiele für Promotoren, die funktionelle NF1-Bindungsstellen enthalten, sind die Promotoren der Gene hsp70 (Mensch), c-jun (Mensch), α -Globin (Mensch), β -Globin (Maus), Albumin (Maus), basisches Myelin Protein (Maus), α (I)1 und α (I)2-Kollagen (Maus), von denen einige auch gewebespezifisch exprimiert werden. Enhancer mit funktionellen NF1-Bindungsstellen sind das Mammaepithelzell-Enhancerelement des MMTV-Provirus, der Albumin-Enhancer (Maus) und der Enhancer des Papillomavirus (Mensch) (Morgan et al., 1987, van Dam et al., 1993, Mellon et al., 1981, Charnay et al., 1985, Maire et al., 1989, Tamura et al., 1988, Nehls et al., 1991, Schmidt et al., 1986, Mink et al., 1992, Herbst et al., 1989, Gloss et al., 1989).

Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen belegen, daß die NF1-Proteine nicht nur an der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Transkription von Genen beteiligt sind, sondern auch an der Vermittlung der leberzell-, fettzell- und gehirnzellspezifischen Transkription von Genen (Maire et al., 1989, Herbst et al., 1989, Graves et al., 1991, Tamura et al., 1988). NF1-Proteine sind also an der Vermittlung der gewebespezifischen Transkription unterschiedlicher Spezifität beteiligt und es muß gefragt werden, worin der Beitrag der NF1-Proteine zu der Spezifität der Transkription in jedem der Gewebe besteht.

1.5. Modellvorstellungen darüber, wie NF1-Proteine an der Vermittlung gewebespezifischer Transkription beteiligt sein könnten

In den Modellvorstellungen wird davon ausgegangen, daß die verschiedenen NF1-Proteine aller NF1-Klassen eines Organismus unterschiedliche funktionelle Eigenschaften haben. Diese könnten u.a. die Fähigkeit eines NF1-Proteins einen funktionellen Promotorkomplex gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren aufzubauen, beeinflussen. Würden sich die NF1-Proteine funktionell nicht unterscheiden, dann würde es ausreichen, ein einziges NF1-Protein zu exprimieren.

Prinzipiell sind vier Mechanismen vorstellbar, über die funktionell unterschiedliche NF1-Proteine die Spezifität der Transkription in einem Gewebe beeinflussen könnten:

- 1) In den Zellen dieses Gewebes kommt ein einziges NF1-Protein vor, das sonst in keinem anderen Gewebetyp auftritt. Ausschließlich dieses gewebetypische NF1-Protein kann an den Promotor eines in dem Gewebe spezifisch exprimierten Gens binden, wodurch eine Aktivierung des Promotors bewirkt wird.
- 2) In den Zellen dieses Gewebes kommen neben einem gewebetypischen noch andere, nicht gewebetypische, NF1-Proteine vor. Das gewebetypische NF1-Protein und keines der anderen bindet an den Promotor eines in dem Gewebe spezifisch exprimierten Gens. (Vielleicht weil eine Interaktion mit anderen, an der Vermittlung dieser gewebespezifischen Genexpression beteiligten, Faktoren das gewebespezifische NF1-Protein auswählt.)
- 3) In den Zellen dieses Gewebes kommen mehrere NF1-Proteine vor, keines davon ist ausschließlich nur in diesem Gewebe vorhanden. Ein anderer an der Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression beteiligter Faktor ist zelltypspezifisch exprimiert. Dieser Faktor läßt nur die Bindung eines bestimmten der NF1-Proteine an den Promotor eines in dem Gewebe spezifisch exprimierten Gens zu, wodurch der Promotor aktiviert wird.
- 4) In den Zellen dieses Gewebes kommen von NF1 und den Faktoren, die die gewebespezifische Aktivierung eines Promotors bewirken, mehrere Varianten vor. Keine dieser Proteinvarianten kommt ausschließlich nur in diesem Gewebe vor. An den Promotor eines in diesem Gewebe spezifisch exprimierten Gens bindet nur eine definierte Kombination der Varianten

und kann die Transaktivierung des Gens vermitteln. Gewebespezifisch ist in diesem Fall die gleichzeitige Anwesenheit aller Varianten, die die funktionsfähige Kombination bilden können.

1.6. Ziel der Arbeit

Nachdem die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in dem Mammaepithelzellenhancerelement des MMTV-Promotors, die dessen mammaepithelzellspezifische Expression vermitteln, identifiziert worden waren (Mink et al., 1992), sollten die an diese Bindungsstellen bindenden Proteine charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurden die molekularen Grundlagen, auf denen die Beteiligung der NF1-Proteine an der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression beruhen, untersucht. Dazu wurden die NF1-Proteine, die in Mammaepithelzellen vorkommen, charakterisiert und mit NF1-Proteinen, die in Zellen eines anderen Gewebetyps vorkommen, verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Bezugsquellen

Acetyl-CoA	Sigma, München
Acridinorange	Sigma, München
Acrylamid : Bisacrylamid 30:0,8	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma, München
Agarose	Appligene, Heidelberg
Alkalische Phosphatase (Calf Intestine)	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Sigma, München
AMV Reverse Transkriptase	Promega Biotec., Heidelberg
Antipain	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
APS	BioRad, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
n-Butanol	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ , CuSO ₄ ·5H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
CsCl	Biomol, Hamburg
DEAE-Papier	Whatman International Ltd., Maidstone England
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment)	Promega Biotec., Heidelberg
DNase I	Sigma, München
DTT	Boehringer, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
FCS	Gibco, Karlsruhe
Ficoll	Serva, Heidelberg
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
G418 (Geneticin)	Gibco, Karlsruhe

D-Glucose	Merck, Darmstadt
Glyoxal	Sigma, München
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HACoCl ₃	Fluka, Buchs
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Hepes	Sigma, München
Herings-DNA	Sigma, München
Hybond N ⁺ -Membran	Amersham-Buchler, Braunschweig
Insulin	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
KCl, KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
K-Mes	Fluka, Buchs
Kieselgel-DC-Platten	Macherey-Nagel, Düren
Leupeptin	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mg(Acetat) ₂ , MgCl ₂ , MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, München
MnCl ₂	Fluka, Buchs
NaAcetat, NaCitrat, Na ₂ CO ₃ , Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O, Na ₄ P ₂ O ₇ , Na/KTartrat	Merck, Darmstadt
NaCl, NaOH	Roth, Karlsruhe
NACS [®] Prepac Säule	BRL, Inc., Neu-Isenburg
N-Broth	Difco Laboratories, Detroit
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
NP40	BRL, Inc., Neu-Isenburg
Nukleotide (A/G/C/TTP, dA/G/C/TTP, ddA/G/C/TTP)	Pharmacia, Freiburg
Oligo-dT-Zellulose	New England Biolabs, Schwalbach
Oligonukleotidsynthesen	TIB BIOMOL, Berlin
ONPG	Merck, Darmstadt
Pansorbin [®]	Calbiochem, Bad Soden
Penicillin	Gibco, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipes	Sigma, München
PMSF	Sigma, München
Poly-d(I/C)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PVP	Sigma, München
Quarzsand	Merck, Darmstadt
Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig
Restriktionsendonukleasen	Pharmacia, Freiburg,

RNase A	Promega Biotec., Heidelberg,
RNase T1	USB, Bad Homburg
RNasin®Ribonuclease Inhibitor	Sigma, München
Röntgenfilme	Sigma, München
RPMI	Promega Biotec., Heidelberg
RQ1 DNase I	Amersham-Buchler, Braunschweig
	Gibco, Karlsruhe
	Promega Biotec., Heidelberg
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
Sequenase®Version 1.0	USB, Bad Homburg
Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Sucrose	Serva, Heidelberg
Szintillationsflüssigkeit (Quickszint)	Zinsser Analytik, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	Promega Biotec., Heidelberg
T7 Polynukleotidkinase	Promega Biotec., Heidelberg
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	BioRad, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, München
UZ-Röhrchen	Beckman, München
Whatman®3MM Chromatographie-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturmaterialien	Greiner, Nürtingen

2.2. Oligonukleotide

2.2.1. Klonierung von NF 1/X

Primer 1 5'-GACCTCGTCATGGTGA TCTTGTTCAA AAGG-3'
(Nukl. 725-753 der Hamster cDNA)

Primer 2 5'-TGCCGTNCCGGGR TCCGADGCCGACA ANCC-3'
(Nukl. 1625-1654 der Hamster
cDNA, Gegenstrang)

Primer 3 5'-ATGTAYTCNCCNTAYTGYCTNACNCAR-3'
(Nukl. 338-364 der Hamster cDNA)

Primer 4 5'-GGTTTGATGTCCGCATCTCCTTGCTGG-3'
(Nukl. 922-948 der Hamster cDNA,
Gegenstrang)

cDNA-Synthese 1 5'-(T)₁₇

cDNA-Synthese 2 5'-GTCACAAAGCAGTCCTGGAAACTTAAG-3'
(Nukl. 964-990 der Hamster cDNA,
Gegenstrang)

D: G/ A/ T

N: G/ A/ T/ C

R: A/ G

Y: C/ T

Hamster cDNA: Gil et al., 1988

2.2.2. Sequenzierung der PCR-Fragmente

Amino-X(2) 5'-ATAGTTCAAACCAGCAAGGAGATGC-3'
(Nukl. 912-936 der Hamster cDNA)

Amino-X(3) 5'-CATCCAGCAGTCGAGCCCGTATT-3'
(Nukl. 1465-1487 der Hamster
cDNA)

COOH-X(2) 5'-AGCGGATGGTCCGGGTGTGTAAGTAC-3'
(Nukl. 1483-1508 der Hamster
cDNA, Gegenstrang)

SK 5'-TCTAGAACTAGTGGATC-3'
P3 5'-AGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCC-3'
(Sequenzen in der multiplen
Klonierungsstelle von
Bluescript SK m13)

2.2.3. Sequenzierung der GAL4-NF 1/X-Fusionskonstrukte

GAL4 5'-AGTGCGACATCATCATCGG-3'
(Nukl. 824-841 der GAL4 cDNA,
Laughon und Gesteland, 1984)

2.2.4. Gelretardationsanalysen

"NF 1"(1) 5'-AGCTTCTTTTGGAACTCTATCCAAGTCTTATGTG-3'
"NF 1"(2) 5'-GATCCACATAAGACTTGGATAGATTCCAAAAGA-3'
ol.2(1) 5'-GATCCAAGTGGTTTCCTGA-3'
ol.2(2) 5'-AGCTTCAGGAAACCACTTG-3'

2.3. Plasmide

17M X2 TK CAT Webster et al., 1988
Bluescript SKm13 Stratagene®
pHCwt, pHC8 Cato et al., 1988

pL ₂ neo	Neo-Gen, flankiert von zwei MMTV-LTRs, H. Ponta, Karlsruhe
pLTR Ha-rasA	Jaggi et al., 1986
pSV	Hind III-Fragment des SV40-Promotors in pUC18, P. Angel, Karlsruhe
pSV ₂ neo	Southern und Berg, 1982
pSV ₂ neuT	Bargmann et al., 1986
RSV βGal II	RSV-Promotor und lacZ-Gen in pUC18 ligiert, W. Ankenbauer, Heidelberg
RSV GAL4 c-fosΔ	Gebel, 1992
RSV GAL4 DBD, GAL4 Reporter, RSV GAL4 p65 (286-550)	Schmitz und Bäuerle, 1991

2.4. Eigene Plasmidkonstruktionen

ΔMT 212 Ha-rasA: Das 6,6 kb große BamHI-Fragment der Ha-rasA-Sequenzen des Plasmids pLTR Ha-rasA wurde in die BamHI-Stelle einer 5'-Deletionsmutante des menschlichen Metallothionein IIa-Promotors (ΔMT 212) eingesetzt (Scholer et al., 1986, Karin et al., 1987)

ΔMT 212 SV40 SPA: Das 0,8 kb BamHI-Fragment der SV40-Spleiß- und Polyadenylierungssequenz wurde in die BamHI-Stelle einer 5'-Deletionsmutante des menschlichen Metallothionein IIa-Promotors (ΔMT 212) eingesetzt (Scholer et al., 1986, Karin et al., 1987)

pBS NF 1/X 1, 2, 3: Die PCR-Fragmente wurden in die EcoR V -Stelle des Plasmids Bluescript SK m13⁻ eingesetzt.

RSV GAL4 NF 1/X 1, 2, 3: Das Plasmid RSV GAL4 c-fos Δ wurde mit Xho I und Not I geschnitten und in die Not I -Stelle ein Xba-Linkeroligonukleotid (5'-CGTAGAATAGTCTAGACTATTCTACG-3'), das Stopcodons in allen Leserastern enthält, eingesetzt. An das 5'-Ende der kodierenden Sequenz der NF 1/X-PCR-Fragmente (Amplifikation zwischen Nukleotid 725 und 1654) wurde ein Xho I -, an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz der Xba-Linker angesetzt. Diese Fusionskonstrukte wurden in den vorbereiteten RSV GAL4 -Vektor eingesetzt.

Matrizen-DNA (in vitro Transkription): Das 0,3 kb Pst I -Fragment des Plasmids pBS NF 1/X 1 wurde in die Pst I -Stelle des Plasmids Bluescript SK m13⁻ eingesetzt.

2.5. Genproben

α -Aktin: 1 kb Pst I -Fragment des Plasmids 91, Minty et al., 1981

c-fos: 3,8 kb BamHI -Fragment des Plasmids p48/3, R ther et al., 1985

c-jun: 1,4 kb Sma I /Hind III-Fragment des Plasmids pch-J1, Angel et al., 1988

GAPDH: 0,9 kb Pst I -Fragment des Plasmids pRGAPDH, Fort et al., 1985

Ha-ras: 6,6 kb BamHI -Fragment des Plasmids pEJ-Ha-ras, Shih und Weinberg, 1982

- neuT: 1,4 kb Pvu II/Hind III-Fragment des Plasmids pSV₂neuT, Bargmann et al. 1986
- NF 1/B1: 0,64 kb EcoRI /Pst I -Fragment des Plasmids NF 1/B 1, Inoue et al., 1990
- NF 1/CTF: 1,1 kb Sac I /Hind III-Fragment des Plasmids pCTF1, Santoro et al., 1988
- NF 1/DBD: 0,66 kb Sac I /Hind III-Fragment des Plasmids pCTF1, Santoro et al. 1988
- NF 1/Red1: 1,5 kb EcoRI -Fragment des Plasmids NF 1/Red1, Gil et al., 1988
- NF 1/X: 0,5 kb Pst I /EcoRI -Fragment des Plasmids NF 1/X, Gil et al., 1988

2.6. Bakterienstämme und Zelllinien

2.6.1. Bakterienstamm: E.coli RR1: f-, hsd S20, ava-14, pro A2, lac Y1, gal K2, mt 1-1, sup E44

2.6.2. Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

NIH 3T3-Zellen: embryonale Mausfibroblasten, entsprechen der NIH 3T3-Zelle der American Type Culture Collection.

NIH 3T3-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt worden waren. Sie wurden nach Erreichen von 70-80% der Konfluenz durch Trypsinierung von der Zellkulturschale abgelöst und verdünnt wieder ausgesät.

HC 11-Zellen: Zellklon, aus der Mamma-Epithelzelllinie COMMA 1D kloniert (Ball et al., 1988). Die Zelllinie COMMA 1D wurde aus Mammdrüsen schwangerer Balb/c-Mäuse isoliert (Danielson et al., 1984).

HC 11-Zellen wurden in RPMI-Medium kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 5µg/ml Insulin zugesetzt worden waren. HC 11-Zellen wurden nach Erreichen der vollständigen Konfluenz trypsiniert und verdünnt ausgesät.

RAC 311C-Zellen: Mamma-Epitheltumorzelllinie, aus Adenokarzinom einer Balb/c-Maus isoliert (Sonnenberg et al., 1986).

RAC 311C-6E-Zellen: Zellklon, durch stabile Transfektion mit dem EJ-Ha-rasA-Gen aus der Zelllinie RAC 311C entstanden (Cato et al., 1990).

RAC-Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 10µg/ml Insulin zugesetzt worden waren. Die RAC-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz trypsiniert und verdünnt ausgesät.

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.7. Allgemeine Techniken

2.7.1. Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform

Zunächst wurde das Volumen (aµl) der wässrigen DNA-Lösung bestimmt und dann aµl TE-gesättigtes Phenol (*TE: 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA*) zu der DNA-Lösung gegeben und gut gemischt. Dann wurden aµl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) zu der Emulsion gegeben und gut untergemischt. Die Emulsion wurde anschließend durch kurzes Zentrifugieren (3000g, 2 Minuten) entmischt, die obere, wässrige Phase entnommen und erneut mit aµl Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch vermischt. Nach erneutem

Zentrifugieren wurde die obere Phase entnommen, die die extrahierte DNA enthielt.

2.7.2. Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,2 M Natriumacetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte für 15 Minuten bei -80°C oder für 30 Minuten bei -20°C . Das Präzipitat wurde anschließend mit 10000g 10 bis 20 Minuten lang zentrifugiert, mit 80%-igem Ethanol gewaschen, erneut mit 10000g 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert und im Vakuum-Konzentrator ("speed-vac") getrocknet.

2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde die Extinktion der wässrigen Lösung bei 260nm mit einem Spektralphotometer gemessen. Einen Extinktionswert von 1 hat, bei doppelsträngiger DNA eine Nukleinsäurekonzentration von $50\mu\text{g/ml}$, bei RNA eine Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$ und bei einzelsträngigem Oligonukleotid eine Konzentration von $20\mu\text{g/ml}$.

2.7.4. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

2.7.4.1. Agarosegele

Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8-2% (w/v) in TBE (90mM Tris-HCl pH 8,3, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA, $0,3\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid) geschmolzen und in eine Minigelapparatur eingegossen. Die DNA-Fragmente wurden, gelöst in Ladepuffer (8% Glycerin, 3% Ficoll, 0,04% Bromphenolblau), in die Taschen

des Gels eingegeben und die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 V an das Gel. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

2.7.4.2. Native Acrylamidgele

Die frisch angesetzte Gellösung (*1xTBE (90mM Tris-HCl pH 8,3, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA), 4-6% Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8), 0,1% APS, 0,1% TEMED*) wurde zwischen zwei saubere Glasplatten (10cm x 13cm), die durch Kunststoff-Spacer (1mm dick) voneinander getrennt wurden, eingegossen, danach wurde der Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation der Gellösung wurden die DNA-Fragmente, bereits gelöst in Probenpuffer (*8% Glycerin, 3% Ficoll, 0,04% Bromphenolblau*), in die Taschen des Gels eingegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 150-200 V. Die DNA-Fragmente wurden, nachdem das Gel mit Ethidiumbromid-Lösung (*0,3µg/ml in 1xTBE*) gefärbt worden war, mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

2.7.4.3. Denaturierende Acrylamidgele

Die frisch angesetzte Gellösung (*1xTBE (90mM Tris-HCl pH 8,3, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA), 6-20% Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8), 8,3 M Harnstoff, 0,1% APS, 0,1% TEMED*) wurde zwischen zwei saubere Glasplatten (385mm x 195mm), die durch Kunststoff-Spacer (0,2 bzw. 1mm) voneinander getrennt wurden, eingegossen. Danach wurde der Kamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation der Gellösung wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut und für 30 Minuten eine elektrische Spannung von 1500-1700 V angelegt, um das Gel zu erwärmen. Dann wurden die DNA-Proben, gelöst in Formamid-Probenpuffer (*98% deionisiertes Formamid, 10mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol*), 1-3 Minuten gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt, um die DNA-Doppelstränge zu denaturieren. Danach wurden die Proben in die Taschen des Gels eingefüllt und die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte durch das erneute Anlegen der elektrischen Spannung von 1500-1700 V. Nach der Trennung wurde das Gel, falls radioaktive Proben aufgetrennt worden waren,

getrocknet. Dazu wurde zunächst eine Glasplatte entfernt, das Gel auf ein Stück Whatman® 3MM Chromatographie-Papier aufgelegt und dann in einem Gelrockner getrocknet. Im Falle einer Trennung nicht-radioaktiver Proben (in der Regel Oligonukleotide zu deren Reinigung) wurde das Gel wie im Abschnitt 2.7.4.2. beschrieben gefärbt, und die Oligonukleotid-Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

2.7.5. Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen (Laemmli, 1970)

Die verwendeten Gele bestanden aus einem 10%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel. Die Trenngellösung (*0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 10% Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8), 0,02% APS, 0,02% TEMED*) wurde bis ca. 3cm unter dem oberen Rand zwischen zwei, durch Spacer (1mm) getrennte, Glasplatten (16cm x 24cm) gegossen und mit 0,1%-iger SDS-Lösung überschichtet. Nach erfolgter vollständiger Polymerisierung des Trenngels wurde die SDS-Lösung entfernt, der freigewordene Raum gut mit H₂O gespült und anschließend getrocknet. Dann wurde die Sammelgellösung (*0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 5% Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8), 0,02% APS, 0,02% TEMED*) eingegossen und der Kamm eingesetzt. Wenn auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt. Als Laufpuffer wurde Laemmli-Laufpuffer (*0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS*) verwendet. Die Proteinproben wurden in Laemmli-Probenpuffer (*62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 12% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 0,715 M β -Mercaptoethanol*) gelöst, 5 Minuten gekocht, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels gegeben. An das Gel wurde eine Spannung von 100 V angelegt, solange die Proben im Sammelgel wanderten und eine Spannung von 120 V, wenn die Proben sich im Trenngel befanden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 Minuten lang in 10%-iger Essigsäure fixiert und anschließend in einem Gelrockner getrocknet.

2.7.6. Reinigung synthetisierter Oligonukleotide

Die von einem kommerziellen Hersteller synthetisierten Oligonukleotide wurden als Lyophilisat geliefert. Das lyophilisierte Oligonukleotid wurde in H₂O gelöst, die Konzentration an gelöstem Oligonukleotid photometrisch bestimmt, die gewünschte Menge (pro Reinigung ca. 200-300µg) erneut lyophilisiert und in Formamid-Probenpuffer (*98% deionisiertes Formamid, 10mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol*) aufgenommen. Anschließend wurde eine Acrylamid-Gel-Elektrophorese mit einem 20%-igen denaturierenden Gel, das 1mm dick war, durchgeführt, wie in Abschnitt 2.7.4.3. beschrieben.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung und Färbung des Gels wurde die Bande, die das vollständige Oligonukleotid enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten. Das Acrylamidstück wurde in 3ml H₂O fein zerbröseln und 16 Stunden bei 37°C inkubiert, um das Oligonukleotid aus dem Acrylamidgel zu eluieren. Anschließend wurde die Oligonukleotidlösung von den Acrylamidgelstücken getrennt, Phenol/Chloroform-extrahiert, mit Hilfe von n-Butanol auf ein Restvolumen von 100-200µl eingengt, eine Salzkonzentration von 0,2M Natriumacetat und 10mM Magnesiumacetat eingestellt und das Oligonukleotid durch Zugabe von 6 Volumina Ethanol ausgefällt.

2.7.7. Hybridisierung komplementärer Oligonukleotidstränge

Die beiden komplementären Oligonukleotidstränge wurden in gleichen molaren Mengen in TE (*10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA*) gelöst, 5 Minuten in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt und dann langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt.

2.8. Konstruktionstechniken

2.8.1. Fragmentierung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Diese Reaktion wurde unter den vom Hersteller der Restriktionsendonuklease empfohlenen Puffer-, Salz- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Dazu wurde die wässrige Lösung des DNA-Moleküls mittels einer 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösung auf die optimalen Bedingungen für das Enzym eingestellt. Pro μg DNA wurden 2-3 U der Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Endvolumen wurde so gewählt, daß die eingesetzte Enzymlösung mindestens 10-fach verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für 3 bis 16 Stunden.

2.8.2. Entfernung des 5'-Phosphatrests von DNA-Fragmenten (Dephosphorylierung)

Die wässrige Lösung der linearisierten DNA wurde mit Hilfe einer 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösung, die vom Hersteller der Alkalischen Phosphatase mit dem Enzym geliefert wurde, auf die einfache Puffer/Salzkonzentration eingestellt. Pro μg DNA wurden 1 U Alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C, wenn die DNA-Enden überstehend waren, wobei nach 30 Minuten noch einmal dieselbe Menge Enzym zugegeben wurde. Wurden jedoch nicht-überstehende ("gebluntete") Enden dephosphoryliert, erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei 37°C, für 15 Minuten bei 56°C, dann wurde noch einmal dieselbe Menge an Enzym zugegeben und wiederum 15 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 56°C inkubiert.

2.8.3. Phosphorylierung von DNA-Strangenden

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit Hilfe der vom Hersteller der T4-Polynukleotidkinase mitgelieferten 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösung

auf die einfache Konzentration eingestellt. Dann wurde ATP in einer Endkonzentration von 5mM und pro μg DNA 2 U T4-Polynukleotidkinase zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde.

2.8.4. Auffüllen überstehender Enden von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des 10x Fill-in-Puffers (70mM MgCl_2 , 700mM Tris-HCl pH 7,5) wurde die wässrige DNA-Lösung auf die einfache Puffer/Salzkonzentration eingestellt. Dann wurden die Desoxynukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP in einer Endkonzentration von jeweils 5mM und pro μg DNA 5 U DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C.

2.8.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unterhalb der im Agarosegel sichtbaren Bande, die von dem betreffenden DNA-Fragment gebildet wurde, wurde das Gel eingeschnitten und in den entstandenen Schlitz ein passendes Stück DEAE-Elutionspapier gesteckt. Dann wurde die elektrische Spannung wieder für solange an das Gel angelegt, bis die Bande vollständig in das Papier eingedrungen war. Nun wurde das Papier aus dem Gel entnommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1,5 M NaCl-Lösung gut bedeckt und fein zerkleinert. Dann wurde die Papiermasse für 30 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend durch Säulenzentrifugation über ein mit Quarzsand gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß die Papierfasern von der wässrigen Lösung getrennt. Die wässrige Lösung wurde Phenol/Chloroform-extrahiert und durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol wurden die darin enthaltenen DNA-Fragmente ausgefällt.

2.8.6. Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation)

Die DNA-Fragmente, die miteinander verknüpft werden sollten, wurden im gleichen molaren Verhältnis zusammengegeben und die Lösung dann mit einer vom Hersteller des Enzyms mitgelieferten 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösung auf die einfache Konzentration eingestellt. Pro μg DNA wurden 1,5 Weiss-U T7-Ligase zugegeben, und die Inkubation erfolgte bei 15°C für 16 Stunden.

2.8.7. Amplifikation von cDNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Hierbei wurden mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern Sequenzen aus der cDNA von zellulären Transkripten amplifiziert, wodurch eine Isolierung dieser DNA-Fragmente möglich wurde. Es wurden unter den Puffer- und Salzbedingungen, die der Hersteller der Taq-DNA-Polymerase für das Enzym angab, $10\mu\text{l}$ der cDNA-Erststrangsynthese-Reaktion (siehe Abschnitt 2.9.9.), je 10pmol der beiden Oligonukleotidprimer, Desoxynukleotide (dA/dG/dC/dTTP) in einer Endkonzentration von je $0,25\text{mM}$ sowie 10U Taq-DNA-Polymerase zusammen gegeben. Dann wurde der Ansatz 1 Minute bei 94°C , zur Denaturierung der DNA, 1 Minute bei $45-55^\circ\text{C}$, wobei die Primer sich an die DNA anlagerten und 2-3 Minuten bei 72°C , zur Kettenverlängerung durch die Taq-DNA-Polymerase, inkubiert. Diese drei Schritte wurden 30- bis 40-mal in einem Thermocycler wiederholt. Danach wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes in einem Agarosegel aufgetrennt, und wenn eine Bande mit der erwarteten Größe vorhanden war, wurde der Ansatz für die Subklonierung vorbereitet. Es wurden dann zunächst möglicherweise überstehende Kettenenden aufgefüllt (siehe Abschnitt 2.8.4.), die 5'-Enden phosphoryliert (siehe Abschnitt 2.8.3.), der Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt und schließlich das DNA-Fragment, das die erwartete Größe hatte, aus dem Gel isoliert (siehe Abschnitt 2.8.5.) und in einen linearisierten Klonierungsvektor (Bluescript SK m13-) eingesetzt.

Temperaturprofile für die Amplifikation der NF1/X-cDNA-Fragmente zwischen Nukleotid 725 und 1654:

1 min 94°C, 1 min 45°C, 3 min 72°C

bzw. zwischen Nukleotid 338 und 948:

1 min 94°C, 1 min 50°C, 3 min 72°C

2.9. Präparative Methoden

2.9.1. Präparation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1986)

50ml SOB-Lösung (2% *BactoTrypton*, 0,5% *Hefeextrakt*, 10mM *NaCl*, 2,5mM *KCl*, 10mM *MgCl₂*, 10mM *MgSO₄*) wurden mit 200µl einer NB-Übernachtskultur (NB: 10g/l *N-Broth*, 5g/l *Hefeextrakt*) des Bakterienstammes *E.coli* RR1 beimpft und bei 37°C im Luftinkubator inkubiert bis die Suspension eine optische Dichte von 0,45-0,55 bei 550nm erreicht hatte. Dann wurde die Suspension in 10ml-Portionen für 10 Minuten mit 2000g (bei 4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Bakterienpellets in jeweils 3,3ml STB (10mM *K-Mes* pH 6,2, 45mM *MnCl₂·4H₂O*, 3mM *HACoCl₃*, 10mM *CaCl₂·2H₂O*, 100mM *KCl*, 15% *Glyzerin*) resuspendiert und für 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien wiederum für 10 Minuten mit 2000g (bei 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 800µl STB resuspendiert, mit 28µl DMSO versetzt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut mit 28µl DMSO versetzt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation auf Eis waren die Bakterien kompetent und konnten sofort transformiert werden, oder aber bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

2.9.2. Transformation kompetenter Bakterien

200µl kompetente Bakterien wurden mit 5µl wässriger DNA-Lösung versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension für 90 Sekunden bei 42°C inkubiert, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und 3ml SOC-Lösung (2%

BactoTrypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose) zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C im Luftinkubator wurden die Bakterien 10 Minuten mit 3000g (bei 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl SOC resuspendiert, auf einer Ampicillin-enthaltenden NB-Agarplatte (10g/l N-Broth, 5g/l Hefeextrakt, 15g/l BactoAgar, 100µg/ml Ampicillin) ausplattiert und die Platte dann bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Kolonien von transformierten Bakterien waren nach 12 bis 16 Stunden sichtbar.

2.9.3. Präparation kleiner Mengen von Plasmid-DNA ("Minipräp")

1ml einer NB+amp-Übernachtskultur (NB+amp: 10g/l N-Broth, 5g/l Hefeextrakt, 100µg/ml Ampicillin) des Bakterienstammes, der das zu präparierende Plasmid enthält, wurden 5 Minuten mit 4000g (bei Raumtemperatur) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Lösung A (50mM Glucose, 25mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200µl Lösung B (1% SDS, 0,2 M NaOH) vorsichtig untergemischt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wurden 150µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis wurde der Ansatz 20 Minuten mit 10000g (bei 4°C) zentrifugiert. Dann wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen eines Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) extrahiert. Anschließend wurden die Nucleinsäuren durch die Zugabe von 1ml Ethanol und Inkubation für 60 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die gefällten Nucleinsäuren wurden durch eine Zentrifugation von 20 Minuten mit 10000g (bei 4°C) pelletiert, nach Entfernen des Überstandes im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 50µl H₂O gelöst.

2.9.4. Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxipräp")

250ml einer NB+amp-Übernachtskultur (NB+amp: 10g/l N-Broth, 5g/l Hefeextrakt, 100µg/ml Ampicillin) des Bakterienstammes, der das zu präparierende Plasmid enthält, wurden 5 Minuten mit 5000g (bei 4°C)

zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10ml Lösung A (50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8, 2mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 20ml Lösung B (1% SDS, 0,2 M NaOH) zugegeben, 5 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich wurden 15ml 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) zugegeben. Nach einer Inkubation von 60 Minuten auf Eis wurde der Ansatz 20 Minuten mit 16000g (bei 4°C) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt und mit 100ml Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei -20°C wurden die gefällten Nukleinsäuren durch Zentrifugation (16000g, 4°C, 20 Minuten) präzipitiert und das Pellet nach Entfernen des Zentrifugationsüberstandes in 7ml Lösung D (0,1 M NaAcetat, 50mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert. Dann wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 20ml Ethanol erneut gefällt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei -20°C wurden die Nukleinsäuren pelletiert (10000g, 4°C, 20 Minuten) und das Pellet getrocknet. Dann wurde das Pellet in 4ml Lösung E (50mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) gelöst, 4g CsCl darin gelöst und anschließend wurden 200µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml in H₂O) zugegeben. Diese Lösung wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen eingefüllt und dieses dann verschlossen. Nach einer Zentrifugation von 16 Stunden mit 55000 Upm (bei 20°C im VTi65-Rotor, Beckman-Ultrazentrifuge) war in dem Zentrifugationsröhrchen eine Bande sichtbar. Die, die Bande bildende, Lösung wurde mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und in ein neues Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit Auffülllösung (50mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1g/ml CsCl) aufgefüllt, verschlossen und für weitere 6 Stunden mit 55000 Upm (bei 20°C im VTi65-Rotor, Beckman-Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Nun wurde die, die sichtbare Bande bildende, Lösung wiederum mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und auf ein Gesamtvolumen von 4ml mit H₂O ergänzt. Anschließend wurde das in der DNA-Lösung enthaltene Ethidiumbromid durch Extraktion mit H₂O-gesättigtem n-Butanol entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10ml Ethanol und Inkubation von 30 Minuten Dauer bei -20°C gefällt, durch Zentrifugation (10000g, 4°C, 20 Minuten) pelletiert, im Vakuum getrocknet und in H₂O gelöst.

2.9.5. Isolierung von Poly-A⁺-RNA aus Zellen

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS (*137mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,7mM CaCl₂, 3mM KCl, 0,6mM MgCl₂*) zweimal gewaschen und in 10ml STE (*100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM EDTA, 0,5% SDS, 300µg/ml Proteinase K*) durch Abschaben geerntet. Dann wurde die Suspension fünfmal schnell durch eine Kanüle in eine Spritze gesaugt und sofort wieder ausgepreßt, wodurch die genomische DNA der Zellen mechanisch zerkleinert wurde. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 5 M NaCl-Lösung eine Endkonzentration von 0,5M NaCl in der Suspension eingestellt, 100-200mg Oligo-dT-Zellulose (*in HSB (300mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM EDTA, 0,1% SDS)*) pro 10⁸ eingesetzter Zellen zugegeben und für 16 Stunden unter ständigem Schütteln bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurde die Oligo-dT-Zellulose durch Zentrifugation (1000g, 20°C, 2 Minuten) pelletiert, der Überstand abgesaugt und die Oligo-dT-Zellulose fünfmal mit HSB gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Elution der an die Oligo-dT-Zellulose gebundenen RNA durchgeführt. Dazu wurde die pelletierte Oligo-dT-Zellulose nacheinander in 1,4, 1,0 und 1,5ml H₂O suspendiert, erneut pelletiert und anschließend die wässrige Lösung abgenommen und gesammelt. Um eventuell in dem Eluat noch vorhandene Oligo-dT-Zellulose zu entfernen, wurde das Eluat mit 2000g (bei 4°C) 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Von dem Überstand wurden 400µl zur spektralphotometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen. Der restliche Überstand wurde mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) auf eine Konzentration von 0,2 M Natriumacetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20°C. Danach wurde die RNA durch Zentrifugation (10000g, 4°C, 20 Minuten) pelletiert, das Pellet im Vakuum getrocknet und in H₂O gelöst.

2.9.6. Präparation von Zellkernen

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (*137mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,7mM CaCl₂, 3mM KCl, 0,6mM MgCl₂*) gewaschen und in 5ml PBS durch Abschaben geerntet, mittels einer Zentrifugation (400g, 2°C, 5 Minuten) pelletiert, in 1ml Lysispuffer (*10mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂*,

0,5% NP40) resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Kerne durch eine Zentrifugation (400g, 2°C, 5 Minuten) pelletiert und noch zweimal in je 2ml Lysispuffer resuspendiert und wieder pelletiert. Die Kerne wurden in 100µl Kernpuffer (50mM Tris-HCl pH 8,3, 40% Glycerin, 5mM MgCl₂, 0,1mM EDTA) resuspendiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung verblieben die Kerne in dem flüssigen Stickstoff.

2.9.7. Präparation von Gesamtzellextrakten

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (137mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,7mM CaCl₂, 3mM KCl, 0,6mM MgCl₂) gewaschen und in 1ml PBS durch Abschaben geerntet. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (4000g, 20°C, 5 Minuten). Das Zellpellet wurde in 100µl 0,25 M Tris-HCl pH 7,8 resuspendiert. Dann wurden die Zellen durch fünf Wiederholungen von Einfrieren im Trockeneis/Ethanol-Kältebad und Auftauen bei 37°C lysiert. Durch Zentrifugation (10000g, 20°C, 10 Minuten) wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde abgenommen und für Enzymaktivitätstests (CAT-Aktivitätstest und β-Galaktosidasetest) verwendet.

2.9.8. Präparation von Kernextrakten

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (137mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,7mM CaCl₂, 3mM KCl, 0,6mM MgCl₂) gewaschen, in 10ml PBS durch Abschaben geerntet und durch Zentrifugation (1200g, 4°C, 10 Minuten) pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 5ml Lösung 4 (0,3M Sucrose, 10mM HEPES-KOH pH 7,9, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT, 0,5% NP40) resuspendiert und in einen Dounce-Homogenisator überführt. Durch mehrere Stöße mit dem S-Kolben wurden die Zellen aufgebrochen und die Kerne freigelegt (das Fortschreiten des Aufbrechens der Zellen wurde durch lichtmikroskopische Betrachtungen der Zell/Kernsuspension überprüft). Dann wurden die Kerne durch Zentrifugation (8500g, 4°C, 10 Minuten) pelletiert und zweimal mit 5ml Lösung 4 (nun ohne NP40) gewaschen. Anschließend wurde

das Volumen des Kernpellets bestimmt und mit dem 2,5-fachen dieses Volumens das Kernpellet in Lösung 2 (10mM Hepes-KOH pH 7,9, 400mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT, 5% Glyzerin) resuspendiert. Die Suspension wurde dann für 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotator ständig bewegt, um die Proteine aus den nun lysierten Kernen zu extrahieren. Anschließend wurden die Kerntrümmer in einem Zentrifugationsschritt (50000 Upm, 4°C, 60 Minuten, Beckman-Tischultrazentrifuge, Rotor TLA-100.3) pelletiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde bei 4°C zweimal eine Stunde gegen Lösung 3 (20mM Hepes-KOH pH 7,9, 0,1mM EDTA, 75mM NaCl, 0,5mM DTT, 20% Glyzerin) dialysiert, zentrifugiert (10000g, 4°C, 10 Minuten) und in Aliquots tiefgefroren (-80°C). Alle in diesem Protokoll verwendeten Lösungen (Lösung 2-4) enthielten die folgenden Proteinaseinhibitoren in den angegebenen Konzentrationen: Antipain (50µg/ml), Aprotinin (1µg/ml), Leupeptin (0,5µg/ml), Pepstatin (1µg/ml) und PMSF (1mM).

2.9.9. Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Zunächst wurden 2µg Poly-A⁺-RNA und 1µg Oligonukleotid-Primer mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20µl ergänzt und die Lösung dann für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von höherkonzentrierten Lösungen folgende Bedingungen eingestellt: 10mM DTT, 1mM dA/G/C/TTP und die vom Hersteller des Enzyms angegebenen Puffer/Salzbedingungen. Außerdem wurden 50 U RNasin® Ribonuclease Inhibitor und 30 U AMV-Reverse Transkriptase zugegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 42°C, anschließend wurde das Enzym durch eine Inkubation bei 60°C (30 Minuten) denaturiert und der Reaktionsansatz 1:10 mit H₂O verdünnt. In dieser Verdünnung wurde er bei der weiteren Verwendung eingesetzt.

2.9.10. Radioaktive Markierung

2.9.10.1. Oligonukleotide

Zur Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden für Gelretardationsanalysen wurden 20ng doppelsträngiges Oligonukleotid mit 5 μ l [γ - 32 P]ATP (10mCi/ml, 5000Ci/mmol) und 10 U T4-Polynukleotidkinase unter den vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Salz- und Pufferbedingungen 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde anschließend über eine NACS-Prepac® Säule (äquilibriert mit 0,1 M NaCl in TE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA)) von den freien Nukleotiden abgetrennt, mit 1 M NaCl in TE von der Säule eluiert und nach Zugabe von 10 μ g Hefe-tRNA mit Ethanol präzipitiert.

2.9.10.2. Hybridisierungsproben, durch Einbau von [α - 32 P]dCTP

Zur Herstellung von Hybridisierungsproben wurden käuflich erworbene Systeme der Firmen Stratagene® (Prime-It™ random primer labeling kit) und Pharmacia (Ready-To-Go™) verwendet. Die Reaktionen wurden gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von 20 bis 100ng DNA und 3 μ l [α - 32 P]dCTP (10mCi/ml, 3000Ci/mmol) durchgeführt. Die Syntheseprodukte der Markierungsreaktionen wurden durch eine Säulenzentrifugation über eine Sephadex G50 Säule (äquilibriert in TE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA)) von dem nicht-eingebauten [α - 32 P]dCTP abgetrennt. Das Eluat wurde direkt zu der Hybridisierung verwendet.

2.10. Zellkultur

2.10.1. Trypsinierung, Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden nach dem Absaugen des Mediums mit PBS (137mM NaCl , $6,5\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1,5\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, $0,7\text{mM CaCl}_2$, 3mM KCl , $0,6\text{mM MgCl}_2$) gewaschen, dieses wurde wieder entfernt und dann wurden 3ml 0,25%-ige Trypsinlösung auf die Zellen gegeben, gut verteilt und sofort wieder abgesaugt. Bis die Zellen sich von der Zellkulturschale ablösten wurde die Zellkulturschale im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Dann wurden die Zellen mit 5ml Kulturmedium abgespült, in dem Medium suspendiert und auf einer neuen Zellkulturschale, in der jeweils gewünschten Verdünnung, neu ausgesät.

Um Zellen einzufrieren, wurde die Zellsuspension, die beim Trypsinieren erhalten wurde, zentrifugiert (500g , 20°C , 3 Minuten) und das Zellpellet in 2ml Einfriermedium (*Kulturmedium mit 10% DMSO*) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen eingefüllt. Dann wurden die Zellen langsam eingefroren, d.h. zunächst 30 Minuten auf Eis, dann 16 Stunden bei -80°C inkubiert, und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie bis zum erneuten Auftauen verblieben.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, schnell im 37°C -Wasserbad aufgetaut und in eine mit Kulturmedium gefüllte Zellkulturschale gegeben. Nachdem die Zellen festen Kontakt mit dem Boden der Schale aufgenommen hatten, wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

2.10.2. Transfektionen

Es wurde eine modifizierte Form der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode (Graham und van der Eb, 1973) durchgeführt.

2.10.2.1. Transiente Transfektion

Dazu wurden am Vortag 8×10^5 Zellen pro 9cm-Zellkulturschale ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium gewechselt, und nun für alle Zelllinien DMEM, angereichert mit 10% fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, verwendet.

Das Präzipitat, das für die Transfektion einer Schale von Zellen nötig war, wurde wie folgt angesetzt: die DNA wurde in insgesamt 250 µl H₂O gegeben, dann wurden 250 µl 2x HBS (50mM HEPES, 280mM NaCl, 1,6mM Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,04) untergemischt und schließlich, tropfenweise, 25 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend 4-6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt, 4ml Glycerinlösung (15% Glycerin in PBS) aufgegeben, nach 2 Minuten wieder abgesaugt, die Zellen dann zweimal mit PBS (137mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,7mM CaCl₂, 3mM KCl, 0,6mM MgCl₂) gewaschen und schließlich wieder das, für die einzelnen Zelllinien normalerweise verwendete Kulturmedium aufgegeben. Die Zellen wurden nach 36 Stunden geerntet, um die Enzymtests (CAT-Aktivitätstest und β-Galaktosidasetest) durchzuführen.

2.10.2.2. Stabile Transfektion

Am Vortag der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen pro 9cm-Zellkulturschale ausgesät, am Tag der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch DMEM, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, ersetzt. Das Präzipitat wurde wie folgt angesetzt: 13 µg der jeweiligen Plasmid-DNA, 1 µg des Plasmids pSV₂neo, 10 µg zerkleinerte Lachssperma-DNA und 120 µl 2 M CaCl₂-Lösung wurden mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 µl ergänzt, diese Lösung wurde dann zu 500 µl des 2x HEPES/Phosphat-Mixes (140mM NaCl, 25mM HEPES, 0,75mM Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,1) zugetropft, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS (137mM NaCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,7mM CaCl₂, 3mM KCl, 0,6mM MgCl₂) gewaschen und das, für die jeweilige Zelllinie üblicherweise verwendete, Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die

Zellen trypsiniert und auf 4 neue Zellkulturschalen verteilt. Nun wurde Zellkulturmedium verwendet, dem zusätzlich das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 200µg/ml zugesetzt worden war.

Nach 10-14 Tagen wurden die Zellkulturschalen auf das Vorhandensein von Klonen hin überprüft.

2.11. Analytische Methoden

2.11.1. Nachweis der Aktivität der β -Galaktosidase in Gesamtzellextrakten

20µl Gesamtzellextrakt wurden mit 500µl Puffer Z (0,06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 M KCl, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50mM Mercaptoethanol) und 100µl ONPG-Lösung (4mg/ml in 60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4) gemischt. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 600µl 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt. Die Menge des sich während der Inkubation gebildeten Farbstoffes wurde an Hand seiner Absorption von Strahlung der Wellenlänge 405nm bestimmt. Daraus errechnet sich die Aktivität der β -Galaktosidase wie folgt: pro µl Gesamtzellextrakt und pro 1 Stunde Inkubation sind $[(\text{OD}_{405} \times 100) : (\text{a } \mu\text{l} \text{ Gesamtzellextrakt} \times \text{b h})]$ Einheiten β -Galaktosidase enthalten.

2.11.2. Nachweis der Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase in Gesamtzellextrakten (Gorman et al., 1982)

Vor dem Durchführen dieses Tests wurde zunächst die Aktivität der β -Galaktosidase in dem Gesamtzellextrakt bestimmt. Für den Nachweis des Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase wurde dann von verschiedenen Extrakten immer dasjenige Volumen eingesetzt, das die gewünschte Absolutmenge an β -Galaktosidaseaktivität enthielt.

Dieses Volumen Gesamtzellextrakt wurde mit 0,25 M Tris-HCl pH 7,8 auf ein Gesamtvolumen von 180µl ergänzt, 20µl Acetyl-CoA-Lösung (4mM in 0,25 M Tris-

HCl pH 7,8) und 1,25µl [¹⁴C]-Chloramphenicol (200µCi/ml) wurden zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Danach wurden das Chloramphenicol und seine Acetylierungsprodukte mit 1ml Ethylacetat extrahiert. Wässrige und organische Phase wurden durch Zentrifugation (10000g, 3 Minuten) getrennt, die organische Phase abgenommen und im Vakuum-Konzentrator eingetrocknet. Dann wurden das Chloramphenicol und seine Acetylierungsprodukte in 20µl Ethylacetat gelöst und dieses dann punktförmig auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (20cm x 20cm) aufgetropft. Die chromatographische Trennung der Chloramphenicolderivate erfolgte mittels des Laufmittelgemisches Chloroform/Methanol (95:5). Nach der Chromatographie wurde die Platte getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Zur Quantifizierung der Umsetzung des Chloramphenicols wurden die beiden Stellen aus der Platte ausgeschnitten, die das Chloramphenicol einerseits und die beiden Acetylierungsprodukte andererseits, enthielten, das Chromatographieplattenmaterial dann in Szintillationsflüssigkeit resuspendiert und anschließend mit Hilfe eines Flüssigkeitszintillationszählers die enthaltene Radioaktivität gemessen. Der Umsatz ergab sich aus dem Verhältnis der Radioaktivität der Acetylierungsprodukte zu der Gesamtradioaktivität. Die spezifische Aktivität des Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase (in n mol Umsatz pro Stunde und U β-Gal-Aktivität) berechnet sich wie folgt: $[(4,62n \text{ mol} \times \text{Umsatz in } \%) : (100 \times a \text{ h} \times b \text{ U } \beta\text{-Gal-Aktivität})]$.

2.11.3. Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)

Die wässrige Proteinlösung wurde mit der Lösung 1 (2% Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH) auf ein Gesamtvolumen von 1ml ergänzt, dann wurden 2ml Lösung 2 ((2% Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH) + (2% Na/K-Tartrat) + (1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 100+1+1) zugegeben und das Gemisch 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden 200µl Lösung 3 (Folin-Ciocalteu-Reagenz : H_2O = 1:1) zugegeben und wiederum bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert, wobei sich ein Farbkomplex bildete, dessen Menge photometrisch durch seine Absorption bei 600nm bestimmt wurde.

In einem parallelen Ansatz wurde mit BSA-Lösung eine Eichkurve erstellt, aus der die Proteinmenge abgelesen wurde.

2.11.4. Northern Blot

5-10 µg RNA wurden lyophilisiert, in 20 µl Denaturierungspuffer (1xPB, 50% DMSO, 5,85% deionisiertes Glyoxal) gelöst, 3 Minuten bei 50°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dann wurden 4 µl Ladelösung (50% Glycerin, 1xPB, 0,04% Bromphenolblau) zugegeben und die Proben auf ein 1%-iges vertikales Agarosegel (11cm x 14cm x 0,5cm) aufgetragen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xPB (0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6,85) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte durch das Anlegen von 100 V elektrischer Spannung an das Gel. Während der Elektrophorese wurde das Gel auf 4°C gekühlt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in Färbelösung (1,5 µg/ml Acridinorange in 1xPB) 15 Minuten lang gefärbt, 3 mal 30 Minuten in 1xPB entfärbt und schließlich die RNA mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert und die Stellen des Gels, wo sich 5 S und 28 S ribosomale RNA im Gel befanden, wurden markiert.

Dann wurde auf das Gel ein gleichgroßes Stück Hybond N⁺-Membran gelegt, und die RNA auf die Membran transferiert. Dazu wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 6,7) zuerst durch das Gel und dann durch die Membran gesaugt. Durch Behandlung der Membran mit 50mM NaOH (5 Minuten) und mit 2x SSC (2 Minuten) wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden.

Die Hybridisierung des Filters erfolgte bei 65°C. Zunächst wurde der Filter für 4-6 Stunden in Prähybridisierungslösung (7% SDS, 0,5 M Phosphatpuffer (1 M Phosphatpuffer: 2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2), 1mM EDTA, 50 µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA) inkubiert, dann wurde er in Hybridisierungslösung (7% SDS, 0,5 M Phosphatpuffer, 1mM EDTA, 10 µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA, $1-3 \times 10^6$ c p m Hybridisierungsprobe (siehe Abschnitt 2.9.10.2.)) über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Filter 30 Minuten in Waschlösung 1 (40 mM Phosphatpuffer, 1mM EDTA, 5% SDS) und zweimal 30 Minuten in Waschlösung 2 (40mM Phosphatpuffer, 1mM EDTA, 1% SDS) bei 65°C gewaschen. Er wurde, nachdem er kurz in 4x SSC geschwenkt worden war, in Folie eingeschweißt. Dann wurde ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

Wenn die an den Filter gebundene radioaktive Hybridisierungsprobe entfernt werden sollte, wurde der Filter für 5-15 Minuten in 0,1x SSC/0,1% SDS gekocht.

2.11.5. Messung der nukleären Transkriptionsrate durch "Nuclear-run-on"-Analyse

2.11.5.1. Durchführung der Transkription und Isolierung der radioaktiven Transkriptionsprodukte (Greenberg und Ziff, 1984 und Groudine et al., 1981)

100 μ l Kernsuspension (siehe Abschnitt 2.9.6.) wurden mit 100 μ l Transkriptionsmix (10mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM MgCl₂, 300mM KCl, 0,5mM AIC/GTP, 100 μ Ci [α -³²P]UTP) vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Dann wurde die genomische DNA durch Zugabe von DNase I (in einer Endkonzentration von 20 μ g/ml) und Inkubation von 5 Minuten bei 30°C verdaut. Durch Zugabe von 50 μ l 5x Stopmix (5% SDS, 25mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7,4) wurden alle enzymatischen Vorgänge in der Reaktion gestoppt, Proteinase K in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml verdaute anschließend die Proteine (42°C, 30 Minuten). Dann wurde eine Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt und die radioaktiven Transkriptionsprodukte durch Zugabe von 5 μ g tRNA und 250 μ l 10% TCA-Lösung (10% TCA, 60mM Na₄P₂O₇) und Inkubation auf Eis (30 Minuten) ausgefällt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden auf Nitrocellulosefiltern gesammelt und mit 30ml 3%-TCA-Lösung (3% TCA, 30mM Na₄P₂O₇) gewaschen. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsgefäße gegeben und in 0,9ml DNase I-Puffer (20mM HEPES-KOH pH 7,5, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe höher konzentrierterer Lösungen wurde eine Endkonzentration von 16mM EDTA und 1% SDS eingestellt. Anschließend wurde die Lösung 15-20 Minuten bei 65°C inkubiert. Dann wurde die Lösung aus dem Szintillationsgefäß entnommen und der Filter mit 0,5ml Spüllösung (1% SDS, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM EDTA) 10-15 Minuten bei 65°C inkubiert, um noch am Filter haftende Transkriptionsprodukte zu lösen. Diese Lösung wurde dann mit der bereits entnommenen vereinigt, Proteinase K in einer Endkonzentration von 25 μ g/ml zugegeben und zur Proteindegradation 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend Phenol/Chloroform-extrahiert und die Transkriptionsprodukte durch Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 0,1 M) und 3,5ml Ethanol ausgefällt. Nach einer Inkubation von 16 Stunden bei -20°C wurden die gefällten Transkriptionsprodukte zentrifugiert (10000g, 4°C, 30 Minuten), getrocknet und in 200 μ l TE (10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA) gelöst. 5 μ l

davon wurden im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen, um die Menge der Radioaktivität zu bestimmen.

2.11.5.2. Immobilisierung von DNA-Fragmenten auf Nitrocellulosefiltern

1µg des DNA-Fragments wurde in 200µl DNA-Medium (1mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 7,6) gelöst, 200µl 2 M NaOH zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf Eis gestellt und 1,6ml eiskaltes Neutralisierungsmedium (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,5) wurden untergemischt.

Während dieser Denaturierung der DNA-Fragmente wurde ein Stück Nitrocellulose mit 2x SSC angefeuchtet und in eine "Slot-Blot"-Apparatur (Schleicher & Schüll) eingebaut. Nachdem die Denaturierung der DNA-Fragmente abgeschlossen war, wurde die DNA-Lösung in die Slot-Blot-Apparatur gegeben und so auf die Nitrocellulose aufgetragen. Dann wurde der Nitrocellulosefilter aus der Apparatur entnommen, einige Minuten an der Luft getrocknet und schließlich 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.11.5.3. Hybridisierung der Nitrocellulosefilter

Zur Prähybridisierung wurde der Nitrocellulosefilter bei 65°C in Prähybridisierungslösung (3x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 6,7), 3x Denhardt's (100x Denhardt's: 2% BSA, 2% PVP, 2% Ficoll), 3% PiPPi (100% PiPPi: 0,5 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0,5 M NaH₂PO₄·H₂O, 1,5% Na₄P₂O₇), 1% SDS, 10mM EDTA, 50µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA) 2 Stunden lang inkubiert. Zur Hybridisierung des Filters wurden 1-3x10⁶cpm der radioaktiven Transkripte in 250µl TE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA) gegeben, 5 Minuten bei 85°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 500µl Hybridisierungsmix (4,5x SSC, 1,5x Denhardt's, 4,5% PiPPi, 0,15% SDS, 15mM EDTA, 15µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA) zugegeben und zusammen mit dem Nitrocellulosefilter (max. 1,5cm x 5cm) in das Hybridisierungsgefäß gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C 36 Stunden lang. Gewaschen wurde der Filter viermal 30 Minuten lang in 2x SSC bei 65°C. Dann wurde ein RNase A-Verdau (10µg/ml RNase A in 2x SSC; 30 Minuten bei 37°C) durchgeführt, um nicht an DNA gebundene Transkripte zu

entfernen. Der Filter wurde danach noch je 30 Minuten in 2x SSC und 0,5x SSC bei 65°C gewaschen und getrocknet. Dann wurde der Filter in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

2.11.6. Gelretardationsanalyse (Barberis et al., 1987)

In einem Reaktionsvolumen von 14µl wurden 5µg Kernextrakt mit 0,5µg poly-d(I/C) und spezifischem oder unspezifischem Kompetitor-Oligonukleotid (in dem gewünschten molaren Überschuß) 15 Minuten auf Eis inkubiert. Als Reaktionspuffer wurde GRBB (10mM HEPES-KOH pH 7,9, 60mM KCl, 1mM DTT, 4% Ficoll) verwendet. Dann wurden 2µl endmarkiertes Oligonukleotid (1-2fmol/µl, 10000-20000cpm/µl in GRBB, Abschnitt 2.9.10.1.) zugegeben und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz auf einem 4%-igen Acrylamidgel (siehe Abschnitt 2.7.4.2., als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde jedoch 0,25xTBE verwendet) aufgetrennt, das Gel nach der Elektrophorese 15 Minuten in 10%-iger Essigsäure fixiert und getrocknet. Die Banden wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.11.7. Immunpräzipitation kovalent verknüpfter Protein-DNA-Komplexe

Hierzu wurden zunächst 50µg Kernextrakt und 5µg poly-d(I/C) in GRBB+BSA (10mM HEPES-KOH pH 7,9, 60mM KCl, 1mM DTT, 4% Ficoll, 500mg/ml BSA) 15 Minuten lang auf Eis inkubiert (Gesamtvolumen 75µl), dann wurden 25µl endmarkiertes Oligonukleotid (16fmol/µl, 10000-30000cpm/µl in GRBB+BSA, Abschnitt 2.9.10.1.) zugegeben und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 10µg poly-d(I/C) zugegeben und der Reaktionsansatz in eine Mikrotiterplatte (96 wells) überführt. Die Mikrotiterplatte wurde auf Eis gestellt und in 6cm vertikalem Abstand von einer UV-Quelle (254nm) plaziert. Nach einer Bestrahlungszeit von 30 Minuten wurde der Reaktionsansatz zurück in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 5µl Prä- oder Immunsereum zugegeben und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Die Antikörper wurden anschließend mit Hilfe von Pansorbin® aus der Lösung ausgefällt. Das Pansorbin® (40µl pro Ansatz) war zuvor mit Kernextrakten (20µg Protein pro Ansatz) der

verwendeten Zelllinien 30 Minuten lang auf Eis inkubiert worden, um unspezifische Bindungskapazitäten abzusättigen. Nach dieser Präinkubation wurde das Pansorbin® viermal mit GRBB+BSA gewaschen und in 40µl GRBB+BSA (pro Ansatz) aufgenommen. Diese 40µl Pansorbin®-Suspension wurden in den Reaktionsansatz gegeben und dieser für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde das Pansorbin® durch Zentrifugation (4000g, 3 Minuten) pelletiert, viermal mit GRBB+BSA gewaschen und schließlich in Laemmli-Probenpuffer (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 12% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 0,715 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen, 5 Minuten gekocht und in einem 10%-igen SDS-Acrylamidgel (siehe Abschnitt 2.7.5.) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert und getrocknet, und die Banden wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die verwendeten Immunsereen (aPEP4 und Präimmenserum) waren von N. Mermod, Lausanne hergestellt worden.

2.11.8. Verknüpfung von Proteinen mit modifizierten Oligonukleotiden (UV-crosslink)

Hierbei wurden Oligonukleotide verwendet, bei deren Synthese Desoxythymidin durch 5-Brom-Desoxyuridin ersetzt worden war. Die modifizierten Oligonukleotide werden durch UV-Bestrahlung leichter aktiviert kovalente Bindungen mit Proteinen einzugehen als nicht-modifizierte Oligonukleotide.

Der Kernextrakt wurde mit 4µg poly-d(I/C) in GRBB (10mM HEPES-KOH pH 7,9, 60mM KCl, 1mM DTT, 4% Ficoll) 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 22µl. Dann wurden 8µl endmarkiertes modifiziertes Oligonukleotid (1fmol/µl, 10000-20000cpm/µl, Abschnitt 2.9.10.1.) zugegeben und der Reaktionsansatz wurde weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde er in einem 4%-igen Acrylamidgel (Laufpuffer 0,25x TBE, Abschnitt 2.7.4.2.) aufgetrennt. Danach wurde das Gel in Frischhaltefolie eingepackt und für 30 Minuten auf einen UV-Transilluminator gelegt und mit Strahlung der Wellenlänge 254nm bestrahlt. Während der Bestrahlung wurde das Gel mit Eis gekühlt. Nach der Bestrahlung wurde ein Röntgenfilm auf das Gel aufgelegt, der nach 2 bis 3 Stunden entwickelt wurde. Auf dem Film waren die Banden sichtbar, die von dem ungebundenen Oligonukleotid und von den Protein-Oligonukleotidkomplexen gebildet wurden. Diese Bereiche des Gels wurden

ausgeschnitten, in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und mit 20µl Laemmli-Probenpuffer (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 12% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 0,715 M β-Mercaptoethanol) überschichtet. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten lang gekocht, auf Eis abgekühlt und in einem 10%-igem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Hierbei wurde ein Gel mit den Maßen 20cm x 10cm x 1,5mm verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert, getrocknet und autoradiographiert (siehe Abschnitt 2.7.5.).

2.11.9. Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Sanger et al., 1977)

2.11.9.1. Denaturierung der DNA

5µg DNA wurden lyophilisiert und in 20µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 0,2mM EDTA) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 2µl 2 M NH₄Acetat-Lösung neutralisiert und durch Zugabe von 50µl Ethanol die DNA gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10000g, 15 Minuten, 20°C) pelletiert, das Pellet einmal mit 80%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

2.11.9.2. Anlagerung des Sequenzierungsprimers

Das DNA-Pellet wurde in 7µl H₂O gelöst, 2µl 5x Sequenzierungspuffer (200mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM MgCl₂, 250mM NaCl) und 1µl des in H₂O gelösten Sequenzierungsprimers (1pmol/µl) zugegeben und 2 Minuten bei 65°C inkubiert. Dann wurde der Reaktionsansatz langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt.

2.11.9.3. Einbau von [³⁵S]dATP in den neusynthetisierten Strang

Zu den 10µl Reaktionsansatz aus dem letzten Schritt wurden 1µl 0,1M DTT-Lösung, 2µl Labeling-Mix (1,5mM dG/T/CTP, 10% DMSO), 1µl [³⁵S]-dATP (8µCi/µl,

660Ci/mmol) und 2µl Sequenase® Version 1.0-Enzym (1U/µl) gegeben und dann 5 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

2.11.9.4. Abbruch der Kettenverlängerung

Jeweils 3,5µl der Reaktionslösung des letzten Schrittes wurden zu je 2,5µl Terminationsmix G/A/C/T (*s.u.*) pipettiert, dann 5 Minuten bei 37°C inkubiert und danach wurden durch Zugabe von 4µl Formamid-Probenpuffer (98% deionisiertes Formamid, 10mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol) die enzymatischen Vorgänge vollständig abgestoppt.

Die Terminationsmische enthielten jeweils eines der Didesoxynukleotide ddG/A/C/TTP, deren Einbau in einen DNA-Strang den Fortgang der Polymerisation unterbindet, da die Didesoxynukleotide keine OH-Gruppe an der Position 3 der Ribose haben, an die die Anheftung des nächsten Nukleotids während der Polymerisation erfolgt. Die Terminationsmische sind wie folgt zusammengesetzt:

Terminationsmix G: 8µM ddGTP, 80µM dG/A/T/CTP, 50mM NaCl, 10%DMSO

Terminationsmix A: 8µM ddATP, 80µM dG/A/T/CTP, 50mM NaCl, 10%DMSO

Terminationsmix T: 8µM ddTTP, 80µM dG/A/T/CTP, 50mM NaCl, 10%DMSO

Terminationsmix C: 8µM ddCTP, 80µM dG/A/T/CTP, 50mM NaCl, 10%DMSO.

Nach der Sequenzierung wurden die Proben in einem 6%-igen denaturierenden Acrylamidgel (siehe Abschnitt 2.7.4.3.) aufgetrennt, das Gel getrocknet und die DNA-Banden durch Autoradiographie mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.11.10. RNase-Protektionsanalyse (Melton et al., 1984)

2.11.10.1. Herstellung der radioaktiven RNA-Probe (Gilman, 1987)

6-8µl [α -³²P]CTP (20mCi/ml, 800Ci/mmol) wurden lyophilisiert und dann in 9µl H₂O wieder gelöst. Danach wurden zugegeben: 4µl 5x Puffer T7 (vom Hersteller der T7-RNA-Polymerase mitgeliefert), 1µl 200mM DTT, 1µl RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl), 2µl linearisierte Matrizen-DNA (250ng/µl), 1µl T7-RNA-

Polymerase (12 U/ μ l) und bei 37°C 1 Stunde lang inkubiert. Anschließend wurde die Matrizen-DNA verdaut. Dazu wurden 5 μ l 10x DNase-Puffer (500mM *Tris-HCl* pH 7,5, 50mM *MgCl₂*), 24 μ l H₂O und 1 μ l RNase-freie RQ1 DNase I (1 U/ μ l) zugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die, im Reaktionsansatz enthaltenen Proteine zu entfernen, wurde er anschließend, nach dem Hinzufügen von 150 μ l H₂O, Phenol/Chloroform-extrahiert. Die radioaktiven RNAs wurden durch Zugabe von 5 μ g tRNA, 200 μ l 4 M NH₄Acetat-Lösung und 1ml Ethanol und Inkubation von 30 Minuten im Trockeneis-Ethanol-Gemisch gefällt. Sie wurden durch Zentrifugation pelletiert (10000g, 15 Minuten), einmal mit 80%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und erneut in 100 μ l H₂O gelöst. Danach wurden sie ein zweites Mal gefällt und pelletiert (Zugabe von 100 μ l 4 M NH₄Acetat-Lösung, 500 μ l Ethanol; Inkubation im Trockeneis-Ethanol-Gemisch und Zentrifugation wie bei der ersten Fällung beschrieben). Das Pellet wurde einmal mit 80%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 μ l H₂O gelöst. Normalerweise enthielt 1 μ l davon 6-8x10⁶cpm.

2.11.10.2. Hybridisierung von RNA mit der radioaktiven RNA-Probe

5 μ g polyA⁺-RNA wurden ethanolgefällt und das Pellet getrocknet. Dann wurde das RNA-Pellet in 18 μ l FAB (80% deionisiertes Formamid, 400mM NaCl, 40mM Pipes pH 6,4, 1mM EDTA) gelöst und 2 μ l RNA-Probe (3x10⁵cpm/ μ l in FAB) zugegeben. Die RNAs wurden dann 5 Minuten lang bei 85°C denaturiert und über Nacht bei 42°C inkubiert.

2.11.10.3. Abbau einzelsträngiger RNA

Nach der Hybridisierung wurden zu dem Ansatz 300 μ l Verdauopuffer (10mM *Tris-HCl* pH 7,6, 5mM EDTA, 0,3 M NaAcetat pH 7,0, 40 μ g/ml RNase A, 600 U/ml RNase T1) gegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme mit Proteinase K verdaut (Zugabe von 2,5 μ l Proteinase K (10mg/ml) und 3,2 μ l 20% SDS, Inkubation 15 Minuten bei 37°C) und durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Die in der Lösung enthaltenen RNAs wurden ethanolgefällt (Zugabe von 5 μ g tRNA, 750 μ l Ethanol), pelletiert durch Zentrifugation (s.o.), das Pellet getrocknet und in 2,5 μ l Formamid-Probenpuffer (98% deionisiertes Formamid, 10mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau, 0,02%

Xylencyanol) gelöst. Die Proben wurden dann in einem 6%-igen denaturierenden Acrylamidgel (siehe Abschnitt 2.7.4.3.) aufgetrennt und die Banden autoradiographisch sichtbar gemacht.

2.11.11. Untersuchung von stabil transfizierten Zellklonen auf das Vorhandensein der transfizierten DNA-Sequenzen im Genom der Zellen

Um Nachzuprüfen, ob G418-resistente Transfektionsklone neben dem Vektor, der für das G418-Resistenzgen kodiert, auch die cotransfizierten Konstrukte stabil in das Genom integriert hatten, wurde die im folgenden beschriebene Analyse durchgeführt. Zunächst wurden 10^5 Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in $10\mu\text{l}$ Lysepuffer ($0,1\text{ M NaCl}$, $0,01\text{ M Tris-HCl pH } 8,0$, $0,01\text{ M EDTA}$) aufgenommen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden $90\mu\text{l}$ Puffer A ($0,1\text{ M NaCl}$, $0,01\text{ M Tris-HCl pH } 8,0$, $0,01\text{ M EDTA}$, $0,2\%$ SDS, $50\mu\text{g/ml RNase A}$) zugegeben, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und schließlich $200\mu\text{g/ml}$ Proteinase K zugegeben. Nach einer Inkubation von 16 Stunden bei 37°C wurden die Proben Phenol/Chloroform-extrahiert, 10 Minuten auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Dann wurde dasselbe Volumen $20\times\text{SSC}$ (3 M NaCl , $0,3\text{ M NaCitrat pH } 6,7$) zugegeben und die Proben mit Hilfe einer "SlotBlot"-Apparatur (Schleicher & Schüll) auf ein Stück Hybond N⁺-Filter aufgetragen. Der Filter wurde 5 Minuten mit Denaturierungslösung ($1,5\text{ M NaCl}$, $0,5\text{ M NaOH}$), 1 Minute mit Neutralisierungslösung ($1,5\text{ M NaCl}$, $0,5\text{ M Tris-HCl pH } 7,2$, $0,001\text{ M EDTA}$) und 20 Minuten mit $0,4\text{ N NaOH}$ behandelt, wodurch die DNA an den Filter gebunden wurde.

Zur Prähybridisierung wurde der Filter 6 Stunden bei 65°C in Prähybridisierungslösung (7% SDS, $0,5\text{ M Phosphatpuffer}$ ($1\text{ M Phosphatpuffer: } 2\text{ M Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O pH } 7,2$) 1 mM EDTA , $50\mu\text{g/ml}$ zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA) inkubiert, anschließend wurde er 16 Stunden lang in Hybridisierungslösung (7% SDS, $0,5\text{ M Phosphatpuffer}$, 1 mM EDTA , $10\mu\text{g/ml}$ zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA, $1-3 \times 10^6\text{ c p m}$ Hybridisierungsprobe (siehe Abschnitt 2.9.10.2.) inkubiert. Gewaschen wurde der Filter bei 65°C , und zwar 30 Minuten in Waschlösung 1 ($40\text{ mM Phosphatpuffer}$, 1 mM EDTA , 5% SDS) und zweimal 30 Minuten in Waschlösung 2 ($40\text{ mM Phosphatpuffer}$, 1 mM EDTA , 1% SDS). Dann wurde der Filter in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

3. Ergebnisse

Die mammaepithelzellspezifische Expression von Genen wird durch das Zusammenwirken mehrerer Transkriptionsfaktoren vermittelt, wobei dem Transkriptionsfaktor NF1 eine maßgebliche Funktion zugeschrieben wird. Die molekularen Grundlagen, auf denen die Ausübung dieser Funktion beruht, waren bisher nicht bekannt. Es könnten zum Beispiel mammaepithelzellspezifische NF1-Proteine vorkommen oder die durch die NF1-Proteine bewirkte Mammaepithelzellspezifität der Genexpression könnte durch ein Zusammenwirken mehrerer Proteinfaktoren entstehen. In der vorliegenden Arbeit sollen Grundlagen erarbeitet werden, die für das Verständnis der Rolle von NF1 in der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression benötigt werden. Dazu wurden die NF1-Proteine von Mammaepithelzellen und die NF1-Proteine von Zellen eines anderen Gewebes vergleichend analysiert.

3.1. NF1-Proteine in Mammaepithelzellen und Fibroblasten

Für die Untersuchungen wurden in Zellkultur kultivierte murine Zelllinien verwendet, bei denen gewährleistet war, daß sie die mammaepithelzellspezifische Genexpression unter normalen Kulturbedingungen durchführen. Bei einem, zwar theoretisch möglichen, Einsatz von intakten Mamdrüsen, in denen mammaepithelzellspezifische Genexpression durchgeführt wird, würden die Nachteile überwiegen: Probleme der Kontamination der Mammaepithelzellen mit Zellen anderer Typen, Mengenprobleme bei großen Untersuchungsreihen, schwierige Manipulierbarkeit (keine Transfektionen möglich, sondern nur transgene Tiere) und die Behandlung und das Opfer von Tieren, weshalb aus Gründen der Praktikabilität darauf verzichtet wurde.

Mammaepithelzellen verlieren meist während der *in vitro* Kultivierung die Fähigkeit Milchproteingene differenzierungsspezifisch zu exprimieren, wenn

nicht spezielle Kulturbedingungen angewendet werden (Streuli et al., 1991). Aus diesem Grund war es nicht möglich, primäre Mammaepithelzellen zu isolieren und zu untersuchen. Eine wichtige Ausnahme von dieser Regel ist jedoch die nicht-tumorigene Zelllinie HC 11. Die HC 11-Zellen reagieren z.B. unter normalen Kulturbedingungen auf eine Behandlung mit Prolaktin mit der Expression des Milchproteins β -Kasein. Damit sind sie das derzeit beste verfügbare *in vitro* Zellkultursystem, das für das Studium der mammaepithelzellspezifischen Genexpression verwendet werden kann (Ball et al., 1988).

Neben den HC 11-Zellen wurden zwei weitere murine Mammaepithelzelllinien verwendet, die aus dem RAC-Zellsystem stammen und tumorigen sind. Die RAC 311C-Zellen wurden aus einem Mamma-Adenokarzinom isoliert und sind schwach tumorigen. Trotz ihrer Tumorigenität zeigen die RAC 311C-Zellen noch Expressionscharakteristika von Mammaepithelzellen, beispielsweise exprimieren sie die provirale Form des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) (Sonnenberg et al., 1986).

Die RAC 311C-6E-Zellen sind durch eine Transformation der RAC 311C-Zellen mit dem Ha-rasA-Onkogen entstanden (Cato et al., 1990). Die RAC 311C-6E-Zellen sind stark tumorigen und sie exprimieren die provirale Form des MMTV nur sehr schwach. Der Vergleich der NF1-Proteine der Zelllinien RAC 311C und RAC 311C-6E bietet die Möglichkeit zu erkennen, wie die Transformation einer Mammaepithelzelle mit dem Ha-rasA-Onkogen die mammaepithelzellspezifische Expression von Genen beeinflusst.

Neben diesen Mammaepithelzelllinien wurde die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 als Prototyp einer nicht-mammaepithelialen Zelle für die Untersuchung der in Zellen anderer Gewebe vorhandenen NF1-Proteine eingesetzt.

3.1.1. Nachweis von NF1-Proteinen in murinen Mammaepithelzelllinien und Fibroblasten

NF1-Proteine sind durch ihre spezifische Bindung an die palindromische Nukleotidsequenz TGGC/A-N₅-GCCAA und der darin enthaltenen Halbpalindrome charakterisiert (Leegwater et al., 1985, Gronostajski et al., 1985). Diese Eigenschaft kann zum Nachweis der NF1-Proteine in Zellkernextrakten durch Gelretardationsanalysen ausgenutzt werden. Dabei werden ein radioaktiv

markiertes Oligonukleotid, dessen Nukleotidsequenz eine NF1-Bindungssequenz enthält und der Zellkernextrakt zusammen inkubiert, worauf eine Bindung der NF1-Proteine an das Oligonukleotid erfolgt. Dann werden die entstandenen Protein-Oligonukleotid-Komplexe gelelektrophoretisch unter Bedingungen, die die Bindung zwischen Protein und Oligonukleotid nicht lösen, voneinander getrennt. Nach der Elektrophorese zeigen weniger weit als das ungebundene Oligonukleotid gewanderte Banden (retardierte Banden), die autoradiographisch detektiert werden, das Vorhandensein von Protein-Oligonukleotid-Komplexen an.

Durch Konkurrenzexperimente mit nicht markierten Oligonukleotiden identischer oder völlig anderer Sequenz wird getestet, ob die Proteine spezifisch an die Sequenz des radioaktiv markierten Oligonukleotids binden. Die Bindung eines Proteins an das radioaktiv markierte Oligonukleotid ist dann sequenzspezifisch, wenn die retardierte Bande nur dann nachgewiesen werden kann, wenn die Sequenz des Kompetitoroligonukleotids völlig anders ist als die des radioaktiv markierten Oligonukleotids, die Bande dagegen nicht nachgewiesen werden kann, wenn die Sequenzen des Kompetitoroligonukleotids und des radioaktiv markierten Oligonukleotids identisch sind.

Um die Anwesenheit NF1-bindender Proteine in den murinen Zelllinien HC11, RAC311C, RAC311C-6E und NIH3T3 nachzuweisen, wurden Kernextrakte aus diesen Zelllinien in Gelretardationsanalysen untersucht. Radioaktiv markiert wurde das Oligonukleotid "NF1", das die vollständige palindromische NF1-Bindungssequenz, wie sie im MMTV-Promotor zwischen Base -76 und -62 vorhanden ist, enthält.

Die Analyse zeigt, daß in den Kernextrakten der Mammaepithelzelllinien HC11, RAC311C, RAC311C-6E und der Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 Proteine enthalten sind, die an das Oligonukleotid "NF1" binden. Das Gel enthält neben dem ungebundenen Oligonukleotid (Abb.1: NF1) noch mehrere Protein-Oligonukleotid-Komplexe (Abb. 1: Klammer b). Die Bindung der Proteine an das "NF1"-Oligonukleotid ist sequenzspezifisch, denn sie wird aufgehoben, wenn das nicht radioaktiv markierte "NF1"-Oligonukleotid in einem 100-fachen molaren Überschuß zugegeben wird, nicht jedoch, wenn im gleichen molaren Überschuß ein nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit anderer Sequenzfolge (ol. 2) zugegeben wird (siehe Abb. 1: Spuren 3, 6, 8, 11 bzw. 2, 5, 9, 12).

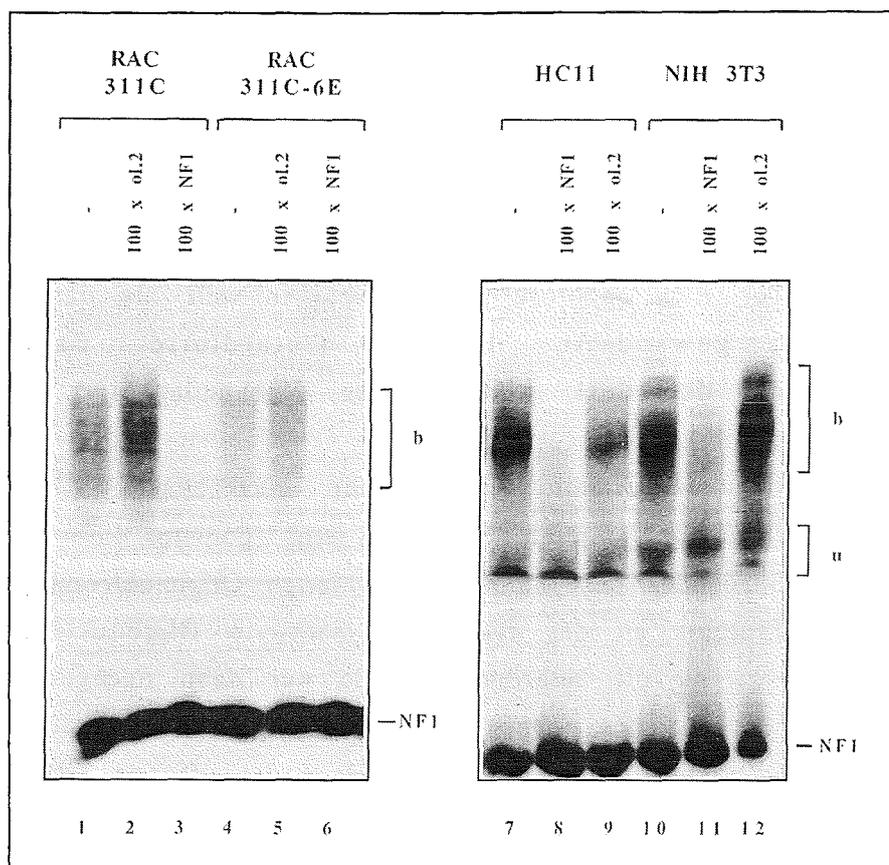


Abb. 1: Gelretardationsanalyse mit RAC 311C-, RAC 311C-6E-, HC 11- und NIH 3T3-Zellkernextrakten und dem "NF 1"-Oligonukleotid. Nach einer Inkubation von jeweils 5µg der Zellkernextrakte mit 4fmol radioaktiv markiertem "NF 1"-Oligonukleotid wurden die Protein-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplexe in einem 4%-igem Acrylamidgel unter nicht-denaturierenden Bedingungen getrennt. Die Sequenzspezifität der Proteinbindung an das "NF 1"-Oligonukleotid wurde durch eine Konkurrenz mit einem 100-fachen molaren Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Oligonukleotid gleicher Sequenz (100 x NF 1) oder zufälliger Sequenz (100 x ol.2) überprüft. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme der Gele nach der Trennung der Komplexe. Die Klammer b markiert die NF 1-Protein-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplexe, die Klammer u unspezifische Protein-Oligonukleotid-Komplexe und die Bezeichnung NF 1 das freie Oligonukleotid.

Die Zellkernextrakte der Zelllinien NIH 3T3 und HC 11 enthielten neben den spezifisch an das "NF 1"-Oligonukleotid bindenden Proteinen noch weitere, deren Bindung weder durch nicht radioaktiv markiertes "NF 1"-Oligonukleotid noch durch Oligonukleotid 2 aufgehoben werden konnte (Abb. 1: Klammer u). Vermutlich handelt es sich um eine Bindung von Proteinen an einzelsträngige Anteile des radioaktiv markierten "NF 1"-Oligonukleotids, die sich nicht kompetieren ließ. Diese Banden wurden nicht mit allen Präparationen des radioaktiv markierten "NF 1"-Oligonukleotids beobachtet.

Die Protein-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplexe, die mit den Kernextrakten der vier Zelllinien erhalten wurden, setzen sich sehr ähnlich zusammen: Diskrete Banden können kaum unterschieden werden, vielmehr tritt eine mehr oder weniger gleichmäßige Schwärzung des Röntgenfilms auf, die durch mehrere verschiedene Protein-Oligonukleotid-Komplexe verursacht wurde.

Die Gelretardationsanalyse konnte kein Muster von NF1-Protein-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplexen identifizieren, das die Existenz mammaepithelzellspezifischer NF1-Proteine anzeigen würde. Auffällig ist jedoch, daß die Menge der Protein-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplexe mit dem Zellkernextrakt der durch das Ha-rasA-Onkogen transformierten RAC311C-6E-Zellen gegenüber dem Zellkernextrakt der RAC311C-Zellen vermindert ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Transformation durch das Ha-rasA-Onkogen die NF1-Proteine beeinflussen könnte. Es wird daher in einem späteren Kapitel ausführlich analysiert werden.

3.1.2. Charakterisierung der NF1-Proteine muriner Mammaepithelzelllinien und Fibroblasten

Aus dem Fehlen mammaepithelzelltypischer Protein-Oligonukleotidbanden in der Gelretardationsanalyse kann jedoch nicht zwingend gefolgert werden, daß keine mammaepithelzellspezifischen NF1-Proteine existieren. In der Gelretardationsanalyse erfolgt die Auftrennung der Protein-Oligonukleotid-Komplexe unter nicht-denaturierenden Bedingungen, wobei gleichzeitig mehrere Molekülgrößen (u. a. die Molekülmasse, die Ladungsverteilung, und sekundäre und tertiäre Konformationen) das Laufverhalten des Komplexes beeinflussen. So entstehen komplizierte Bindungsmuster und die verschiedenen retardierten Banden sind nicht immer deutlich voneinander abgegrenzt. Durch eine Trennung aufgrund der Molekülmasse allein können die NF1-Protein-"NF 1"-Oligonukleotidkomplexe möglicherweise stärker unterschieden und zelltypspezifische NF1-Proteine vielleicht identifiziert werden.

Die Molekülmassen der an das "NF 1"-Oligonukleotid gebundenen Proteine können nur bestimmt werden, wenn die Proteine unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) voneinander getrennt werden. Um zu vermeiden, daß Protein und radioaktiv

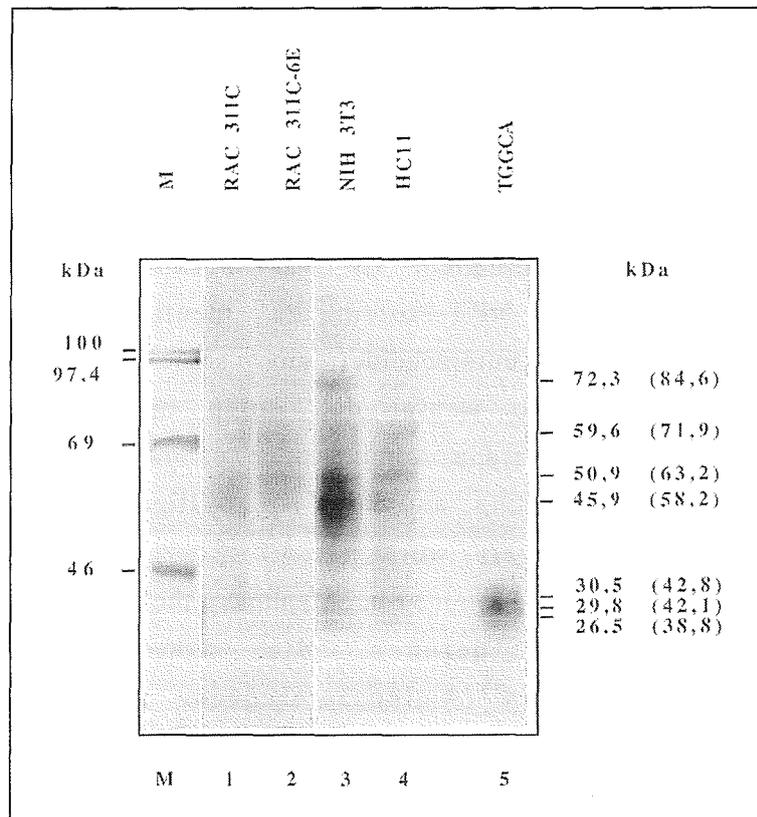
markiertes Oligonukleotid sich dabei trennen, werden Protein und Oligonukleotid durch eine Bestrahlung mit UV-Strahlung kovalent miteinander verknüpft. Durch die UV-Strahlung werden an Oligonukleotid und Protein photochemisch Radikale erzeugt, die intermolekular unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren. Dieses Verfahren der kovalenten Verknüpfung von DNA und Protein wird als UV-Crosslink bezeichnet.

Um die Molekülmasse der an das "NF 1"-Oligonukleotid bindenden NF 1-Proteine in den Kernextrakten der Zelllinien HC 11, RAC 311C, RAC 311C-6E und NIH 3T3 zu bestimmen, wurden die Kernextrakte mit radioaktiv markiertem 5-Brom-Desoxyuridin-modifiziertem "NF 1"-Oligonukleotid inkubiert. (Die Modifikation des Oligonukleotids erleichtert die Entstehung von Radikalen.) Die Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden anschließend in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit UV-Strahlung bestrahlt und dann diejenigen Bereiche aus dem Gel ausgeschnitten, die die Komplexe aus "NF 1"-Oligonukleotid und sequenzspezifisch an das "NF 1"-Oligonukleotid gebundenem Protein enthielten. Die Komplexe wurden aus dem Gel eluiert und durch SDS-PAGE größenfraktioniert. Für die so untersuchten Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden Molekülmassen zwischen 38,8 und 84,6 kDa bestimmt (Abb. 2: Angaben in Klammern). Daneben war statt Kernextraktproteinen affinitätsgereinigtes TGGCA-Protein (Rupp und Sippel, 1987) in die Untersuchung eingesetzt worden (Abb. 2: Spur 5). Das TGGCA-Protein war aus Hühnchenleber isoliert worden, bindet an die NF 1-Bindungssequenz und besteht aus einem Gemisch von mehreren Proteinen mit Molekülmassen zwischen 29,8 und 36,8 kDa. Mittlerweile ist bekannt, daß es sich bei dem TGGCA-Protein um Degradationsprodukte eines oder mehrerer NF 1-Proteine handelt, die noch in der Lage sind, an die NF 1-Bindungssequenz zu binden (Rupp et al., 1990).

In der UV-Crosslink-Analyse hatte der TGGCA-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplex eine Molekülmasse von 42,1 kDa, die sich aus Proteinmasse und Oligonukleotidmasse zusammensetzt. Es wurde nicht geklärt, ob das verwendete Aliquot der TGGCA-Proteinpräparation noch Moleküle aller Größen enthielt, aus denen es sich ursprünglich zusammengesetzt hatte. Deshalb wurde davon ausgegangen, daß nur noch die kleinste Spezies, die vermutlich gerade groß genug ist, an die DNA zu binden, vorhanden war. Unter dieser Annahme entfallen auf den Proteinanteil des TGGCA-"NF 1"-Oligonukleotid-Komplexes 29,8 kDa, auf das Oligonukleotid 12,3 kDa der Molekülmasse. Der Proteinanteil in den anderen Protein-Oligonukleotid-Komplexen hatte somit eine um etwa

12 kDa kleinere Molekülmasse als der Gesamtkomplex. Damit hatten die NF1-Proteine in den untersuchten Kernextrakten eine Molekülmasse zwischen ca. 27 und 72 kDa. Die Proteine mit der Molekülmasse von ca. 30 kDa waren, vermutlich ebenso wie das TGGCA-Protein, Degradationsprodukte größerer NF1-Proteine. Die Molekülmassen der anderen NF1-Proteine (45,9, 50,9, 59,6, 72,3 kDa) stehen in Übereinstimmung mit den bisher publizierten Daten über Molekülmassen von NF1-Proteinen. So haben affinitätschromatographisch gereinigte NF1-Proteine aus menschlichen HeLa-Zellen eine Molekülmasse zwischen 52 und 66 kDa (Rosenfeld und Kelly, 1986) und die von Goyal et al., 1990 durch eine UV-Crosslink-Analyse ermittelten Molekülmassen muriner NF1-Protein-Oligonukleotid-Komplexe betragen zwischen 38 und 70 kDa.

Abb. 2: UV-Crosslink-Analyse von NF1-Proteinen aus RAC 311C-, RAC 311C-6E-, HC 11- und NIH 3T3-Zellen. 7 bis 28 µg Zellkernextrakt wurden mit 20 fmol radioaktiv markiertem 5-Br-Desoxyuridin-modifiziertem "NF1"-Oligonukleotid inkubiert, die Protein-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexe gelelektrophoretisch getrennt und Protein und Oligonukleotid durch Bestrahlung mit UV-Strahlung im Gel kovalent verknüpft. Die NF1-Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden aus dem Gel eluiert und durch SDS-PAGE in einem 10%-igem Gel getrennt. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm dieses Gels. In Spur M ist ein Gemisch radioaktiv markierter Proteine bekannter Größen aufgetragen, die Molekülmassen (in kDa) sind angegeben. Rechts neben dem Autoradiogramm sind die Molekülmassen der NF1-Proteine und, in Klammern, die Molekülmassen der jeweiligen Protein-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexe (in kDa) angegeben.



Zwischen den Zelllinien waren keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der NF1-Proteine erkennbar. Jede der Banden war in jeder Spur vorhanden. Die Bande des Proteins mit der Molekülmasse von 72,3 kDa ist in Spur 1 und 2 kaum detektierbar. Da die Intensitäten der Banden in diesen

Spuren insgesamt schwächer sind als in den anderen Spuren beruht dies vermutlich auf einer insgesamt geringeren NF1-Bindungsaktivität der verwendeten Mengen der Zellkernextrakte und nicht auf dem Fehlen des betreffenden Proteins. In diesem Experiment ist kein Unterschied zwischen der Menge von NF1-Protein-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexen, die sich mit RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellkernextrakten gebildet hatten, zu erkennen, weil um den Nachweis der NF1-Proteine des RAC 311C-6E-Zellkernextrakts technisch möglich zu machen, eine größere Menge des RAC 311C-6E- als des RAC 311C-Zellkernextrakts eingesetzt worden war.

Die Verteilung der Radioaktivität auf die Banden innerhalb einer Spur variiert nicht von Spur zu Spur. Dies bedeutet, daß alle Zelllinien NF1-Proteine derselben Größen enthalten und keines der NF1-Proteine relativ gesehen zu den anderen Proteinen in einer Zelllinie häufiger war als in einer anderen.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente zeigen, daß die untersuchten Mammaepithelzelllinien und die Fibroblasten-Zelllinie mehrere NF1-Proteine enthalten. Es war nicht möglich, ein, nur in einem Zelltyp vorkommendes NF1-Protein zu identifizieren. Falls ein solches Protein existiert, dann unterscheidet sich seine Molekülmasse von der der anderen NF1-Proteine so wenig, daß durch die SDS-PAGE der Unterschied nicht nachgewiesen werden konnte oder es ist in so geringen Mengen vorhanden, daß seine Bindung an das "NF1"-Oligonukleotid durch die anderen NF1-Proteine überlagert wurde.

Wenn sich NF1-Proteine in Mammaepithelzellen und in Zellen anderer Gewebe unterscheiden beruhen die Unterschiede entweder auf einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz oder auf einer unterschiedlichen Modifikation der Proteine. Eine Modifikation wurde für NF1-Proteine in Form einer Phosphorylierung und Glykosylierung beschrieben (Jackson und Tjian, 1988, Jackson et al., 1990). Beide Formen der Modifikation verändern die Molekülmasse eines Proteins, deshalb können die modifizierte und die nicht modifizierte Form eines Proteins in der Regel in einer SDS-PAGE voneinander getrennt werden. Wären NF1-Proteine in einer für Mammaepithelzellen typischen Weise modifiziert, in Fibroblasten aber nicht modifiziert, so hätte dies bei der UV-Crosslink-Analyse erkannt werden müssen. Besteht der Unterschied zwischen Mammaepithelzell-NF1-Proteinen und Fibroblasten-NF1-Proteinen in einer unterschiedlichen Verteilung der modifizierenden Gruppen innerhalb

eines Proteins müßten sensitivere Methoden als die SDS-PAGE angewendet werden, um diese Unterschiede nachzuweisen. Derzeit ist aber keines der üblicherweise angewendeten Verfahren (z.B. die Untersuchung der Phosphorylierung von Peptidfragmenten) mit den NF1-Proteinen durchführbar, da es wegen fehlender spezifischer Antikörper nicht möglich ist, dafür ausreichende Mengen der einzelnen NF1-Proteine aus den Zellen zu isolieren.

Basieren die Unterschiede zwischen den NF1-Proteinen jedoch auf einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz, so müssen unterschiedliche NF1-Transkripte in den Zellen vorhanden sein, durch deren Nachweis in den Zellen die Existenz unterschiedlicher Proteine detektiert werden kann.

3.1.3. Nachweis von NF1-Transkripten in murinen Mammaepithelzelllinien und Fibroblasten

Die Genome höherer tierischer Lebewesen enthalten vermutlich alle die vier NF1-Gene NF1/A, NF1/B, NF1/C und NF1/X. Alle NF1-Proteine, die durch diese Gene kodiert werden, besitzen eine sehr stark konservierte Domäne. Sie ist unmittelbar am Aminoende der Proteine gelegen und besteht aus 189 Aminosäuren. Am Carboxylende der NF1-Proteine treten Sequenzunterschiede auf, auf Grund derer die Zuordnung eines NF1-Proteins in die vier NF1-Klassen vorgenommen wird (Rupp et al., 1990).

Abbildung 3 zeigt die graphische Darstellung der cDNA-Klone von Vertretern der vier NF1-Klassen, die Basensequenzen, die für die Aminosäuren der konservierten Domäne kodieren, sind durch eine Schraffierung gekennzeichnet. Für den Nachweis der NF1-Transkripte wurden Fragmente der cDNAs verwendet, die für die Aminosäuresequenz am Carboxylende der NF1-Proteine kodieren, daher am 3'-Ende der cDNA lokalisiert sind (Abb. 3: Proben). In diesen Bereichen der NF1-Proteine besteht auf der Ebene der Aminosäuresequenz keine signifikante Übereinstimmung zwischen den vier NF1-Klassen, weshalb auf der Ebene der Basensequenz ebenfalls keine signifikante Übereinstimmung zu erwarten ist. Dies bedeutet, daß mit den Proben spezifisch Transkripte jeder der vier NF1-Klassen nachgewiesen werden können.

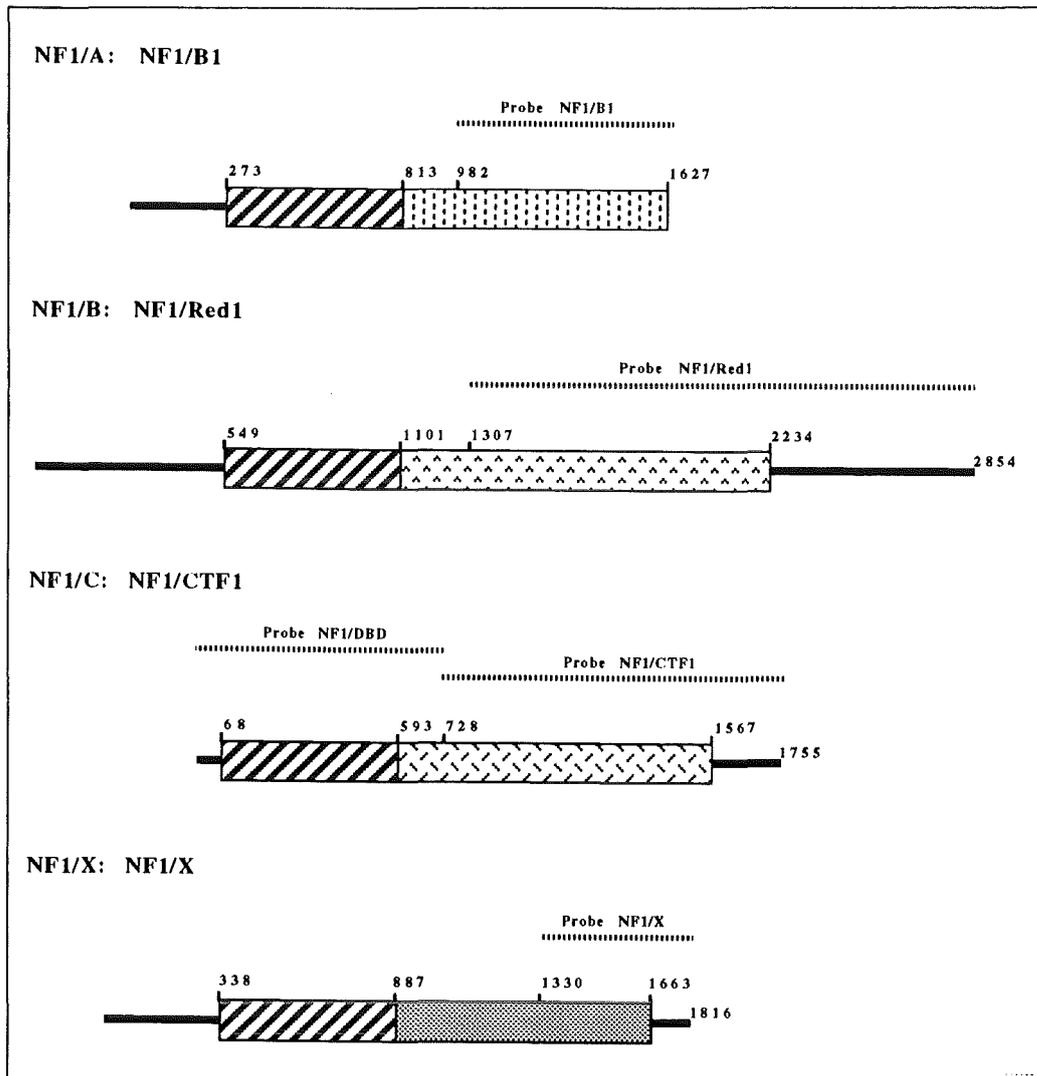


Abb. 3: Graphische Darstellung der cDNA-Sequenzen von vier NF 1-Proteinen, die verschiedenen NF 1-Klassen angehören: NF 1/B 1 der Klasse NF 1/A, NF 1/Red1 der Klasse NF 1/B, NF 1/CTF1 der Klasse NF 1/C, NF 1/X der Klasse NF 1/X (Inoue et al., 1990, Gil et al., 1988, Santoro et al., 1988). Die für die Proteine kodierenden Sequenzabschnitte sind als Rechtecke dargestellt, die für die, die DNA-Bindungsdomäne enthaltende, konservierte Domäne der NF 1-Proteine kodierenden Sequenzabschnitte sind durch Schrägstreifung markiert, die Zahlenangaben geben die Basenummerierung gemäß der in der EMBL GenBank publizierten Sequenzen an. Über den cDNA-Sequenzen markieren Balken die Lage der zur Hybridisierung der RNA-Filter verwendeten Fragmente (siehe auch Kapitel 2.5., Genproben).

Um Transkripte der vier NF 1-Klassen in den Mammaepithelzelllinien HC 11, RAC 311C, RAC 311C-6E und den Fibroblasten NIH 3T3 nachzuweisen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde mRNA aus den Zellen isoliert und unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel größenfraktioniert. Dann wurde die RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran

transferiert. Die Membran wurde mit den verschiedenen radioaktiv markierten NF1-Proben (Abb. 3) hybridisiert.

In dieser Analyse wurden keine qualitativen Unterschiede zwischen den NF1-Transkripten der Mammaepithelzelllinien und der Fibroblasten beobachtet:

Die Probe NF1/B1 detektierte vier Transkripte der Längen 8,6, 5,1, 3,4 und 2,1 kb (Abb. 4 und 5: Spuren 1, 2, die beiden kleineren Transkripte sind nur schwach zu erkennen). NF1/B1 gehört zu der Klasse NF1/A und wurde aus Mäusekleinhirngewebe isoliert. Literaturangaben gemäß werden durch die Probe in Maus-RNA, die aus verschiedenen Geweben isoliert worden war, Transkripte der Längen 8,6, 4,8, 4,0, 2,0 und 1,5 kb detektiert (Inoue et al., 1990).

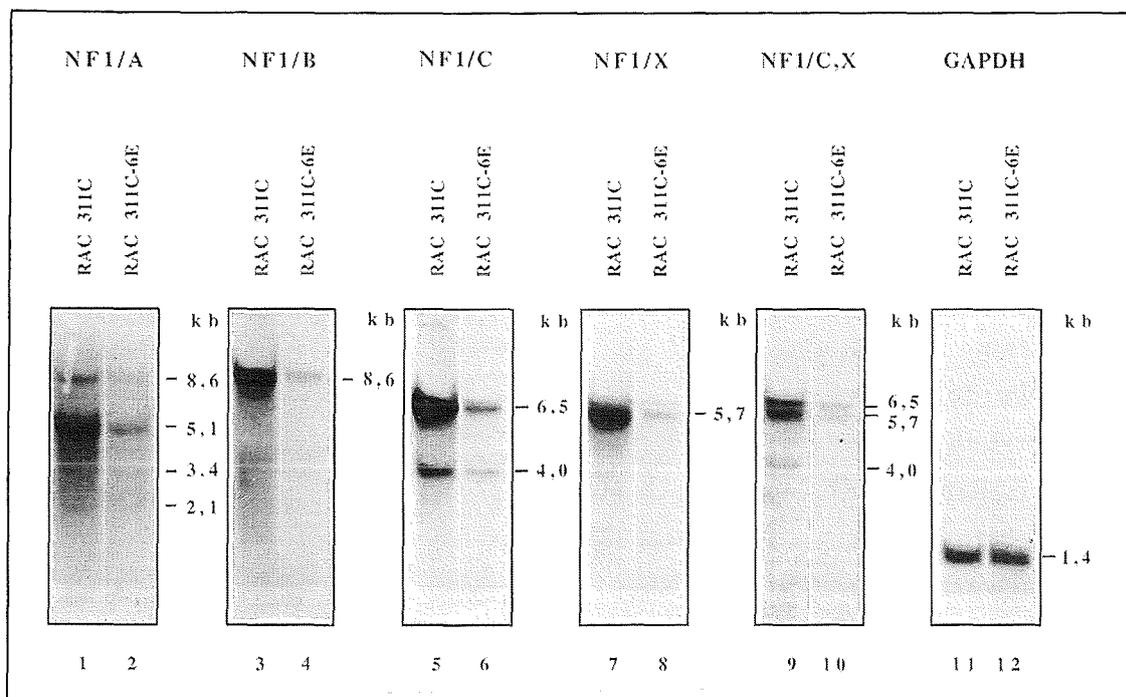


Abb. 4: Nachweis von NF1-Transkripten in RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zell-mRNA. Je 5µg Poly-A⁺-RNA wurden denaturiert, größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran überführt. Der Filter wurde nacheinander mit Proben für die Transkripte der NF1-Gene A, B, C und X und des GAPDH-Gens hybridisiert. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme des hybridisierten Filters. Die Längen der Transkripte wurden mit Hilfe einer Eichkurve, die Wanderungsstrecke im Gel und Länge bekannter, auf demselben Filter nachgewiesener, Mastranskripte enthielt, bestimmt und sind in kb angegeben. (Beschreibung der verwendeten Proben: Abb. 3 und Kapitel 2.5.)

Die Probe NF1/Red1 detektierte ein Transkript, dessen Länge mit 8,6 kb bestimmt wurde (Abb. 4 und 5: Spuren 3, 4). NF1/Red1 ist ein Vertreter der Klasse NF1/B und wurde aus Hamster-Leberzellen isoliert. Die in der Literatur

angegebene Länge des Transkripts in Hamster-Zellen beträgt 8,7 kb (Gil et al., 1988).

Die Probe NF1/CTF1 detektierte zwei Transkripte, deren Länge mit 6,5 und 4,0 kb bestimmt wurde (Abb. 4: Spuren 5, 6). Die cDNA ist ein Vertreter der Klasse NF1/C und war aus menschlichen HeLa-Zellen isoliert worden. In mRNA aus HeLa-Zellen werden durch die Probe ebenfalls zwei Transkripte detektiert, deren Größen laut Literaturangaben 8,6 und 4,5 kb betragen (Santoro et al., 1988). Der beobachtete Unterschied zwischen Maus- und Mensch-NF1/C-Transkripten wird vermutlich durch unterschiedlich lange nicht-translatierte Bereiche der Transkripte in Maus und Mensch verursacht.

Die Probe NF1/X detektierte ein Transkript mit einer Länge von 5,7 kb (Abb. 4: Spuren 7, 8). NF1/X ist der bislang einzige Vertreter der Klasse NF1/X und wurde aus Hamster-Leberzellen isoliert. Für NF1/X beträgt der Literaturwert der Länge des Transkripts 6,1 kb (in Hamster-

Zellen) (Gil et al., 1988).
Wurde zur Hybridisierung des Filters eine Probe verwendet, die die Basensequenzen

der konservierten Domäne der NF1-Proteine enthält (Abb. 3: NF1/DBD), so sollte diese Probe alle der bisher beschriebenen Transkripte detektieren. Bei diesem Experiment traten jedoch unterschiedlich starke radioaktive Signale, die

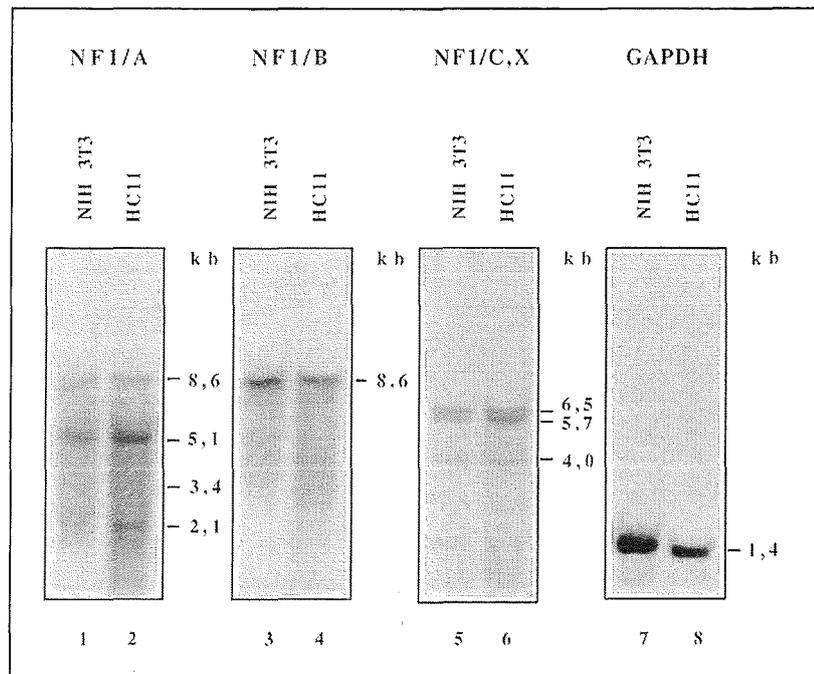


Abb. 5: Nachweis von NF1-Transkripten in HC 11- und NIH 3T3-Zell-mRNA.

Je 5 µg Poly-A⁺-RNA wurden denaturiert, größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran überführt. Der Filter wurde nacheinander mit Proben für die Transkripte der NF1-Gene C und X, das NF1-Gen A, das NF1-Gen B und das GAPDH-Gen hybridisiert. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme des hybridisierten Filters. Die Längen der Transkripte sind in kb angegeben. (Beschreibung der verwendeten Proben: Abb. 3 und Kapitel 2.5.)

von den einzelnen Transkripten herrührten, auf. Erkennbar sind bei der gezeigten Expositionsdauer die Signale, die von den Transkripten der Klassen NF 1/C und NF 1/X (6,5, 5,7 und 4,0 kb) stammen (Abb. 4: Spuren 9, 10, Abb. 5: Spuren 5, 6). Die Signale, die von den Transkripten der Klassen NF 1/A und NF 1/B stammen, wurden jedoch erst nach sehr langer Expositionsdauer sichtbar (nicht gezeigt). Da die Übereinstimmung der Sequenz zwischen der cDNA-Probe NF 1/DBD (die aus menschlicher mRNA stammt) und der Maus-mRNA wegen der starken Konservierung dieser Sequenz für alle der vier NF 1-Klassen vermutlich gleich groß ist, kann dieses Ergebnis mit dem Vorhandensein von relativ größeren Mengen an NF 1/C- und NF 1/X-Transkripten im Vergleich zu NF 1/A- und NF 1/B-Transkripten erklärt werden.

Damit waren in allen untersuchten Mammaepithelzelllinien und der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 gleichzeitig Transkripte der vier bekannten NF 1-Klassen vorhanden. Es konnten insgesamt acht Transkripte (8,6, 8,6, 6,5, 5,7, 5,1, 4,0, 3,4 und 2,1 kb) nachgewiesen werden. Keines der Transkripte kommt ausschließlich oder hauptsächlich nur in einem Zelltyp vor. Dies bedeutet, daß es entweder kein zelltypspezifisch vorhandenes NF 1-Transkript gibt und die Zelltypspezifität der Mammaepithelzell-Genexpression über andere zelltypspezifische Faktoren vermittelt wird oder daß das zelltypspezifisch exprimierte NF 1-Transkript zu selten oder zu wenig unterschiedlich von anderen NF 1-Transkripten ist, um in der Northern Blot Analyse nachgewiesen werden zu können.

Detailliertere Untersuchungen der NF 1-Transkripte, die die Isolierung aller in den Zellen vorhandenen NF 1-Transkripte, deren Sequenzanalyse und Überprüfung auf funktionelle Aktivität einschließen, müssen durchgeführt werden, um diese Fragen beantworten zu können. Deshalb wurde zunächst eines der acht NF 1-Transkripte ausgewählt und im Detail untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in Kapitel 3.3. vorgestellt.

3.2. Regulation der NF1-Expression

In der Northern Blot Analyse wurden quantitative Unterschiede zwischen den NF1-Transkripten der Mammaepithelzelllinien RAC311C und RAC311C-6E gefunden. Die RAC311C-6E-Zell-mRNA enthält von allen NF1-Transkripten weniger als die RAC311C-Zell-mRNA (Abb. 4). Da beide mRNA-Präparationen gleiche Mengen der GAPDH-Transkripte enthalten, gibt die Northern Blot Analyse die in den Zellen vorhandenen NF1-Transkriptmengen wirklichkeitsgetreu wieder. Da in der Gelretardationsanalyse gezeigt wurde, daß RAC311C-6E-Zellkernextrakte eine geringere NF1-Bindungsaktivität haben als RAC311C-Zellkernextrakte (Abb. 1) ergänzen sich die mit der Untersuchung der NF1-Transkripte und der NF1-Proteine erhaltenen Daten.

Die RAC311C-6E-Zellen sind Tumorzellen mammaepithelialen Ursprungs. Die Tumorigenität ihrer Vorläuferzelllinie RAC311C wurde durch eine Transformation mit dem Ha-rasA-Onkogen erhöht. Möglicherweise repräsentieren die RAC311C-6E-Zellen mit der verminderten NF1-Bindungsaktivität ein Differenzierungsstadium der Mammaepithelzellen: Es wurde gezeigt, daß die Expression des Ha-rasA-Onkogens in nicht-tumorigenen Mammaepithelzellen deren vollständige Differenzierung verhindert. Die Milchproteingene können dann nicht mammaepithelzellspezifisch unter der Kontrolle von Hormonen exprimiert werden (Jehn et al., 1992).

Die mammaepithelzellspezifische Genexpression wiederum hängt von dem Transkriptionsfaktor NF1 ab. Es könnte daher sein, daß die mammaepithelzellspezifische Genexpression durch eine Verminderung der in einer Mammaepithelzelle vorhandenen NF1-Proteinmenge während des Differenzierungsprozesses der Zelle verhindert wird. Dieser Zustand wird durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens in der Mammaepithelzelle fixiert. Vielleicht sind die Mechanismen, die die verfügbare NF1-Proteinmenge vermindern, während der Differenzierung der Mammaepithelzellen und während der Expression des Ha-rasA-Onkogens sogar dieselben.

Um Mechanismen zu entschlüsseln, die die verfügbare NF1-Proteinmenge in Mammaepithelzellen verändern können, wurde im folgenden die Ursachen der verminderten NF1-Expression in den Ha-rasA-transformierten RAC311C-6E-Zellen untersucht.

3.2.1. Verminderung der NF1-Expression in den RAC311C-6E-Zellen: Eine direkte Folge der Expression des Ha-rasA-Onkogens?

Die Zelllinie RAC311C-6E enthält deutlich weniger aller NF1-Transkripte und ebenfalls deutlich weniger an das "NF1"-Oligonukleotid bindende NF1-Proteine als die Zelllinie RAC311C. Dies resultiert aber nicht aus einer insgesamt reduzierten Genexpression in den RAC311C-6E-Zellen, denn manche Gene werden in den RAC311C-6E-Zellen sogar vermehrt, andere in beiden Zelllinien in gleichen Mengen exprimiert:

die Ha-ras- und c-jun-Transkripte sind in der Zelllinie RAC311C-6E häufiger als in der Zelllinie RAC311C, während das α -Aktin-Transkript in beiden Zelllinien gleich häufig ist. Die c-fos- und MMTV-Transkripte sind wie die NF1-Transkripte in der Zelllinie RAC311C-6E seltener (siehe Abb. 6: bei gleichen Intensitäten der GAPDH-Signale). Es ist somit nicht generell die Genexpression in der Zelllinie RAC311C-6E reduziert, sondern es bestehen individuelle Unterschiede für verschiedene Gene.

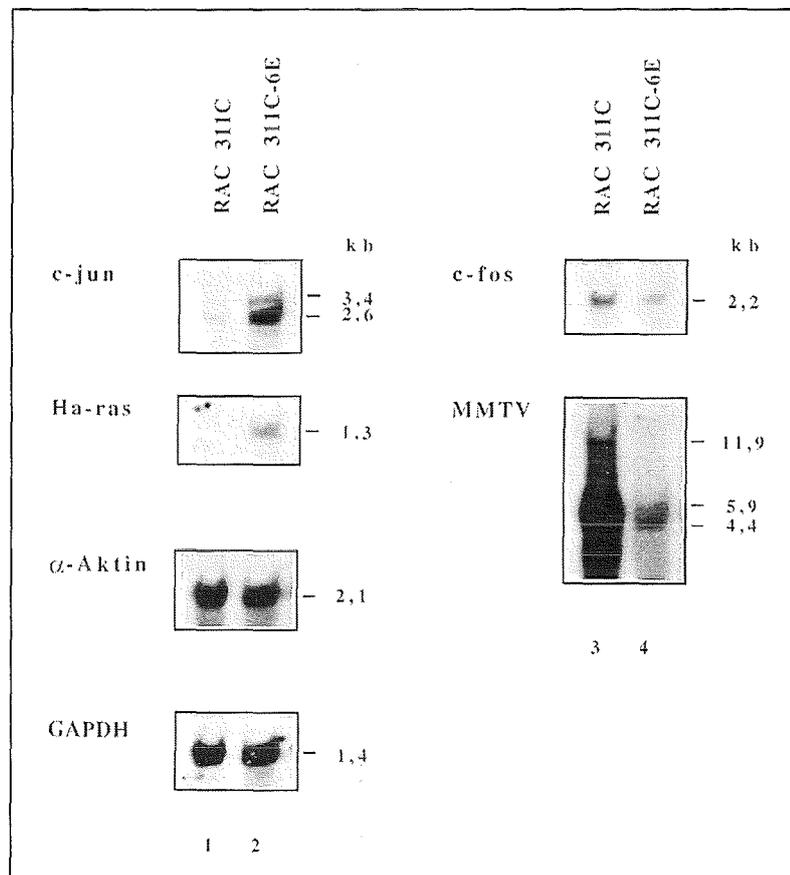


Abb.6: Expression der Gene c-jun, Ha-ras, c-fos, MMTV-Provirus und α -Aktin in RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen. Je 5 μ g Poly-A⁺-RNA aus RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen wurden denaturiert, durch Gelelektrophorese größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Filter wurde nacheinander mit radioaktiv markierten Proben für die Transkripte der Gene c-jun, Ha-ras, c-fos, MMTV-Provirus, α -Aktin und GAPDH hybridisiert. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme des hybridisierten Filters. (Die verwendeten Proben sind in Kapitel 2.5., Genproben beschrieben.)

Da die Ha-rasA-Onkogen-Expression die Ursache für die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien RAC 311C und RAC 311C-6E ist, könnte sie direkt auch die beschriebenen Unterschiede in der Genexpression verursachen. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß durch das Onkogen Ha-rasA die Expression einiger Gene verändert werden kann. So werden die Gene TGF α , Transin, Ornithindecaboxylase, Glucosetransporter, c-jun, junB, c-fos, TGF β , α B-Crystallin, Parvovirus, IL 2 und CD 44 durch eine Expression des Onkogens Ha-rasA verstärkt exprimiert, die Gene Thyroglobulin, Myosin-leichte-Kette und Glatte-Muskel- α -Aktin dagegen weniger stark exprimiert (Ciardiello et al., 1988, Sistonen et al., 1989, Stacey et al., 1987, Anzano et al., 1985, Klemenz et al., 1991, Spegelaere et al., 1991, Rayter et al., 1992, Hofmann et al., 1993, Avvedimento et al., 1988, Kumar et al., 1992a, Kumar et al., 1992b). Ob die Expression des Ha-rasA-Onkogens tatsächlich direkt die Expression der NF1-Gene vermindert, wurde in einer Reihe von Experimenten überprüft. Dabei mußten folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Bei der Zelllinie RAC 311C-6E handelte es sich ursprünglich um einen Zellklon. Es könnte sein, daß nur in diesem einen Zellklon die NF1-Expression verändert ist, in anderen, das Ha-rasA-Onkogen exprimierenden Mammaepithelzellklonen jedoch nicht.
- 2) Eine Coinzidenz von Ha-rasA-Onkogen-Expression und Verminderung der NF1-Genexpression könnte nur in der Mammaepithelzelllinie RAC 311C auftreten, auf Grund einer Besonderheit dieser Zelllinie.
- 3) Nicht die Expression des Ha-rasA-Onkogens selbst, sondern die Expression eines beliebigen transformierenden Onkogens in Mammaepithelzellen verursacht die Verminderung der NF1-Genexpression.

3.2.1.1. Expression des Ha-rasA-Onkogens in der Mammaepithelzelllinie HC 11 reduziert die NF1-Expression

Um zu entscheiden, ob es sich bei der verminderten NF1-Genexpression in den RAC 311C-6E-Zellen um einen klonalen und zelllinienspezifischen Effekt handelt, wurde die Mammaepithelzelllinie HC 11 stabil mit dem Ha-rasA-Onkogen-Expressionsvektor pLTR Ha-rasA transfiziert. Das Konstrukt pLTR Ha-rasA enthält die Sequenz des Ha-rasA-Onkogens, die unter der Kontrolle des MMTV-LTR-Promotors in Eukaryontenzellen exprimiert wird. Der MMTV-LTR-

Promotor ist in den HC 11-Zellen konstitutiv nur schwach aktiv (Doppler et al., 1991), die Expression des Ha-rasA-Onkogens wurde daher durch den Glucocorticoid-Agonisten Dexamethason, der diesen Promotor aktiviert, stimuliert (Ringold et al., 1975, Hynes et al., 1983).

Das Ha-rasA-Onkogen exprimierende Zellklone, die bei dieser Transfektion erhalten worden waren, wurden auf die Beeinflussung der NF1-Transkriptmenge durch eine Induktion der Ha-rasA-Onkogen-Expression untersucht. Die Zellen wurden für 0, 3, 9, 16 und 24 Stunden mit Dexamethason behandelt, wodurch die Expression des Ha-rasA-Onkogens aktiviert wurde. Dann wurde aus den Zellen mRNA isoliert und in einer Northern Blot Analyse untersucht. Zum Nachweis der NF1/C- und NF1/X-, Ha-ras-, und GAPDH-Transkripte wurde die dabei hergestellte Membran mit den jeweiligen cDNA-Proben hybridisiert. Die beiden Zellklone HC 11 LTR Ha-ras4 und 8 transkribierten das Ha-rasA-Onkogen, schwach bereits ohne Induktion (Abb. 7: 0 Stunden-Werte), die induzierte Transkription erreichte in der gezeigten Induktionskinetik ihren Maximalpunkt nach einer Induktionsdauer von 9 Stunden und nahm danach ab. Diese Abnahme der Ha-rasA-Onkogen-Transkriptmenge reflektiert die Aktivität des MMTV-LTR-Promotors, die nach einer Stimulierung mit Dexamethason und einer damit verknüpften Expression des Ha-rasA-Onkogens trotz weiterer Präsenz des Induktors schnell wieder abnimmt (Jaggi et al., 1986). Der Klon HC 11 L₂neo stammte aus einer stabilen Transfektion von HC 11-Zellen mit einem Expressionsvektor, der statt der Ha-rasA-Sequenz die Nukleotidsequenz, die für das bakterielle Neomycinresistenzgen kodiert, enthielt (pL₂neo). Bei diesem Klon waren nur sehr wenige Ha-ras-Transkripte, unabhängig von der Dauer der Dexamethason-Behandlung der Zellen, nachweisbar (Abb. 7: C.). Er exprimierte also das endogene Ha-ras-Gen sehr schwach und das kürzlich beschriebene Glucocorticoid-Responsive Element (GRE) des Ha-ras-Promotors ist in den HC11-Zellen funktionell nicht aktiv (Strawhecker et al., 1989).

Die Menge der Transkripte NF 1/C (6,5 und 4,0 kb) und NF 1/X (5,7 kb) nahm ab, wenn das Ha-rasA-Onkogen exprimiert worden war, sie blieb konstant, wenn die Zellen zwar mit Dexamethason behandelt worden waren, aber wegen des Fehlens der Sequenzen, das Ha-rasA-Onkogen nicht exprimierten (Abb. 7: A., B. und C.). Damit war die Dexamethasonbehandlung ohne Einfluß auf die Menge der Transkripte der NF1-Gene C und X, während sie durch die Ha-rasA-Onkogen-Expression vermindert wurde.

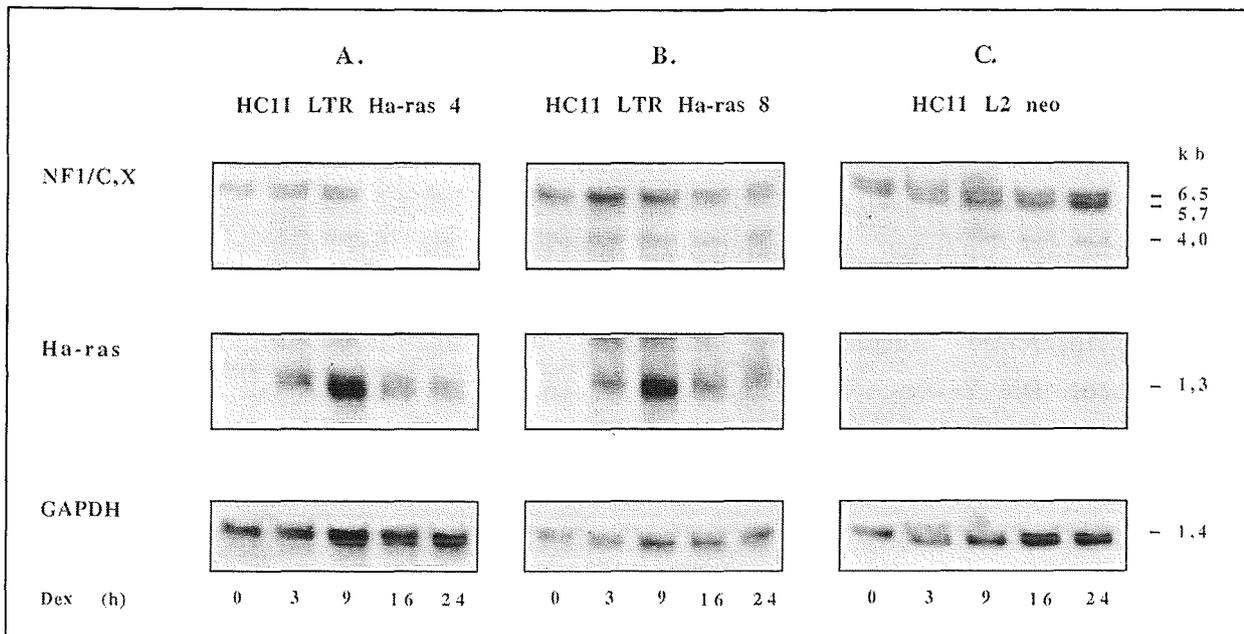


Abb. 7: Beeinflussung der Expression der Gene NF 1/C und X durch die induzierte Expression des Ha-rasA-Onkogens in stabil transfizierten HC 11-Zellklonen.

HC 11-Zellen wurden stabil mit dem Ha-rasA-Onkogen-Expressionsvektor pLTR Ha-rasA und dem Kontrollvektor pL₂neo transfiziert. Die Zellklone HC 11 LTR Ha-ras 4 und 8 und HC 11 L₂neo wurden für 0, 3, 9, 16 und 24 Stunden mit Dexamethason (10^{-7} M) behandelt. Dann wurde Poly-A⁺-RNA aus den Zellen isoliert, je 5µg davon denaturiert, gelelektrophoretisch größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran übertragen.

Die Filter wurden nacheinander mit radioaktiv markierten Proben für die Transkripte der Gene NF 1/C und X, Ha-ras und GAPDH hybridisiert (Beschreibung der Proben siehe Kapitel 2.5., Genproben). Die Abbildung zeigt Autoradiogramme der hybridisierten Filter.

Dies zeigt, auf Grund der Induzierbarkeit der Ha-rasA-Onkogen-Expression besonders deutlich, daß nur nach der Expression des Ha-rasA-Onkogens in den HC 11-Zellen die Menge der Transkripte der NF 1-Gene C und X abnimmt, die Ha-rasA-Onkogenexpression vermindert also die NF 1-Expression.

Die Beeinflussung der NF 1-Genexpression durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens tritt somit nicht nur in den RAC-Zelllinien 311C und 311C-6E auf, sondern auch in einer weiteren Mammaepithelzelllinie, den HC 11-Zellen, ist also weder ein klonaler noch ein zellinienspezifischer Effekt.

3.2.1.2. Die Expression des Onkogens neuT beeinflusst nicht die NF1-Genexpression

Da die Expression des Ha-rasA-Onkogens zu einer Transformation der betroffenen Zelle führt, könnte es sein, daß die Veränderungen in den Zelllinien RAC311C und HC11 nicht direkt mit der Expression des Ha-rasA-Onkogens selbst zusammenhängen, sondern eine Folge der dadurch verursachten Transformation der Zelle sind. Dies scheint nicht der Fall zu sein, denn obwohl die Ha-rasA-Onkogen-Expression in den HC11-Zellklonen nur von vorübergehender Dauer war, die Zellen also nicht dauerhaft transformiert wurden, nahm die NF1-Expression in Folge der transienten Ha-rasA-Onkogen-Expression ab. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Expression eines anderen, ebenfalls transformierenden Onkogens in den HC11-Zellen die Expression der NF1-Gene C und X beeinflusst. Dazu wurde das Onkogen neuT (erbB2) verwendet, von dem angenommen wird, daß es zu der Pathogenese der menschlichen Mammatumoren beiträgt (Bargmann et al., 1986, Kraus et al., 1987, Slamon et al., 1987, Slamon et al., 1989). Das zelluläre erbB2-Protein ist ein Membranrezeptorprotein, das zu der EGF-Rezeptorfamilie gehört. Da bis vor kurzem der natürliche Ligand des erbB2-Rezeptors nicht isoliert war, konnten Untersuchungen des von dem Rezeptor aus initiierten Signaltransduktionsweges nicht optimal durchgeführt werden. Untersuchungen, in denen ein chimärer EGF-Rezeptor-erbB2-Rezeptor durch EGF aktiviert wurde, zeigten, daß es sich bei der durch erbB2 initiierten Signaltransduktion hauptsächlich um einen Weg handelt, in dem das zelluläre ras-Protein nicht beteiligt ist (Fazioli et al., 1991).

Durch die stabile Transfektion von HC11-Zellen mit dem neuT-Expressionsvektor pSV₂neuT wurden Zellklone, die das neuT-Onkogen konstitutiv exprimieren, erhalten (HC11pSVneuT2 und 10). Darüber hinaus wurden HC11-Zellen mit einem Expressionsvektorkonstrukt, das nur die Sequenzen des SV40-Promotors enthielt (pSV), stabil transfiziert und Zellklone isoliert (HC11pSV6, 13).

Die Northern Blot Analyse von aus diesen Zellklonen isolierter RNA zeigt, daß die Klone HC11pSVneuT2 und 10 das neuT-Onkogen exprimieren (Abb. 8: Spuren 1, 4), zwei HC11pSV-Klone (Abb. 8: Spuren 2, 3) dagegen nicht.

In der mRNA der HC11pSV-Klone wird durch die neuT-Probe ein Transkript detektiert, das aber nur 4,2 kb groß ist, während das neuT-Transkript 5,4 kb groß ist (vgl. in Abb. 8 Spuren 1, 4 mit Spuren 2, 3, neuT). Vermutlich handelt es sich um das Transkript des zellulären neu/c-erbB2-Gens. Das neu/c-erbB2-Transkript hat in menschlichen Zellen eine Größe von 4,8 kb (Coussens et al., 1985).

Das Ha-ras-Gen wurde von keinem der vier Zellklone nachweisbar exprimiert (Abb. 8). Die Menge der NF1/C- und NF1/X-Transkripte war in neuT-exprimierenden Zellen nicht geringer als in nicht-exprimierenden Zellen, da die GAPDH-Signalstärken in allen vier Spuren gleich sind und die Signalstärken der NF1/C- (6,5 und 4,0 kb) und NF1/X-Transkripte (5,7 kb) ebenfalls gleich sind.

Somit ist die Expression des Ha-rasA-Onkogens und nicht die Expression eines anderen transformierenden Onkogens verantwortlich für die Verminderung der NF1-Transkriptmenge.

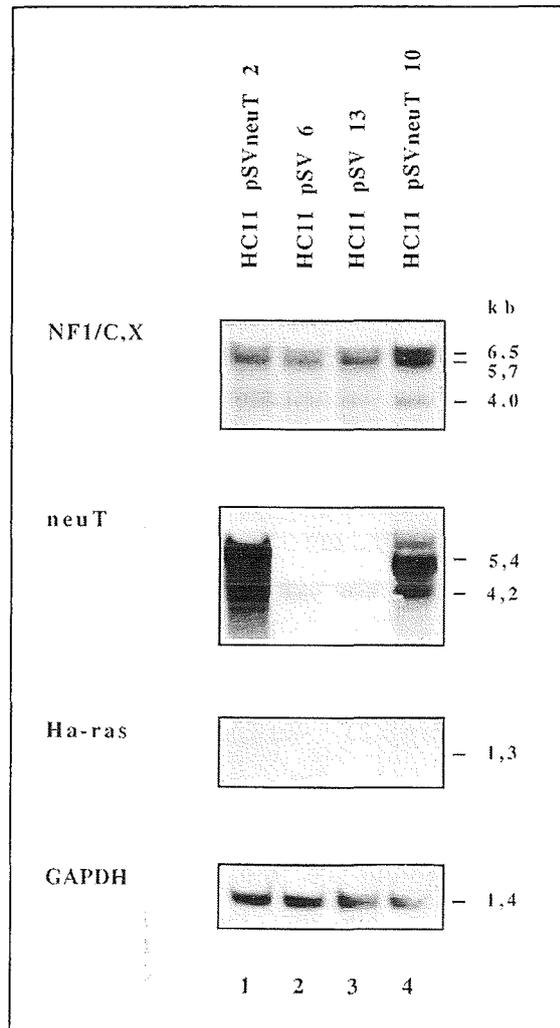


Abb. 8: Expression des neuT-Onkogens in stabil transfizierten HC11-Zellen. HC11-Zellen wurden stabil mit den Expressionsvektoren pSV₂neuT und pSV transfiziert. Je 5 µg Poly-A⁺-RNA aus das neuT-Onkogen exprimierenden (Spuren 1 und 4) und nicht-exprimierenden (Spuren 2 und 3) HC11-Zellklonen wurden denaturiert, größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Filter wurde mit radioaktiv markierten Proben für die Gene NF1/C und X, neuT, Ha-ras und GAPDH hybridisiert (Beschreibung der Proben siehe Kapitel 2.5., Genproben). Die Abbildung zeigt Autoradiogramme des hybridisierten Filters.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der letzten zwei Abschnitte lautet: Die Expression des Ha-rasA-Onkogens und nicht die eines beliebigen anderen transformierenden Onkogens in den Mammaepithelzelllinien RAC311C und HC11 reduziert direkt die Menge der

Transkripte der NF1-Gene C und X. Da die Menge der NF1/A- und NF1/B-Transkripte in den RAC311C-6E- im Vergleich zu den RAC311C-Zellen ebenfalls deutlich reduziert ist, werden diese Transkripte vermutlich wie die NF1/C- und NF1/X-Transkripte beeinflusst.

3.2.2. Mechanismus der Verminderung der NF1-Transkriptmenge

In der Zelle wird die Menge des Transkripts eines Gens durch zwei Vorgänge bestimmt: durch die Transkription, in deren Verlauf Transkripte neu synthetisiert werden und durch den Abbau der Transkripte mittels zellulärer Ribonukleasen. Zwischen Neusynthese und Abbau entwickelt sich ein Gleichgewichtszustand, der die Menge eines Transkripts in der Zelle bestimmt. Die Verminderung der NF1-Transkriptmenge kann also grundsätzlich zwei Ursachen haben:

- 1) eine Hemmung der Transkription der NF1-Gene oder,
- 2) ein verstärkter Abbau der NF1-Transkripte.

Um unterscheiden zu können, welcher der beiden Vorgänge überwiegt, wurden sowohl die nukleäre Transkriptionsrate der NF1-Gene C und X als auch die Abbaugeschwindigkeit der Transkripte dieser NF1-Gene bestimmt.

3.2.2.1. Messung der nukleären Transkriptionsrate der NF1-Gene C und X in RAC311C- und RAC311C-6E-Zellen

Für die Messung der nukleären Transkriptionsrate werden Zellkerne aus den Zellen isoliert und in eine *in vitro*-Transkriptionsreaktion eingesetzt. In den Zellkernen waren zum Zeitpunkt ihrer Isolierung funktionell aktive Transkriptionskomplexe vorhanden, durch die die jeweiligen Transkripte in der *in vitro*-Transkriptionsreaktion transkribiert werden. Vollständig neue Transkriptionskomplexe können in dieser *in vitro*-Reaktion nicht gebildet werden, da dazu die Zelle als funktionsfähige Einheit vorhanden sein muß. In der *in vitro*-Transkriptionsreaktion werden also Transkripte synthetisiert, die gerade transkribiert wurden als die Zellkerne aus den Zellen isoliert worden waren. Um die Transkripte nachweisen zu können, wird der *in vitro*-

Transkriptionsreaktion radioaktives [^{32}P] α UTP zugegeben, das in die Transkripte eingebaut wird und sie dadurch radioaktiv markiert. Die radioaktiven Transkripte werden isoliert und mit an Nitrocellulosefiltern immobilisierten Genproben hybridisiert. Radioaktive Transkripte binden an komplementäre Sequenzen in den Genproben und je mehr Transkripte an eine Genprobe binden umso mehr war von ihnen in der *in vitro*-Transkriptionsreaktion produziert worden. Die Menge der Radioaktivität, die sich an der Stelle ansammelt, an der eine Genprobe immobilisiert worden war, ist also ein Maß für die Menge des synthetisierten Transkripts des Gens und somit für die zum Zeitpunkt der Zellkernisolierung aktuelle Transkriptionsrate des Gens.

Um die Transkriptionsrate der Gene NF 1/C und NF 1/X in RAC 311C- und den das Ha-rasA-Onkogen exprimierenden RAC 311C-6E-Zellen zu bestimmen wurden Zellkerne der beiden Zelllinien in eine *in vitro*-Transkriptionsreaktion mit radioaktivem [^{32}P] α UTP eingesetzt. Die radioaktiven Transkripte wurden mit einem Filter hybridisiert auf dem zusätzlich zu den Genproben für die Gene NF 1/C und NF 1/X zur Kontrolle Genproben für die Gene c-jun, c-fos und GAPDH immobilisiert worden waren.

Die Signale, die von den radioaktiven NF 1/C-Transkripten stammen, sind sehr schwach (Abb. 9: Zeile NF 1/C). Dies bedeutet, daß die Transkriptionsrate, mit der das NF 1/C-Gen transkribiert worden war, sehr niedrig war. Schlußfolgerungen über unterschiedliche NF 1/C-Transkriptionsraten in den beiden Zelllinien wären wegen der schwachen Signale nicht zuverlässig.

Das Gen NF 1/X dagegen wird in beiden Zelllinien stärker exprimiert als das NF 1/C-Gen. Außerdem wird es in den RAC 311C-6E-Zellen sogar stärker transkribiert als in den RAC 311C-Zellen und nicht schwächer wie die in den Zellen vorhandenen Transkriptmengen vielleicht implizieren könnten (Abb. 9: Zeile NF 1/X).

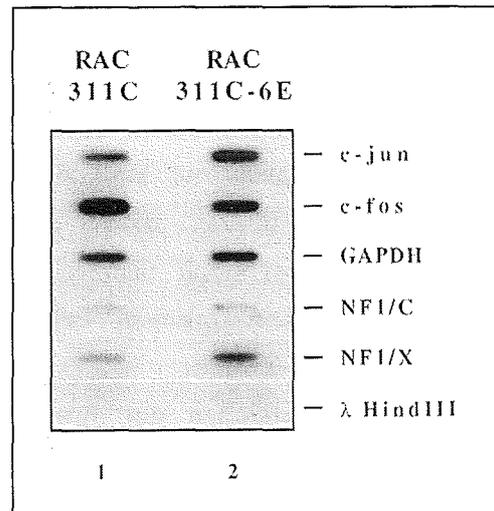
Die Transkription des c-jun-Gens war in den RAC 311C-6E-Zellen stärker als in den RAC 311C-Zellen, während umgekehrt, die Transkription des c-fos-Gens in den RAC 311C-Zellen stärker war (Abb. 9: Zeilen c-jun und c-fos). Da die RAC 311C-Zellen mehr c-fos-Transkripte und die RAC 311C-6E-Zellen mehr c-jun-Transkripte enthalten (Abb. 6) ergänzen sich hier die Daten der Northern Blot Analyse und der *in vitro*-Transkriptionsreaktion.

Dasselbe gilt für das GAPDH-Gen, das in beiden Zelllinien gleich stark transkribiert wird (Abb. 9: Zeile GAPDH) und dessen Transkript in der Northern Blot Analyse in beiden Zelllinien in gleichen Mengen vorlag.

Abb. 9: Bestimmung der nukleären Transkriptionsrate in RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen.

Die während einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion mit [³²P]αUTP in isolierten RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellkernen synthetisierten radioaktiven Transkripte wurden isoliert und Nitrocellulosefilter damit hybridisiert. Auf den Nitrocellulosefiltern waren Genproben für die Transkripte der Gene c-jun, c-fos, GAPDH, NF 1/C, NF 1/X und Hind III-verdaute λ-DNA immobilisiert worden. (Beschreibung der Genproben siehe Kapitel 2.5.) Das Auftragen der Hind III-verdauten λ-DNA dient zur Kontrolle, ob die radioaktiven Transkripte spezifisch an die Genproben binden.

Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm der Filter nach einer Exposition von 4 Wochen.



Die Bestimmung der nukleären Transkriptionsrate der NF1-Gene C und X in RAC311C- und RAC311C-6E-Zellen konnte keine geringere Transkriptionsrate dieser Gene in den RAC311C-6E-Zellen nachweisen. Die Verminderung der NF1/C- und NF1/X-Transkriptmenge kann damit nicht durch eine Veränderung der Transkriptionsrate der Gene erklärt werden.

3.2.2.2. Messung der Abbauraten der NF1/C- und NF1/X-Transkripte in RAC311C- und RAC311C-6E-Zellen

Wird in einer Zelle die Transkription vollständig abgestoppt, so wird die in der Zelle vorhandene Transkriptmenge allein durch die Geschwindigkeit des Abbaus der Transkripte bestimmt. Die Menge der zellulären mRNA nimmt proportional mit der Zeit ab. Aus der Kinetik der Abnahme der Menge eines Transkripts nach einem vollständigen Stop der Transkription kann die Abbaurrate des Transkripts bestimmt werden.

In RAC311C- und RAC311C-6E-Zellen wurde die Transkription durch eine Behandlung der Zellen mit dem Hemmer der RNA-Polymerase II Aktinomycin D abgestoppt. Durch die verwendete Wirkstoffkonzentration wurde die Induktion der Transkription des MMTV-LTR-Promotors durch Dexamethason vollständig verhindert (nicht gezeigte Ergebnisse von parallelen Kontrollversuchen).

Zu verschiedenen Zeiten (0, 1, 2, 4, und 8 Stunden) nach dem Stop der Transkription wurde mRNA aus den behandelten Zellen isoliert und die darin enthaltene Menge an NF 1/C- und NF 1/X-Transkripten bestimmt. Die NF 1/C- und NF 1/X-Transkripte sind 8 Stunden nach dem Beenden der Transkription in der RAC 311C-6E-Zell-mRNA fast vollständig verschwunden, in der RAC 311C-Zell-mRNA aber noch nachweisbar (Abb. 10a). Die NF 1-Transkripte werden in den das Ha-rasA-Onkogen exprimierenden Zellen also schneller abgebaut als in den RAC 311C-Zellen.

Bei dem Vergleichen der Intensitäten des 6,5 kb großen und des 4,0 kb großen NF 1/C-Transkripts fällt auf, daß sich, relativ zueinander, die Mengen der beiden Transkripte verändern. Je länger der Block der Transkription andauert, umso weniger ist von dem 6,5 kb großen Transkript vorhanden. Die Menge des 4,0 kb großen Transkripts dagegen erhöht sich zunächst. Dies könnte bedeuten, daß das 6,5 kb große Transkript ein Vorläufermolekül des 4,0 kb großen Transkripts ist.

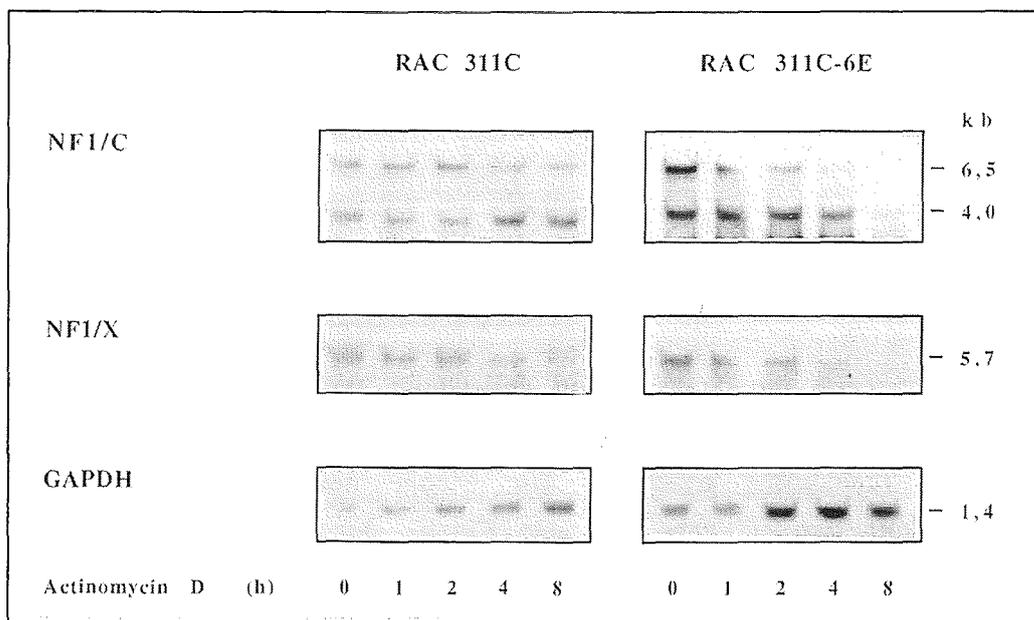


Abb. 10: Bestimmung der Abbaurate von NF 1/C- und NF 1/X-Transkripten in RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen.

a) RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen wurden für 0, 1, 2, 4 und 8 Stunden mit Actinomycin D (10 µg/ml) behandelt. Dann wurde Poly-A⁺-RNA aus den Zellen isoliert, je Spur 5 µg davon denaturiert, größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Filter wurde mit radioaktiv markierten Proben für die Transkripte der Gene NF 1/C, NF 1/X und GAPDH hybridisiert. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme des hybridisierten Filters.

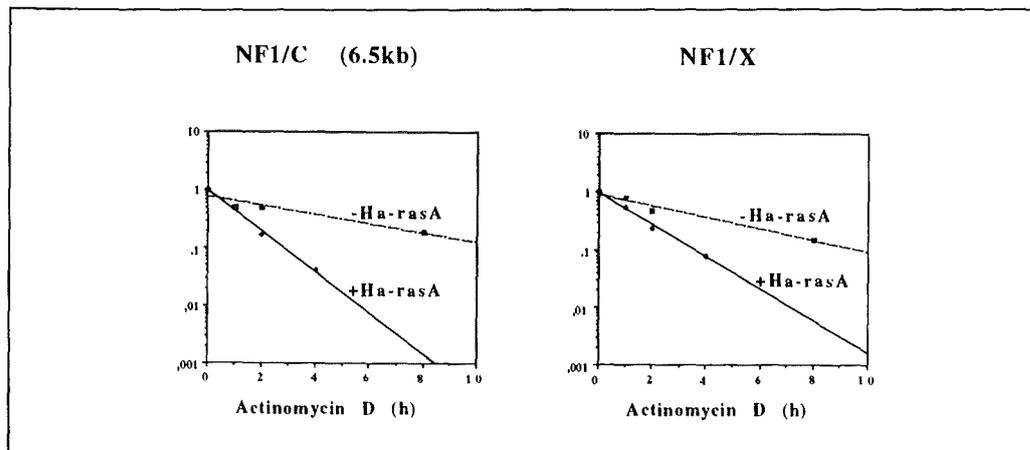


Abb. 10: b) Graphische Darstellung der Auswertung der in Abb. 10a gezeigten Autoradiogramme.

Die Autoradiogramme wurden dichtetensitometrisch ausgewertet und die Werte der dabei erhaltenen Signalintensitäten der NF 1-Signale durch die Signalintensitätswerte des GAPDH-Signals jeder Spur dividiert. Dieser relative Wert wurde für die 0 Stunden-Werte gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte der Kinetik darauf bezogen. Die Eintragung dieser transformierten Werte in ein Achsendiagramm mit einer logarithmischen Skala der y-Achse über die Dauer der Actinomycin D-Behandlung ergibt Punkte, die sich durch eine Gerade verbinden lassen. Die Steigung der Geraden stellt ein Maß für die Schnelligkeit des Abbaus eines Transkripts dar. Die Regressionsgeradengleichungen wurden mittels eines Computer-Algorithmus berechnet und lauten:

RAC 311C NF 1/C (6,5 kb): $y=0,76646 \cdot 10^{(-7,8296 \cdot 10^{-2}x)}$, $R^2= 0,901$,

RAC 311C NF 1/X: $y=0,90419 \cdot 10^{(-9,9973 \cdot 10^{-2}x)}$, $R^2= 0,970$,

RAC 311C-6E NF 1/C (6,5 kb): $y=1,0122 \cdot 10^{(-0,35565x)}$, $R^2= 0,994$,

RAC 311C-6E NF 1/X: $y=0,96535 \cdot 10^{(-0,27736x)}$, $R^2= 0,9991$;

die Regressionskoeffizienten (R^2) sind angegeben. Der Abbau der Transkripte in RAC 311C-Zellen wird durch die mit "-Ha-ras"-bezeichneten Geraden, der Abbau in RAC 311C-6E-Zellen wird durch die "+Ha-ras"-bezeichneten Geraden beschrieben.

Um den Verlauf des Abbaus der NF 1-Transkripte mathematisch auswerten zu können, wurden die Intensitäten der Signale auf den Autoradiogrammen durch eine dichtetensitometrische Messung bestimmt. Da die GAPDH-Signale in den Spuren nicht alle gleich stark sind, also unterschiedliche Gesamt mengen an mRNA eingesetzt worden waren, wurde die Intensität eines NF 1-Transkriptsignals auf die Intensität des GAPDH-Signals in derselben Spur bezogen. Die so berechneten relativen Intensitäten der Signale des 6,5 kb großen NF 1/C-Transkripts und des NF 1/X-Transkripts wurden über die Zeit, die seit dem Stop der Transkription vergangen war, in einem Diagramm aufgetragen. Der Abbau des 4,0 kb großen NF 1/C-Transkripts konnte nicht ausgewertet werden, da bei diesem Transkript Abbau- und Entstehungsprozesse sich überlagern.

Da die Signalintensität exponentiell abnimmt wird der Verlauf des Abbaus der Transkripte in der semi-logarithmischen Auftragung durch eine Gerade, deren

Steigung proportional zu der Geschwindigkeit des Abbaus ist, dargestellt. Die Geraden, die den Abbau der NF 1/C- und der NF 1/X-Transkripte in den, das Ha-rasA-Onkogen exprimierenden, Zellen darstellen, haben eindeutig die größere Geradensteigung. In Zahlenwerte ausgedrückt (mittels des Vergleichs der berechneten Geradensteigungen) lautet dieses Ergebnis: in den das Ha-rasA-Onkogen exprimierenden Zellen ist das 6,5 kb große NF 1/C-Transkript ca. 4,5-mal und das NF 1/X-Transkript ca. 2,8-mal weniger stabil als in Zellen, die das Onkogen nicht exprimieren. Dies bedeutet, daß es sich bei dem Einfluß der Ha-rasA-Onkogen-Expression auf die NF 1-Transkriptmenge in erster Linie um eine Verminderung der Stabilität der NF 1-Transkripte handelt.

3.2.3. Verminderung der NF 1-Transkriptmenge beeinflußt die NF 1-Bindungsaktivität: Korrelation der NF 1/C-Bindungsaktivität mit der NF 1/C-Transkriptmenge in den RAC-Zelllinien 311C und 311C-6E

Die Northern Blot- und Gelretardationsanalysen (Abb. 4 und 1) zeigen, daß sowohl die Menge aller NF 1-Transkripte als auch die Menge der an das "NF 1"-Oligonukleotid bindenden NF 1-Proteine in den RAC311C-6E-Zellen niedrig waren. Dies könnte bedeuten, daß die durch den Stabilitätsverlust verminderte Menge jedes der Transkripte auch die Menge des zugehörigen Proteins vermindert. Bisher wurde aber nicht gezeigt, daß die DNA-bindende Aktivität jeder einzelnen NF 1-Klasse durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens reduziert wird. Deshalb wurde das im folgenden beschriebene Experiment durchgeführt.

Zellkernextrakte und das radioaktiv markierte "NF 1"-Oligonukleotid wurden inkubiert und danach wurden Protein und Oligonukleotid durch Bestrahlung mit UV-Strahlung miteinander verknüpft. Die kovalent verknüpften Komplexe wurden dann mit Antikörpern, die NF 1/C-Proteine erkennen (aPEP4) und, zur Kontrolle, in einem parallelen Ansatz mit dem Präimmunserum inkubiert. Die aPEP4-Antikörper erkennen die Peptidsequenz "CHLNPQDPLKDLVSLACD", die nur in den Aminosäuresequenzen der Carboxylenden der bekannten NF 1/C-Proteine, und in keinem der anderen NF 1-Proteine, enthalten ist. (Die aPEP4-Antikörper waren von N. Mermod, Lausanne hergestellt worden.)

Die aPEP4-Antikörper lagern sich an die Peptidsequenz, gegen die sie gerichtet worden waren, an. Antikörper-enthaltende Komplexe wurden dann mit Hilfe

von Pansorbin® isoliert. Pansorbin® ist eine Suspension von *Staphylococcus aureus*, das über dessen Mantel aus Protein A spezifisch an den konstanten Molekülanteil von Antikörpern bindet.

Dann wurden die isolierten Komplexe denaturiert und in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Da die aPep4-Antikörper an die NF1-Proteine der Klasse NF1/C binden, wurden mit der beschriebenen Methode NF1/C-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexe isoliert. Diese waren in dem Gel wegen der Radioaktivität des "NF1"-Oligonukleotids durch Autoradiographie nachweisbar (Abb. 11: Spuren 2, 3). Die Molekülmassen der in den Komplexen enthaltenen Proteine betragen, nach Abzug des Molekülmassen-

anteils, der auf das "NF1"-Oligonukleotid entfiel (ca. 12 kDa, siehe Abschnitt 3.1.1.), ca. 30, 36, 45, 52, 58 und 63 kDa. Es könnte sich dabei um verschiedene Sequenz- und Modifikationsformen der murinen NF1/C-Proteine handeln, wobei die kleineren Proteine mit Molekülmassen von ca. 30 kDa vermutlich Degradationsprodukte der NF1/C-Proteine sind.

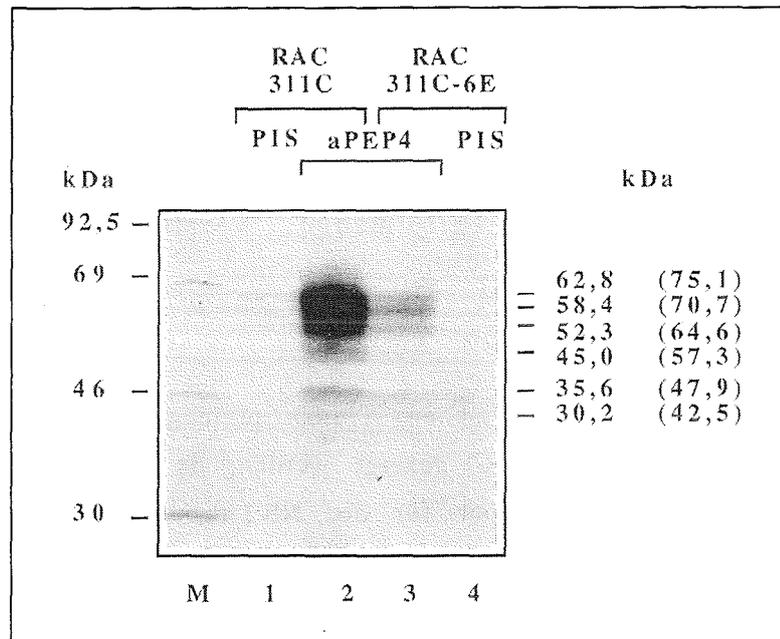


Abb. 11: Immunpräzipitation von NF1-Protein-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexen.

Je 50 µg Zellkernextrakt von RAC 311C- und RAC 311C-6E-Zellen wurden mit 400 fmol radioaktiv markiertem "NF1"-Oligonukleotid inkubiert. Die entstandenen Protein-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexe wurden durch Bestrahlung mit UV-Strahlung kovalent verknüpft. Aus den Reaktionsansätzen wurden NF1/C-Protein-enthaltende Komplexe mit Hilfe des aPEP4-Antikörpers (Spuren 2, 3) präzipitiert, ein Präimmunserum präzipitierte keine Protein-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexe (Spuren 1, 4). Die präzipitierten Komplexe wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert. In Spur M waren ¹⁴C-markierte Markerproteine der in kDa angegebenen Molekülmassen im Gel aufgetrennt worden. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm des Gels.

Die Molekülmassen der markierten NF1/C-"NF1"-Oligonukleotid-Komplexe sind in den Klammern, die der betreffenden NF1/C-Proteine danebenstehend in kDa angegeben.

Die Immunseren (aPEP4 und Präimmunserum) waren von N. Mermod, Lausanne hergestellt worden.

Die Mengen des präzipitierbaren Materials sind, wie der Vergleich von Spur 2 und 3 der Abbildung 11 ergibt, deutlich verschieden. Der Zellkernextrakt, der von RAC311C-6E-Zellen stammte, enthielt weniger der Maushomologen der NF1/C-Proteine, die an das "NF1"-Oligonukleotid gebunden waren als der Zellkernextrakt, der von RAC311C-Zellen stammte. Damit liegt für die NF1-Klasse C in den RAC-Zelllinien 311C und 311C-6E eine eindeutige Korrelation zwischen der Menge an Transkripten und der Menge des an die NF1-Bindungssequenz bindenden Proteins vor: eine durch einen Stabilitätsverlust verkleinerte Transkriptmenge vermindert auch die dazugehörige Bindungsaktivität.

Die Korrelation zwischen Transkriptmenge und Bindungsaktivität konnte nur für die NF1-Klasse C gezeigt werden, da die für dieses Experiment benötigten spezifischen Antikörper für die NF1-Proteine der anderen NF1-Klassen nicht verfügbar sind.

3.2.4. Die verfügbare Menge des Transkriptionsfaktors NF1 begrenzt die Transkription abhängiger Gene

Die bisher beschriebenen Untersuchungen über den Einfluß der Ha-rasA-Onkogen-Expression auf die NF1-Expression lassen die Frage offen, ob die Verminderung der Menge an verfügbarem NF1-Protein die von dem Transkriptionsfaktor NF1 abhängige Transkription von Genen tatsächlich beeinflussen kann.

Der Promotor des mammaepithelzellspezifisch exprimierten MMTV-Provirus enthält neben der NF1-Bindungsstelle des Mammaepithelzell-Enhancerelements eine weitere, nahe der TATA-Box gelegene, NF1-Bindungsstelle, die für die Aktivität des Promotors ebenfalls wichtig ist. Ein Ausschnitt des MMTV-LTR-Promotors, der diese zweite NF1-Bindungsstelle enthält, ist als Teil eines Reporterplasmidkonstrukts in Abbildung 12a graphisch dargestellt, die bekannten Bindungsstellen eukaryontischer Transkriptionsfaktoren sind eingezeichnet. Dabei handelt es sich um Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren oct, NF1, Glucocorticoidrezeptor und den Faktor Neg. Der gezeigte Ausschnitt aus dem

Promotor enthält die als Hormon-Responsives Element (HRE) bezeichnete Regulationseinheit des MMTV-LTR-Promotors und ist ausreichend sowohl die hormoninduzierte als auch die basale (nicht-hormoninduzierte) Transkription in Zellen, in denen auch der gesamte MMTV-LTR-Promotor aktiv ist, zu ermöglichen. Eine Veränderung der NF1-Bindungsstelle in dem HRE-Anteil des MMTV-LTR-Promotors, die dazu führt, daß NF1-Proteine nicht mehr binden können, vermindert die Aktivität des Promotors sehr stark (Miksicek et al., 1987).

Um den Einfluß der durch eine Expression des Ha-rasA-Onkogens verminderten Menge an verfügbarem NF1-Protein in der Mammaepithelzelle auf die Aktivität des MMTV-LTR-Promotors zu untersuchen, wurden die Reporterplasmidkonstrukte pHCwt und pHC8 (Abb. 12a), in denen der MMTV-LTR-Promotor die Expression eines CAT-Reportergens (CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase) steuert, in einem Transfektionsexperiment eingesetzt. (In diesem Experiment wurden HC 11-Zellen verwendet, da sie sich im Gegensatz zu den RAC 311C-Zellen leichter transfizieren lassen.)

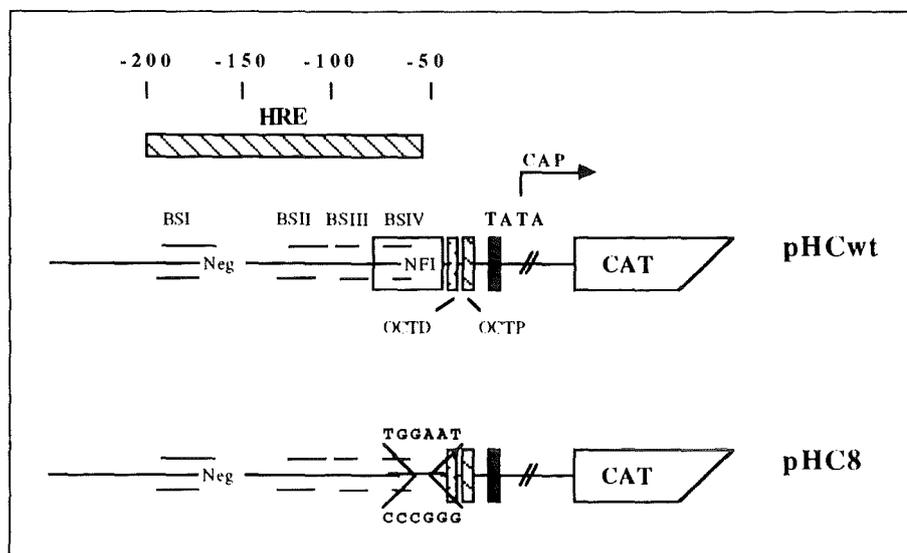


Abb. 12: Hemmung der Aktivität des MMTV-LTR-Promotors durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens.

a) Schematische Darstellung der Reporterplasmidkonstrukte pHCwt und pHC8. In dem ca. 200bp langen Fragment des MMTV-LTRs sind Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren oct (OCT P und OCT D), NF1, Neg und des Glucocorticoidrezeptors (BSI bis IV) vorhanden, die im Diagramm eingezeichnet sind. Das Fragment enthält das HRE (Hormon-Responsives Element) des MMTV-Promotors. In dem Konstrukt pHC8 ist die Sequenz der NF1-Bindungsstelle mutiert, die veränderten Basen sind unter den Originalbasen aufgeführt. Die Expression des CAT-Reportergens wird durch die MMTV-LTR-Promotorfragmente gesteuert. Der Start des Transkripts (CAP) ist angegeben.

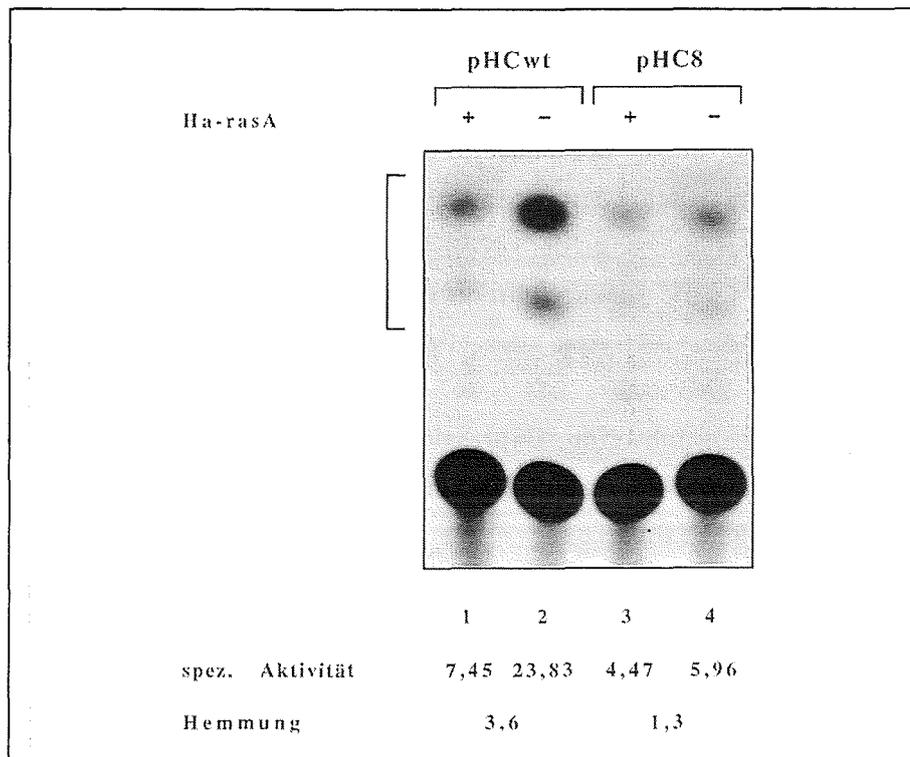


Abb. 12: b) Cotransfektion der Reporterplasmide pHCwt und pHC8 mit dem Ha-rasA-Onkogen-Expressionsvektor Δ MT 212 Ha-rasA in HC 11-Zellen.

Je 8 μ g des Reporterplasmids pHCwt und 4 μ g der Expressionsvektorkonstrukte Δ MT 212 Ha-rasA und Δ MT 212 SV40 SPA (Spuren 1 und 2) bzw. 8 μ g des Reporterplasmids pHC8 und 4 μ g der Expressionsvektorkonstrukte Δ MT 212 Ha-rasA und Δ MT 212 SV40 SPA (Spuren 3 und 4) und jeweils 2 μ g des β -Galaktosidase-Expressionsvektors RSV β Gal II wurden transient in HC 11-Zellen transfiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden Zellextrakte aus den Zellen hergestellt und die darin enthaltene Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase bestimmt. Für jeden Ansatz wurde die Menge jedes Extrakts, die 3,1U β -Galaktosidaseaktivität enthielt, für die Bestimmung der Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase verwendet, um eventuell unterschiedliche Transfektionseffizienzen auszugleichen.

Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm der zur Trennung der Acetylierungsprodukte des Chloramphenicols verwendeten Dünnschichtchromatographieplatte. Die Klammer markiert die beiden Acetylierungsprodukte des Chloramphenicols.

Die spezifische Aktivität gibt den Umsatz des Chloramphenicols in p mol pro Stunde und pro Einheit β -Galaktosidase-Aktivität an. Die Hemmung gibt an, um wieviel die Aktivität des Reporterplasmidpromotors vermindert wurde, wenn der Ha-rasA-Onkogen-Expressionsvektor cotransfiziert wurde.

(Das gezeigte Experiment ist eine von 3 durchgeführten Wiederholungen.)

Die Expression des Ha-rasA-Onkogens in den Zellen wurde durch die Cotransfektion des Expressionsvektors Δ MT 212 Ha-rasA, der das Ha-rasA-Onkogen unter der Kontrolle einer Deletionsmutante des menschlichen Metallothionein-Promotors exprimiert, erreicht. Das Metallothionein-Promotorfragment (Scholer et al., 1986, Karin et al., 1987) kann durch die Behandlung der Zellen mit zweiwertigen Cadmiumionen aktiviert werden, in

HC 11-Zellen ist es aber auch ohne vorherige Behandlung der Zellen aktiv, eine Behandlung der transfizierten Zellen mit Cadmiumionen verdoppelt die Promotoraktivität (nicht gezeigte Vorversuche).

In einem Enzymtest, der 36 Stunden nach der Transfektion durchgeführt wird, wird die Aktivität der in den transfizierten Zellen vorhandenen Chloramphenicol-Acetyltransferase durch die Acetylierung von radioaktivem Chloramphenicol gemessen. Der enzymatische Umsatz des Chloramphenicols ist umso größer, je mehr Chloramphenicol-Acetyltransferase synthetisiert wurde und je stärker das Promotorfragment des Reporterplasmids die Transkription des CAT-Gens aktivierte.

Wurde der Ha-rasA-Onkogen-Expressionsvektor zusammen mit dem MMTV-LTR-Promotorkonstrukt pHCwt in HC 11-Zellen transfiziert, so verminderte dies die Aktivität des MMTV-LTR-Promotors gegenüber einer Cotransfektion von pHCwt und einem Expressionsvektor ohne die Ha-rasA-Sequenz (Δ MT 212 SV40 SPA) um einen Faktor von 3,6. Die Umsetzung des Chloramphenicols in dem Enzymtest und damit die spezifische Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase ist in Spur 1 3,6-mal geringer als in Spur 2 (Abb. 12b).

Wurde anstatt des Wildtyp-MMTV-LTR-Promotorkonstrukts pHCwt, das Konstrukt mit der mutierten NF1-Bindungsstelle (pHC8) verwendet, so vermindert die Expression des Ha-rasA-Onkogens die Promotoraktivität nur geringfügig um den Faktor 1,3 (Abb. 12b: Spuren 3 und 4).

Da keine weitere signifikante Reduzierung der pHC8-Promotoraktivität durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens erfolgte, bedeutet dies, daß die Wirkung des Ha-rasA-Onkogens auf den MMTV-LTR-Promotor über die Verminderung der verfügbaren NF1-Proteinmenge erfolgt und nicht über einen weiteren, unbekanntem Effekt.

Damit wird also durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens in Mammaepithelzellen die Menge der NF1-Bindungsaktivität reduziert und dadurch auch die transkriptionelle Aktivität des durch NF1 kontrollierten MMTV-Provirus herabgesetzt.

3.2.5. Die Ha-rasA-Onkogen-Expression reprimiert die NF1-Expression auch in Fibroblasten

Über den durch das Ha-rasA-Onkogen aktivierten Regulationsmechanismus könnte die Expression mammaepithelzellspezifisch exprimierter Gene in Mammaepithelzellen unter bestimmten physiologischen Bedingungen variiert oder sogar verhindert werden: Nach Abschluß der Laktation eines Säuglings, wenn die Mamdrüse zurückgebildet wird, könnten beispielsweise auf Mammaepithelzellen einwirkende Faktoren diesen Signaltransduktionsweg aktivieren. Vielleicht spielt er sogar eine Rolle bei der Repression der Expression mammaepithelzellspezifisch exprimierter Gene in Zellen anderer Gewebe. Für die NIH 3T3-Fibroblasten jedoch ist dies nicht der Fall, denn die NF1-Bindungsaktivitäten der NIH 3T3- und HC 11-Zellkernextrakte sind nicht unterschiedlich (Abb. 1).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die NF1-Expression in den NIH 3T3-Fibroblasten genauso wie in den Mammaepithelzelllinien RAC 311C und HC 11 durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens vermindert wird. Dazu wurden stabil mit dem Expressionsvektor pLTR Ha-rasA transfizierte NIH 3T3-Zellen (Schönthal et al., 1988) mit Dexamethason für 0, 6, 18 und 24 Stunden zur Induktion der Ha-rasA-Onkogen-Expression behandelt. Parallel dazu wurden nicht transfizierte NIH 3T3-Zellen 0, 3, 16 und 24 Stunden mit Dexamethason behandelt. Dann wurde mRNA aus den Zellen isoliert und in einer Northern Blot Analyse untersucht.

Die Ha-rasA-Onkogen-Transkripte waren erst nach der Induktion des MMTV-LTR-Promotors nachweisbar, der Maximalwert im Beobachtungszeitraum war nach 6 Stunden erreicht, danach nahm die Ha-ras-Transkriptmenge wieder ab (Abb. 13: A). In den nicht transfizierten NIH 3T3-Zellen konnten keine Ha-ras-Transkripte nachgewiesen werden. Nur wenn das Ha-rasA-Onkogen in den NIH 3T3-Zellen exprimiert worden war, nahm die Menge der NF1/C- und NF1/X-Transkripte ab (Abb. 13: A und B).

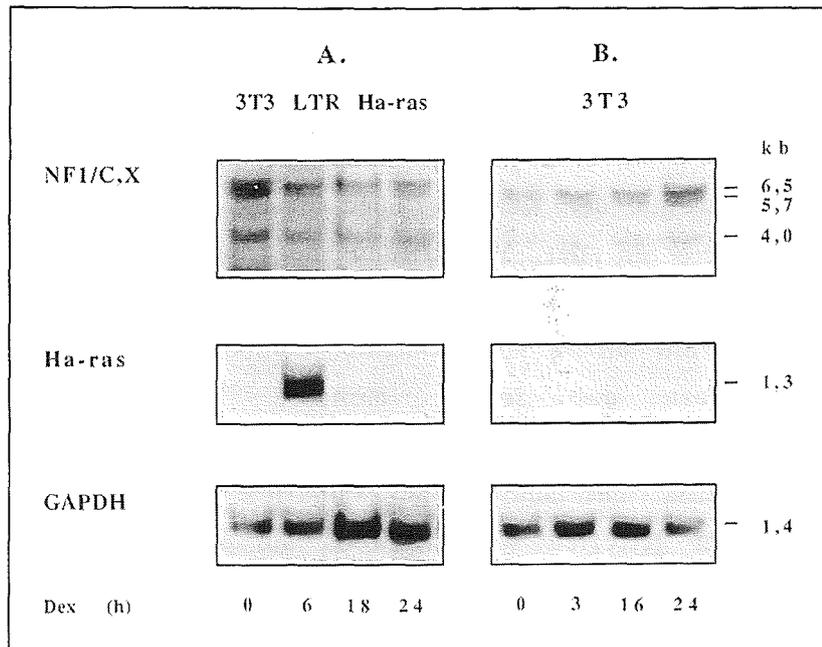


Abb. 13: Die Expression der NF 1-Gene C und X in NIH 3T3-Zellen nach Induktion der Ha-rasA-Onkogen-Expression. NIH 3T3-Zellen wurden für 0, 3, 16 und 24 Stunden, NIH 3T3 LTR Ha-ras-Zellen (Schönthal et al., 1988) für 0, 6, 18 und 24 Stunden mit Dexamethason ($2 \times 10^{-7}M$) behandelt. Dann wurde Poly-A⁺-RNA isoliert, je 5µg davon denaturiert, größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Filter wurde nacheinander mit radioaktiv markierten Proben für die Transkripte der Gene NF 1/C und X, Ha-ras und GAPDH hybridisiert (Beschreibung der Proben siehe Kapitel 2.5., Genproben). Die Abbildung zeigt Autoradiogramme des hybridisierten Filters.

Somit vermindert die Expression des Ha-rasA-Onkogens die Menge der Transkripte der NF1-Gene C und X nicht nur in den Mammaepithelzelllinien RAC311C und HC11 sondern auch in der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3, es handelt sich also um einen Effekt, dessen Auftreten nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt ist.

3.3. Klonierung der NF 1/X-cDNA

Es ist nicht möglich mit der Kenntnis über diesen Regulationsmechanismus zu entscheiden, wie NF 1 an der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression beteiligt ist. Fest steht auf Grund der in Teil 3.1. beschriebenen Ergebnisse, daß es ein allein vorkommendes "Mammaepithelzell"-NF 1-Protein nicht gibt, sondern daß immer mehrere NF 1-Proteine in einer Mammaepithelzelle vorhanden sind. Wenn diese NF 1-Proteine, wie es anzunehmen ist, eine unterschiedliche Funktion haben, dann muß eine Auswahl unter ihnen getroffen werden, wenn sie an einen Promotor binden. Möglicherweise erfolgt dies über eine Interaktion mit anderen, mit dem Promotor wechselwirkenden, Faktoren.

Die strukturellen Grundlagen, die eine Auswahl unter den NF 1-Proteinen ermöglichen, liegen mit großer Wahrscheinlichkeit in der Sequenz der carboxyterminalen Hälften der Proteine, denn hierin existiert eine große Variabilität. So unterscheiden sich nicht nur die Proteinvertreter der vier NF 1-Klassen in der Sequenz der carboxyterminalen Hälften der Proteine, sondern auch NF 1-Proteine einer Klasse. Es wurden aus HeLa-Zellen insgesamt sechs NF 1/CTF-Transkripte (Klasse NF 1/C) isoliert, die sich in der kodierenden Sequenz unterscheiden. Die Unterschiede beruhen, wie sich nach der Klonierung des NF 1/C-Gens herausstellte, auf dem alternativen Zusammenbau der elf Exons des Gens während eines Spleißprozesses. Die Aminosäuresequenz der konservierten Domäne, die die DNA-Bindungsdomäne enthält, wird dabei von einem Exon (Exon Nr.2) kodiert und mehrere, für die carboxyterminale Hälfte des Proteins kodierende, Exons werden unterschiedlich zusammengesetzt. Aus diesem Prozess resultieren NF 1/CTF-Transkripte, die für NF 1-Proteine mit unterschiedlicher Sequenz der carboxyterminalen Hälfte kodieren (Santoro et al., 1988, Meisterernst et al., 1989).

In der Northern Blot Analyse können in HeLa-Zell-mRNA aber nur zwei Transkripte (8,6 und 4,5 kb) nachgewiesen werden, entweder weil die Größenunterschiede zwischen den Spleißvarianten zu klein sind, um die Transkripte zu trennen oder weil einige der Transkriptvarianten zu selten sind, als daß sie nachgewiesen werden könnten.

Dieser Befund bedeutet für die Untersuchung der Rolle von NF 1 in der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression, daß die Zahl der verschiedenen NF 1-Transkripte in den Mammaepithelzellen vermutlich noch

größer ist als bisher bestimmt wurde und daher detailliertere Untersuchungen der NF 1-Transkripte erfolgen müssen.

Da bereits andere Arbeitsgruppen Transkriptvarianten der NF 1-Gene A, B und C isoliert haben, bzw. an deren Isolierung arbeiten, wurde im folgenden die NF 1/X-Transkripte von Mammaepithelzellen und Fibroblasten im Detail analysiert. In der Northern Blot Analyse wurde in der Mammaepithelzell-mRNA und in der Fibroblasten-mRNA ein NF 1/X-Transkript nachgewiesen, das eine Länge von 5,7 kb hat (Abb. 4 und 5). Es könnte sich dabei auch um mehrere Transkriptvarianten handeln, die sich um ein, im Verhältnis zu ihrer Gesamtlänge, kurzes Stück der kodierenden Sequenz unterscheiden. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Fragmente der kodierenden Sequenz des NF 1/X-Transkripts isoliert, denn bei kürzeren Fragmenten können durch eine Größenfraktionierung auch Unterschiede von z.B. nur 100 Nukleotiden sichtbar gemacht werden.

3.3.1. Isolierung der für die carboxyterminale Hälfte des murinen NF 1/X-Proteins kodierenden cDNA

Für die Analyse des NF 1/X-Transkripts wurde zunächst zelluläre mRNA, die aus NIH 3T3- und HC 11-Zellen isoliert worden war, revers transkribiert. Der für den Start der reversen Transkription nötige DNA-Einzelstrang (Primer) bestand aus 17 aneinander gekoppelten Desoxythymidinen. Dieses Oligonukleotid bindet an den Poly-A-Schwanz der mRNA. Die "Reverse Transkriptase" synthetisiert dann ausgehend von dem 3'-Ende des Poly-(dT)-Oligonukleotids einen DNA-Strang, der komplementär ist zu dem Transkript, an das das Oligonukleotid gebunden ist. Dieser einzelsträngige cDNA-Strang wurde für die selektive Amplifikation von Fragmenten der NF 1/X-Transkripte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Die hierzu nötigen Primer wurden von der publizierten Hamster-cDNA-Sequenz abgeleitet (Gil et al., 1988). Die Sequenzen von Primer 1 (Nukleotid 725 bis 752 der Hamster-cDNA) liegen innerhalb der konservierten Domäne von NF 1/X, also in dem Bereich, in dem alle NF 1-Proteine nahezu dieselbe Aminosäuresequenz haben. Deshalb kann Primer 1 an alle NF 1-cDNAs binden, die vorhanden sind. Die Selektivität für die NF 1/X-cDNA wird durch Primer 2 erreicht. Die Basensequenz von Primer 2 (Nukleotid 1625 bis 1654 der Hamster-cDNA) entspricht den letzten Basen vor dem, den

translatierten Bereich des NF 1/X-Transkripts begrenzenden, Stop-Codon. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist spezifisch nur in NF 1/X-Proteinen vorhanden. Da für die Festlegung der Primersequenzen nur die Hamster-cDNA-Sequenz vorlag, aber cDNA aus Mauszellen amplifiziert werden sollte und artspezifische Unterschiede zwischen den cDNA-Sequenzen vorhanden sein können, wurde im Fall von Primer 2 ein sogenanntes degeneriertes Oligonukleotid verwendet. Bei dem degenerierten Oligonukleotid variiert immer die dritte Base eines für eine Aminosäure kodierenden Basentriplets zwischen den Möglichkeiten, die der genetische Code bietet. Es handelt sich also um ein Gemisch von verschiedenen Oligonukleotiden, deren einzelne Basensequenzen aber immer für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren. Wenn die Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteinbereiche in Hamster- und Maus-NF 1/X-Proteinen identisch sind, enthält das degenerierte Oligonukleotid immer ein Oligonukleotid, das genau die Sequenz besitzt, die in dem Maus-Transkript für die Kodierung dieser Aminosäurefolge verwendet worden war. Die Basensequenzen zwischen Primer 1 und Primer 2 kodieren für einen kurzen Bereich der konservierten Domäne und, bis auf die letzten beiden Aminosäuren, für die gesamte carboxyterminale Hälfte des Proteins (in Abb. 14 dargestellt an der Hamster-cDNA von NF 1/X).

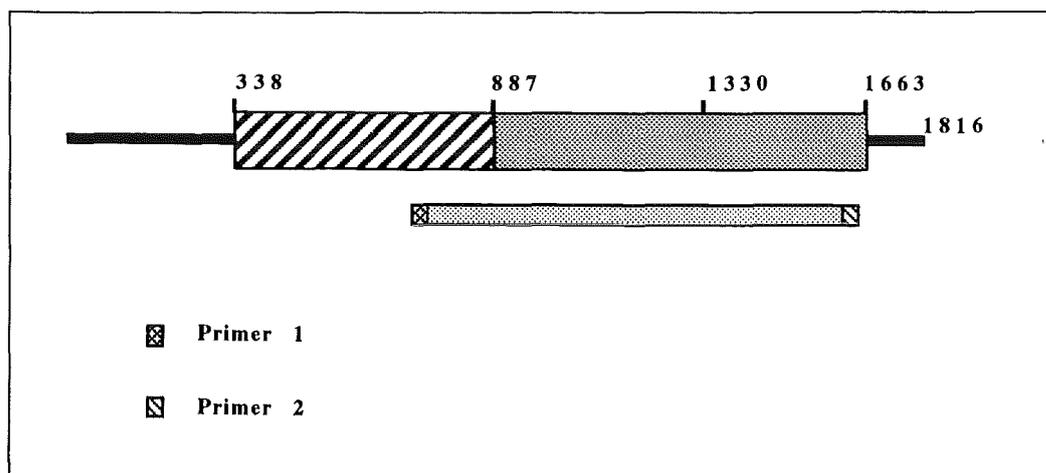
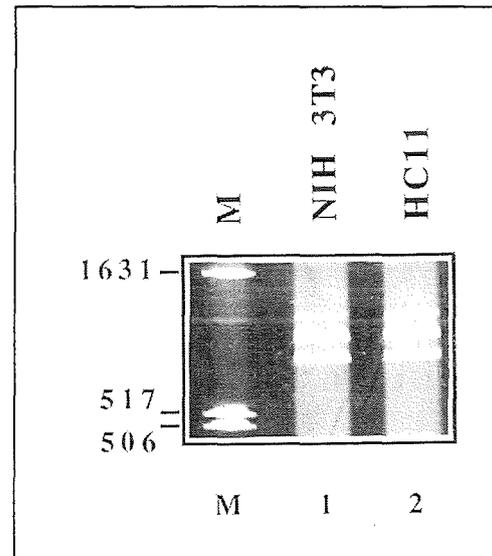


Abb. 14: Darstellung der Lage der für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer 1 und 2 und des amplifizierten Fragments relativ zu der Hamster NF 1/X-cDNA. Der Hamster-NF 1/X-cDNA-Klon ist wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, die Basennummerierung der Hamstersequenz wurde übernommen. Primer 1 entspricht Nukleotid 725 bis 752 des kodierenden Strangs, Primer 2 Nukleotid 1625 bis 1654 des Gegenstrangs der Hamster-cDNA. Die Sequenzen von Primer 1 und 2 begrenzen das amplifizierte Fragment (unter der cDNA eingezeichnet).

Das Fehlen oder Hinzufügen von Nukleotidsequenzen ist in diesem Bereich, weil er dem bei dem alternativen Spleißen des NF1/CTF-Primärtranskripts betroffenen entspricht, sehr wahrscheinlich und läßt sich durch das Auftreten von Fragmenten unterschiedlicher Größe am Ende der PCR-Amplifikation erkennen.

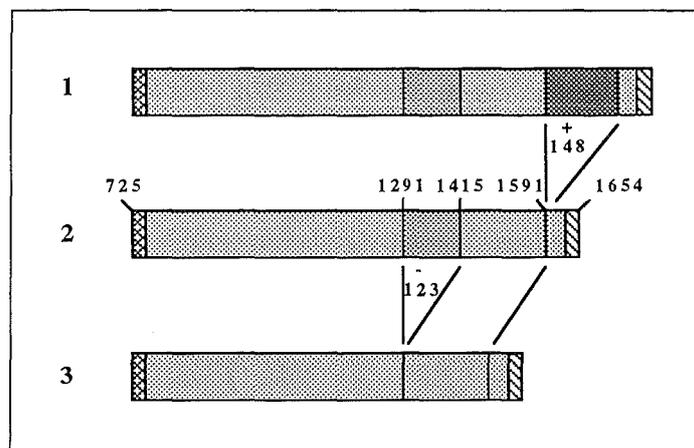
Abb. 15: Amplifikationsprodukte der murinen cDNA-Fragmente.

a) Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte einer PCR-Amplifikation von HC 11-Zell- und NIH 3T3-Zell-cDNA mit den Primern 1 und 2 (Abb. 14) in einem 4%-igen nicht-denaturierenden Acrylamidgel. In Spur M sind DNA-Fragmente der in Basenpaaren angegebenen Größen des Plasmids pBR 322 zu erkennen. Die Abbildung zeigt eine Photographie des ethidiumbromid-gefärbten Gels.



b) Graphische Darstellung der mit Primer 1 und 2 amplifizierten cDNA-Fragmente.

Fragment 1 enthielt eine Sequenz von 148 Nukleotiden (dunkelste Musterung), die Fragment 2 und 3 fehlte. Fragment 1 und 2 enthielten 123 Nukleotide (halbdunkle Musterung), die Fragment 3 fehlte. Alle drei Fragmente wurden durch die Sequenzen der Primer 1 und 2 begrenzt (Markierung wie in Abb. 14). Fragment 2 entsprach der Hamster-cDNA, daher wurde bei diesem Fragment die Basennummerierung der Hamster-cDNA-Sequenz übernommen.



Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zeigte, daß neben dem Fragment, das die von der bekannten Hamster-cDNA-Sequenz her abgeleitete Größe von ca. 1 kb hatte, noch zwei weitere Fragmente vorhanden waren, mit einer Größe von ca. 0,9 und 1,1 kb und zwar in beiden Amplifikationsansätzen mit NIH 3T3- und HC 11-Zell-cDNA (Abb. 15a). Die

NF 1/X-cDNA-Fragmente wurden in den Plasmidvektor Bluescript (pBS SK m13-) subkloniert und vollständig sequenziert.

Bei dem kürzesten Fragment (3) fehlen die Basen 1292 bis einschließlich 1414 des mittleren Fragments (2), und das längste Fragment (1) enthält eine Insertion von 148 Basen hinter der Base 1591 des mittleren Fragments. Das Fragment 2 entspricht, von einigen Basenaustauschen abgesehen, genau der Hamster-cDNA-Sequenz. (Eine graphische Darstellung der drei Fragmente gibt Abbildung 15b wieder, in der die Basennummerierung der Hamster-cDNA übernommen wurde, die für Fragment 2 exakt zutrifft.) Größere Sequenzunterschiede als Basenaustausche zwischen Fragmenten, die aus NIH 3T3- oder HC 11-Zell-cDNA amplifiziert worden waren, wurden nicht festgestellt.

3.3.2. Nachweis der NF 1/X-Transkriptvarianten in HC 11- und NIH 3T3-Zellen

Während der Amplifikation von DNA-Fragmenten in einer Polymerasekettenreaktion kommt es häufig zu Veränderungen der Basensequenz des DNA-Fragments. Diese Veränderungen reichen von dem Austausch einzelner Basen bis hin zur Deletion oder Insertion von längeren Basenfolgen. Daher war es nötig zu überprüfen, ob die, durch die Polymerasekettenreaktion isolierten NF 1/X-Transkriptvarianten tatsächlich in den Zellen vorhanden sind. Dieser Nachweis kann mit der RNase-Protektionsanalyse erbracht werden. Bei dieser Analyse wird *in vitro* eine radioaktiv markierte RNA in Gegenstrangrichtung zu der untersuchten mRNA synthetisiert. Diese radioaktive RNA lagert sich mit der zellulären mRNA zusammen, da komplementäre Basensequenzen miteinander paaren. Es entsteht ein RNA-Doppelstrang. Fehlen der einen RNA aber Sequenzabschnitte, die die andere RNA enthält, so kann an diesen Stellen keine Basenpaarung erfolgen. Im Anschluß an die Hybridisierung der RNAs werden die RNA-Hybride mit den beiden Endoribonukleasen RNase T1 und RNase A inkubiert. Die Endoribonukleasen entfernen ungepaarte einzelsträngige RNA-Anteile, die gepaarten RNA-Doppelstränge bleiben intakt. Nach dem Verdau werden die RNA-Doppelstränge getrennt und mittels denaturierender Gelelektrophorese

größenfraktioniert. Nachgewiesen werden können in dem Gel nur die Fragmente, die von der radioaktiven RNA stammen. Es werden Fragmente unterschiedlicher Länge auftauchen, wenn die radioaktive RNA Sequenzen enthielt, die in der zellulären mRNA nicht vorhanden waren. Von der Länge der Fragmente kann abgeleitet werden, wo die in der zellulären mRNA fehlenden Sequenzen in der Gesamtsequenz lokalisiert sind.

Zur Untersuchung der NF 1/X-Transkriptvarianten wurde zunächst das Subfragment des längsten isolierten cDNA-Fragments (Abb. 15b: 1) zwischen einer Erkennungsstelle der Restriktionsendonuklease Pst I bei Nukleotidposition 1330 und dem Ende des Fragments an Nukleotidposition 1654 in einen Plasmidvektor eingesetzt, der neben der multiplen Klonierungsstelle Promotorsequenzen enthält, die von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt werden (Bluescript SK m13⁻, siehe Abb. 16a), dabei wurde das 3'-Ende des kodierenden Strangs des cDNA-Fragments neben den T7-Promotor gebracht. Dieses Konstrukt wurde durch einen Schnitt in der multiplen Klonierungsstelle links von Nukleotid 1330 des Subfragments linearisiert und dann als Matrize für die T7-RNA-Polymerase eingesetzt. Die T7-RNA-Polymerase synthetisierte ausgehend von dem T7-Promotor bis zum Ende der Matrize hinter Nukleotid 1330 in der multiplen Klonierungsstelle eine RNA, die aufgrund der Orientierung des NF 1/X-Fragments zum T7-Promotor zu der zellulären mRNA gegensinnig war. In dieser Synthese wurde statt dem Ribonukleotid CTP radioaktives [³²P]α-CTP eingesetzt, durch dessen Einbau die RNA radioaktiv markiert wurde.

Diese RNA wurde dann mit mRNA, die aus NIH 3T3- und HC 11-Zellen isoliert worden war, inkubiert. Wenn in dieser zellulären mRNA alle drei Varianten der NF 1/X-Transkripte vorhanden sind, lagern sie sich mit der radioaktiven RNA zusammen, je nachdem aber mit welcher NF 1/X-Transkriptvariante die Paarung erfolgte, liegen unterschiedliche ungepaarte Bereiche vor. Der Abbau der einzelsträngigen RNA-Sequenzen ergibt folgende radioaktiv markierten Fragmente (siehe Abb. 16b):

- Paarung mit der von Fragment 3 abgeleiteten Transkriptvariante NF 1/X 3 schützt Base 1415 bis 1591 und Base 1592 bis 1654, liefert Fragmente der radioaktiven RNA der Längen 177 Nukleotide und 63 Nukleotide;
- Paarung mit der von Fragment 2 abgeleiteten Transkriptvariante NF 1/X 2 schützt Base 1330 bis 1591 und Base 1592 bis 1654, liefert Fragmente der radioaktiven RNA der Längen 262 Nukleotide und 63 Nukleotide;
- Paarung mit der von Fragment 1 abgeleiteten Transkriptvariante NF 1/X 1 schützt die gesamte radioaktive Probe, also Base 1330 bis 1654 einschließlich

der Insertion von 148 Basen, liefert ein Fragment von 473 Nukleotiden Länge.

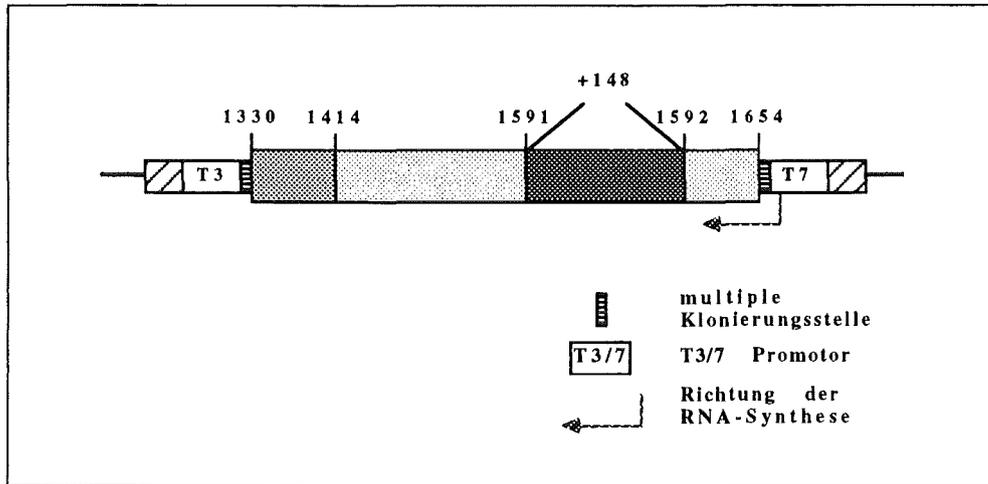


Abb. 16: RNase-Protektionsanalyse.

a) Darstellung des Plasmidkonstrukts, das für die *in vitro*-Synthese der radioaktiv markierten Gegenstrang-RNA verwendet wurde. Gezeigt wird, in der bereits in Abbildung 15 verwendeten Darstellungsweise, das Subfragment (Nukleotid 1330 bis 1654) des PCR-Fragments 1, die multiplen Klonierungsstellen des Vektors und die Lage der T3- und T7-Promotoren. Der Pfeil gibt die Richtung der RNA-Synthese an.

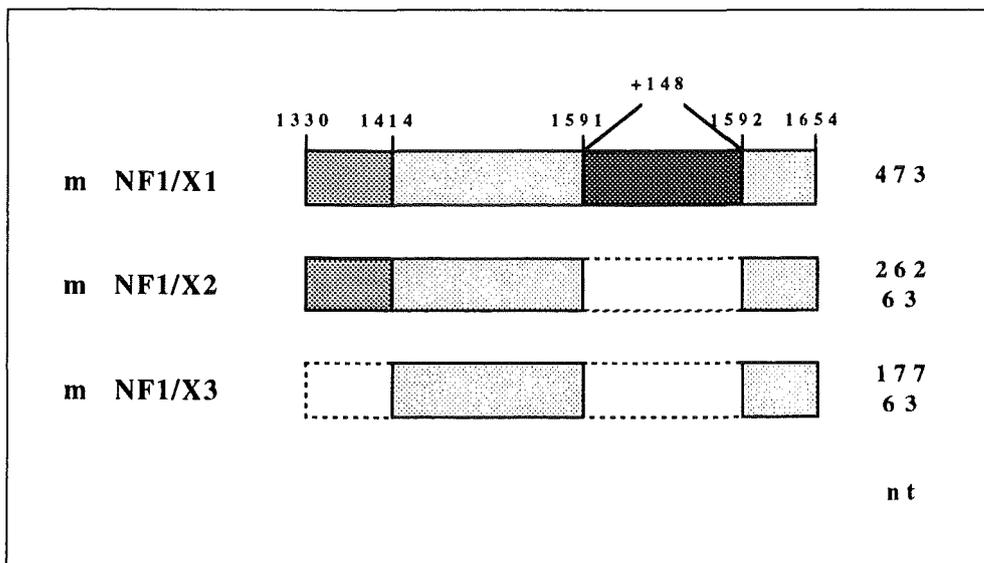


Abb.16: b) Darstellung der durch die drei postulierten NF1/X-Transkriptvarianten (mNF1/X1, 2, 3) geschützten Bereiche der *in vitro* synthetisierten RNA. Geschützte Bereiche sind voll ausgezeichnet, ungeschützte Bereiche sind gestrichelt dargestellt. Die *in vitro* synthetisierte RNA wird durch die Variante mNF1/X1 vollständig geschützt. Die Längen der geschützten Fragmente sind rechts angegeben (in Nukleotiden).

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der experimentellen Analyse. Die unverdaute radioaktive Probe hat eine Länge von 515 Nukleotiden (Spur 5). Die Probe ist länger als das NF 1/X-cDNA-Fragment, da die RNA-Synthese durch die T7-RNA-Polymerase bereits vor der cDNA-Sequenz in dem Vektor beginnt.

Die enzymatische Spaltung der radioaktiven Probe, nachdem sie mit tRNA, die keine zu ihr komplementären Sequenzen enthalten sollte, hybridisiert worden war, liefert einige Fragmente (Spur 3). Diese Fragmente sind vermutlich durch Basenpaarung mit der tRNA und innerhalb der radioaktiven RNA selbst vor der enzymatischen Spaltung geschützt worden, und werden bei der Analyse der zellulären mRNA, wo sie ebenfalls auftreten, nicht berücksichtigt. Wurde mRNA aus NIH 3T3- bzw. HC 11-Zellen zur Hybridisierung mit der radioaktiven Probe eingesetzt, so erscheinen darüber hinaus Fragmente, die nur dort vorkommen (Spuren 1, 2). Ihre Größen wurden zu 473, 418, 354, 285, 262 und 177 Nukleotiden bestimmt. Damit sind drei der vier Fragmente, die auf Grund der Vorüberlegungen erwartet wurden, vorhanden. Das kleinste dieser Fragmente kann nicht nachgewiesen werden, da es sich bei der gezeigten Trennung der Fragmente nicht mehr innerhalb des Gels befindet. Das Vorhandensein der übrigen Fragmente reicht für den Nachweis aller NF 1/X-Transkriptvarianten aber bereits aus.

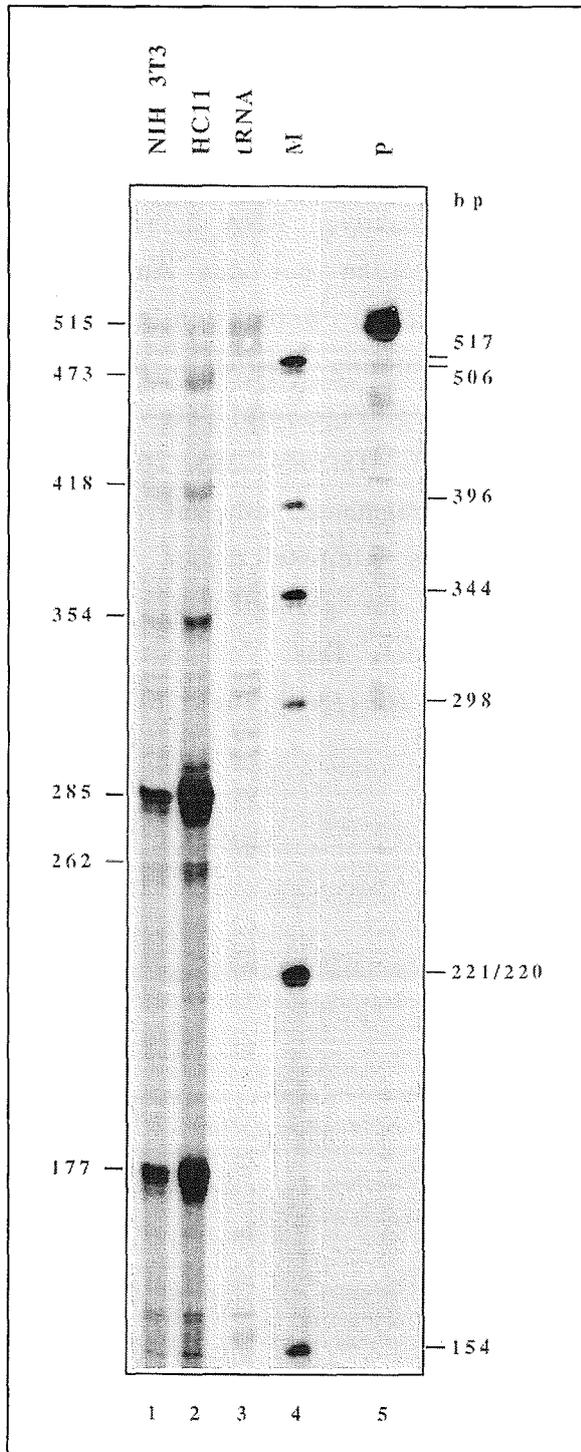


Abb. 17: RNase-Protektionsanalyse mit mRNA aus HC 11- und NIH 3T3-Zellen. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm des zur Trennung der radioaktiven RNA-Fragmente verwendeten Gels. Die unverdaute *in vitro* synthetisierte radioaktive Gegenstrang-RNA ist in Spur 5 aufgetragen. Spur 4 enthält radioaktiv markierte Fragmente des Plasmids pBR 322, die durch den Verdau der DNA mit Hinf I entstehen. Die Längen der Fragmente sind rechts angegeben (in Basenpaaren, bp). Die Spuren 1, 2 und 3 enthalten die Fragmente, die nach der RNase-Spaltung vorhanden sind, nachdem die radioaktive RNA mit NIH 3T3-mRNA, HC 11-mRNA und tRNA hybridisiert worden war, die Werte der Längen der spezifisch geschützten RNA-Fragmente sind links angegeben.

Das 473 Nukleotide lange Fragment kann nur auftauchen, wenn es ein NF 1/X-Transkript in den Zellen gibt, das die Insertion von 148 Nukleotiden an Position 1591 relativ zur Hamster-cDNA hat. Das 262 Nukleotide lange Fragment dokumentiert die Anwesenheit eines Transkripts ohne Insertion und Deletion, das genauso aufgebaut ist wie die bekannte Hamster-cDNA. Das Fehlen der Basen 1292 bis 1414 und der Insertion von 148 Nukleotiden an Position 1591 in einem dritten Transkript wird durch das Erscheinen des 177 Nukleotide langen Fragments gezeigt. Damit konnten alle Sequenzunterschiede zu der publizierten Hamster-cDNA in tatsächlich existierenden Transkripten nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den erwarteten Fragmenten sind noch drei weitere erkennbar (285, 354 und 418 Nukleotide). Da sie bei der Hybridisierung der radioaktiven RNA mit tRNA (Spur 5) nicht zu sehen sind, bedeutet dies, daß neben den identifizierten NF 1/X-Transkriptvarianten noch mindestens drei weitere vorkommen müssen. Die in der PCR-Amplifikation verwendeten Primer fanden in der cDNA-Sequenz dieser Varianten nicht die zu ihnen komplementären Sequenzen. Vielleicht sind diese Bereiche in diesen Transkripten nicht enthalten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mindestens sechs verschiedene NF 1/X-Transkripte sowohl in NIH 3T3- als auch in HC 11-Zellen vorhanden sind. Die Mengen der NF 1/X-Transkriptvarianten in den Zellen sind unterschiedlich: In beiden Zelllinien ist die Variante, von der das 285 Nukleotide lange Fragment stammt, am häufigsten, da dieses Signal das stärkste ist. Von den drei in dieser Arbeit isolierten NF 1/X-Transkriptvarianten ist in beiden Zelllinien das NF 1/X-Transkript 3 häufiger als die NF 1/X-Transkripte 1 und 2.

3.3.3. Isolierung der für das Aminoende der murinen NF 1/X-Proteine kodierenden cDNA

Um die Nukleotidsequenzen, die in der Maus-mRNA für die NF 1/X-Proteine kodieren, vollständig zu isolieren, wurde die Methode der PCR-Amplifizierung von cDNA-Fragmenten ein weiteres Mal durchgeführt. Dazu wurde zunächst wiederum zelluläre mRNA, die aus NIH 3T3-Zellen isoliert worden war, revers transkribiert. Als Startoligonukleotid für die reverse Transkription wurde ein Oligonukleotid verwendet, das die Basensequenz zwischen Base 964 und 990 der Hamster-cDNA in der Orientierung des nicht-kodierenden Strangs enthielt.

Dieser Sequenzbereich ist in den drei PCR-Fragmenten 1, 2 und 3 (Abb. 15b) enthalten und es gibt keine Basenunterschiede zwischen der Maus- und der Hamster-Sequenz.

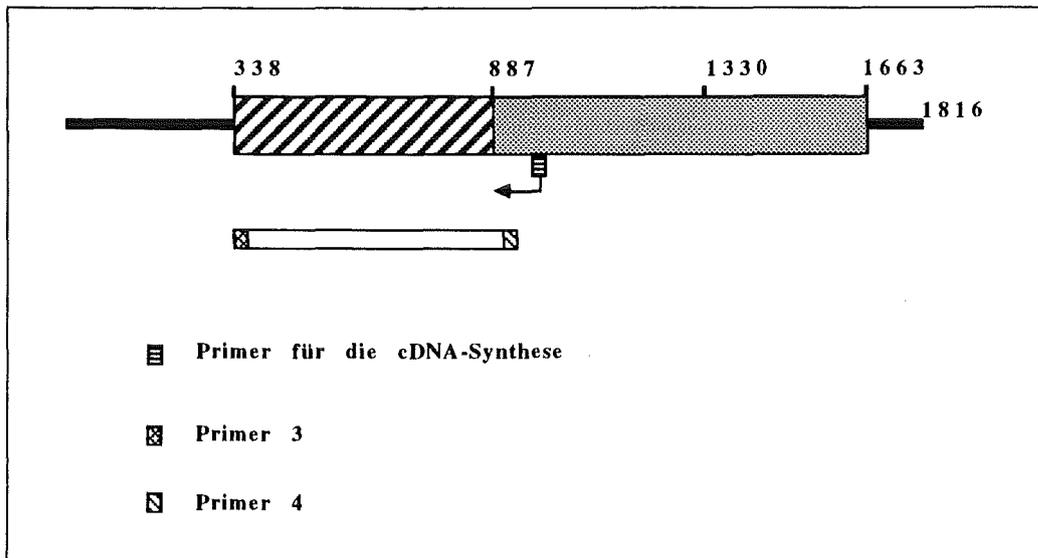


Abb. 18: Darstellung der Lage der, bei der Amplifikation der für die Aminotermini der NF 1/X-Proteine kodierenden Sequenzen verwendeten Primer für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation an der Hamster-cDNA-Sequenz.

Der Pfeil markiert den Start und die Richtung der cDNA-Synthese, der Balken stellt das amplifizierte Fragment dar. Primer 3 entspricht Nucleotid 338 bis 364 des kodierenden Strangs, Primer 4 Nucleotid 922 bis 949 des Gegenstrangs und der Primer für die cDNA-Synthese entspricht Nucleotid 964 bis 990 des Gegenstrangs der Hamster-NF 1/X-cDNA.

Mit der cDNA wurde dann mittels eines weiteren Primerpaars eine PCR-Amplifikation durchgeführt. Primer 3 entspricht den Basen 338 bis 364 der Hamster-cDNA, die für die ersten Aminosäuren des Hamster-NF1/X-Proteins einschließlich des ersten Methionins kodieren. Es wurde aus denselben Überlegungen wie bei der ersten PCR-Amplifikation ein degeneriertes Oligonucleotid verwendet.

Der zweite Primer für die PCR-Amplifikation entspricht den Basen 922 bis 949 des Gegenstrangs des kodierenden cDNA-Strangs der Hamster-cDNA, wie bei dem Primer für die reverse Transkription kodiert dieser Bereich den für das NF1/X-Protein spezifischen Proteinanteil und es gibt keine Unterschiede zwischen Hamster- und Mausequenz (Abb. 18).

Diese PCR-Amplifikation erzeugte ein Fragment, das die erwartete Länge von ca. 600bp aufwies. Es wurde in den Plasmidvektor Bluescript subkloniert und dann sequenziert. Es enthielt die Maus-cDNA-Sequenzen der NF 1/X-Transkripte von

Base 338 bis 937. Einige Basenunterschiede zwischen Maus- und Hamstersequenz waren vorhanden, führten aber in keinem Fall zu der Kodierung für eine andere Aminosäure. Die Amplifikation von nur einem Fragment mit dem verwendeten Primerpaar bedeutet, daß in diesem Bereich der Transkripte vermutlich keine Spleißvorgänge auftreten. Dies ist verständlich, denn es handelt sich um den Bereich der cDNA, die für die DNA-Bindungsdomäne und die Dimerisierungsdomäne der Proteine kodiert. Veränderungen in dieser Region würden die DNA-Bindungsfähigkeit des betroffenen Proteins beeinflussen, diese ist aber die Grundlage für die Funktion als NF 1-(bindendes) Protein.

Die Auswertung der Sequenzierung der aus NIH 3T3- und HC 11-cDNA isolierten NF 1/X-cDNA-Fragmente lieferte die Daten für die folgende Beschreibung der kodierenden Sequenzen der murinen NF 1/X-Transkripte (Abb. 19):

Bis Base 1291 der Hamster-cDNA sind alle murinen und die Hamster-cDNA-Sequenzen, von wenigen Basenaustauschen abgesehen, identisch. Durch die Basenaustausche kommt es zu der Veränderung von lediglich einer Aminosäure in den Mausproteinen: Aminosäure 274 des Hamsterproteins geht in den Mausproteinen von einem Threonin in ein Serin über.

Die Nukleotide 1292 bis 1414 fehlen bei der NF 1/X-Transkriptvariante 3 in der Maus, dies bedeutet, daß die Aminosäuren 319 bis 359 des Hamsterproteins in dem NF 1/X 3-Protein fehlen. Es kommt durch die Deletion der Nukleotidsequenz zu keiner Verschiebung des Leserasters der Proteinsynthese.

Der nächste Unterschied zu der Hamstersequenz tritt bei Nukleotid 1291 auf, wo bei der NF 1/X-Transkriptvariante 1 ein Block von 148 Nukleotiden eingefügt ist. Dies führt zu einem Verschieben des Leserasters, so daß das NF 1/X-Protein 1 nach Aminosäure 418 durch einen eigenen, 70-Aminosäuren-langen, Carboxylrest beendet wird. Durch die Verschiebung des Leserasters verschwindet auch das in der Hamster-cDNA und vermutlich in den murinen Transkriptvarianten 2 und 3 benutzte Stopcodon aus dem Leseraster der Transkriptvariante 1. Sequenzen der NF 1/X-Transkripte der Maus des 3'-nicht-translatierten Bereichs sind zur Zeit nicht isoliert. Die publizierte Hamster-cDNA-Sequenz enthält aber 32 Nukleotide nach dem ersten Stopcodon ein zweites, das in dem bei der Transkriptvariante 1 verwendeten Leseraster ist. Wenn die Maus- und die Hamster-NF 1/X-Transkripte gleich strukturiert sind, dann könnte in der murinen Transkriptvariante 1 dieses zweite Stopcodon verwendet werden und dann würde ein insgesamt 502 Aminosäuren-langes NF 1/X 1-Protein synthetisiert werden.

338	AT GTACTCCCGG TACTGCCTCA CCCAAGATGA GTTCCACCCG TTTCATCGAGG CGCTGCTGCC TCACGTCCGA GCCTTCTCCT ACACCTGGTT CAACCTGCAG GCGCGGAAGC GCAAGTACTT	ha NF1/X
	AT GTACTCGCCT TATTGCTCTA CCCAAGATGA GTTCCACCCG TTTCATCGAGG CGCTGCTGCC TCACGTCCGA GCCTTCTCCT ACACCTGGTT CAACCTGCAG GCGCGGAAGC GCAAGTACTT	m NF1/X1,2,3
	H. .Y..S..P.. Y..C..L..T ..Q..D..E. .F..H..P.. F..I..E..A ..L..L..P. .H..V..R.. A..F..S..Y ..T..W..F. .N..L..Q.. A..R..K..R ..K..Y..F.	ha NF1/X (1-41)
	H. .Y..S..P.. Y..C..L..T ..Q..D..E. .F..H..P.. F..I..E..A ..L..L..P. .H..V..R.. A..F..S..Y ..T..W..F. .N..L..Q.. A..R..K..R ..K..Y..F.	m NF1/X1,2,3
460	CAAGAAGCAC GAGAAGCGGA TGTCAAAGGA TGAGGAGCGC GCGGTGAAGG ACGAGCTGCT GGGCGAGAAG CCTGAGATCA AGCAGAAGTG GGCATCCCGG CTGCTGGCCA AGCTGCGCAA	ha NF1/X
	CAAGAAGCAC GAGAAGCGGA TGTCAAAGGA CGAGGAGCGC GCAGTGAAGG ACGAGCTGCT GGGCGAGAAG CCTGAGATCA AGCAGAAGTG GGCATCCCGG CTGCTGGCCA AGCTGCGCAA	m NF1/X1,2,3
	.K..K..H.. E..K..R..H ..S..K..D. .E..E..R.. A..V..K..D ..E..L..L. .G..E..K.. P..E..I..K ..Q..K..W. .A..S..R.. L..L..A..K ..L..R..K.	ha NF1/X (42-81)
	.K..K..H.. E..K..R..H ..S..K..D. .E..E..R.. A..V..K..D ..E..L..L. .G..E..K.. P..E..I..K ..Q..K..W. .A..S..R.. L..L..A..K ..L..R..K.	m NF1/X1,2,3
580	AGACATCCGG CCTGAGTTCG GAGAGGACTT CGTGCTGACC ATCACCGGCA AGAAGCCCCC CTGCTGCGTG CTCTCCAACC CCGACCAGAA GGGCAAGATC CGGCGGATTG ACTGCTGGCG	ha NF1/X
	AGACATCCGG CCGGAGTTCG GCGAGGACTT TGTGCTAACC ATCACCGGCA AGAAGCCCCC CTGCTGCGTG CTCTCCAACC CCGACCAGAA GGGCAAGATC CGGCGGATTG ACTGCTGGCG	m NF1/X1,2,3
	.D..I..R.. P..E..F..R ..E..D..F. .V..L..T.. I..T..G..K ..K..P..P. .C..C..V.. L..S..N..P ..D..Q..K. .G..K..I.. R..R..I..D ..C..L..R.	ha NF1/X (82-121)
	.D..I..R.. P..E..F..R ..E..D..F. .V..L..T.. I..T..G..K ..K..P..P. .C..C..V.. L..S..N..P ..D..Q..K. .G..K..I.. R..R..I..D ..C..L..R.	m NF1/X1,2,3
700	CCAGGCTGAC AAGGTGTGGC GGCTGGACCT GGTCAATGGT ATTTTGTGTTA AGGGATGCC CTGTGAAAGT ACTGACGGGG AGCGGCTCTA CAAGTCCGCC CAGTGTCTGA ACCCCGGCCT	ha NF1/X
	CCAGGCTGAC AAGGTGTGGC GGCTGGACCT GGTCAATGGT ATTTTGTGTTA AGGGATGCC TTGTGAAAGT ACTGATGGGG AGCGGCTCTA CAAGTCCGCC CAGTGTCTGA ACCCCGGCCT	m NF1/X1,2,3
	.Q..A..D.. K..V..W..R ..L..D..L. .V..H..V.. I..L..F..K ..G..I..P. .L..E..S.. T..D..G..E ..R..L..Y. .K..S..P.. Q..C..S..N ..P..Q..L.	ha NF1/X (122-161)
	.Q..A..D.. K..V..W..R ..L..D..L. .V..H..V.. I..L..F..K ..G..I..P. .L..E..S.. T..D..G..E ..R..L..Y. .K..S..P.. Q..C..S..N ..P..Q..L.	m NF1/X1,2,3
820	GTGCTCCAG CCACATCACA TGGAGTCAAC AATCAAGAA CTGGACCTTT ATCTGGCTTA CTTTGTCCAC ACTCCGGAAT CCGGACAATC AGATAGITCA AACCAGCAAG GAGATCCGGA	ha NF1/X
	GTGCTCCAG CCACATCACA TGGAGTCAAC AATCAAGAA CTGGACCTTT ATCTGGCTTA CTTTGTCCAC ACTCCGGAAT CCGGACAATC AGATAGITCA AACCAGCAAG GAGATCCGGA	m NF1/X1,2,3
	.C..V..Q.. P..H..H..I ..G..V..T. .I..K..E.. L..D..L..Y ..L..A..Y. .F..V..H.. T..P..E..S ..G..Q..S. .D..S..S.. N..Q..Q..G ..D..A..D.	ha NF1/X (162-201)
	.C..V..Q.. P..H..H..I ..G..V..T. .I..K..E.. L..D..L..Y ..L..A..Y. .F..V..H.. T..P..E..S ..G..Q..S. .D..S..S.. N..Q..Q..G ..D..A..D.	m NF1/X1,2,3
940	CATCAAACCA CTGCCCAATG GACACTTAAG TTTCAGGACC TGCTTTGTGA CTTCCGGGGT CTGGAATGTG ACAGAGCTGG TGAGAGTATC ACAGACTCCT GTTGGCACTG CATCAGGGCC	ha NF1/X
	CATCAAACCA CTGCCCAATG GACACTTAAG TTTCAGGACC TGCTTTGTGA CTTCCGGGGT CTGGAATGTG ACAGAGCTGG TGAGAGTATC ACAGACTCCT GTTGGCACTG CATCAGGGCC	m NF1/X1,2,3
	.I..K..P.. L..P..N..G ..H..L..S. .F..Q..D.. C..F..V..T ..S..G..V. .W..N..V.. T..E..L..V ..R..V..S. .Q..T..P.. V..A..T..A ..S..G..P.	ha NF1/X (202-241)
	.I..K..P.. L..P..N..G ..H..L..S. .F..Q..D.. C..F..V..T ..S..G..V. .W..N..V.. T..E..L..V ..R..V..S. .Q..T..P.. V..A..T..A ..S..G..P.	m NF1/X1,2,3
1060	CAACTTCTCG CTGGCAGACC TGGAAAGCCC CAGTTACTAC AACATAAACC AAGTGACCCT GGGAGCGCGG TCCATCACTT CCCCTCCTTC CACCAGCACC ACCAAGCGCC CCAAGTCCAT	ha NF1/X
	CAACTTCTCA CTGGCGGACC TGGAGAGCCC CAGCTACTAC AACATAAATC AAGTGACCCT GGGAGCGCGG TCCATCACTT CCCCTCCTTC CACCAGCACC ACCAAGCGCC CCAAGTCCAT	m NF1/X1,2,3
	.N..F..S.. L..A..D..L ..E..S..P. .S..Y..Y.. N..I..N..Q ..V..T..L. .G..R..R.. S..I..T..S ..P..P..S. .T..S..T.. T..K..R..P ..K..S..I.	ha NF1/X (242-281)
	.N..F..S.. L..A..D..L ..E..S..P. .S..Y..Y.. N..I..N..Q ..V..T..L. .G..R..R.. S..I..T..S ..P..P..S. .T..S..T.. T..K..R..P ..K..S..I.	m NF1/X1,2,3
1180	CGATGACAGC GAGATGGAGA GCCCAAGTGA TGACGTGTTC TATCCTGGGA CAGGCCGCTC CCCAGCAGCT GGCAGCAGCC AGTGGAGTGG ATGGCCCAAT GACGTGGATG CAGGCCCTGC	ha NF1/X
	CGACGACAGT GAGATGGAGA GTCCAGTAGA TGATGTGTTC TATCCTGGGA CAGGCCGCTC TCCGGCCGCT GGCAGCAGCC AGTCTAGCGG ATGGCCCAAT GACGTGGATG CAGGCCCTGC	m NF1/X1
	-----	m NF1/X2
	-----	m NF1/X3
	.D..D..S.. E..H..E..S ..P..V..D. .D..V..F.. Y..P..G..T ..G..R..S. .P..A..A.. G..S..S..Q ..S..S..G. .W..P..N.. D..V..D..A ..G..P..A.	ha NF1/X (282-321)
	.D..D..S.. E..H..E..S ..P..V..D. .D..V..F.. Y..P..G..T ..G..R..S. .P..A..A.. G..S..S..Q ..S..S..G. .W..P..N.. D..V..D..A ..G..P..A.	m NF1/X1
	.D..D..S.. E..H..E..S ..P..V..D. .D..V..F.. Y..P..G..T ..G..R..S. .P..A..A.. G..S..S..Q ..S..S..G. .W..P..N.. D..V..D..A ..G..P..A.	m NF1/X2
	.D..D..S.. E..H..E..S ..P..V..D. .D..V..F.. Y..P..G..T ..G..R..S. .P..A..A.. G..S..S..Q ..S..S..G. .W..P..N.. D..V..D..A ..G..P..A.	m NF1/X3

1300	TTCTCTAAAG AAGTCAGGAA AACTGGACTT CTGCAGCGCC CTCTCCTCTC AGGGCAGCTC CCCACGCGATG GCTTTCACCC ACCACCCGCT GCCTGTGCTT GCTGGAGTCA GACCAGGGAG	ha NF1/X	
	TTCTCTAAAG AAGTCAGGAA AGCTGGACTT CTGCAGCGCC CTCTCCTCTC AGGGCAGCTC CCCACGCGATG GCTTTCACCC ACCACCCGCT GCCTGTGCTT GCTGGAGTCA GACCAGGGAG	m NF1/X1	
	-----	m NF1/X2	
	//////////	m NF1/X3	
	.S..L..K.. K..S..G..K..L..D..F..C..S..A..L..S..S..Q..G..S..S..P..R..H..A..F..T..H..H..P..L..P..V..L..A..G..V..R..P..G..S..	ha NF1/X (322-361)	
	.S..L..K.. K..S..G..K..L..D..F..C..S..A..L..S..S..Q..G..S..S..P..R..H..A..F..T..H..H..P..L..P..V..L..A..G..V..R..P..G..S..	m NF1/X1	
	.S..L..K.. K..S..G..K..L..D..F..C..S..A..L..S..S..Q..G..S..S..P..R..H..A..F..T..H..H..P..L..P..V..L..A..G..V..R..P..G..S..	m NF1/X2	
	//////////	m NF1/X3	
1420	CCCCGGGCC ACAGCATCCG CCTGTCACTT CCCCTCCAGC TCATCATCTC AGCAGTCCAG CCGGTACTTT ACACACCCGA CCATCCGCTA CCACCCACAC CACGGGCAGG ACTCCCTGAA	ha NF1/X	
	CCCCGGGCC ACGGCATCAG CGTGTCACTT CCTTCCAGC TCATCATCTC AGCAGTCCAG CCGGTACTTT ACACACCCAA CCATCCGCTA CCACCCACAC CATGGGCAGG ACTCGCTGAA	m NF1/X1	
	-----	m NF1/X2	
	-----	m NF1/X3	
	.P..R..A..F..A..S..A..L..H..F..P..S..T..S..I..I..Q..Q..S..S..P..Y..F..T..H..P..T..I..R..Y..H..H..H..N..G..Q..D..S..L..K..	ha NF1/X (362-401)	
	.P..R..A..F..A..S..A..L..H..F..P..S..T..S..I..I..Q..Q..S..S..P..Y..F..T..H..P..T..I..R..Y..H..H..H..N..G..Q..D..S..L..K..	m NF1/X1	
	.P..R..A..F..A..S..A..L..H..F..P..S..T..S..I..I..Q..Q..S..S..P..Y..F..T..H..P..T..I..R..Y..H..H..H..N..G..Q..D..S..L..K..	m NF1/X2	
	.P..R..A..F..A..S..A..L..H..F..P..S..T..S..I..I..Q..Q..S..S..P..Y..F..T..H..P..T..I..R..Y..H..H..H..N..G..Q..D..S..L..K..	m NF1/X3	
1540	GGAGTTTGTG CAGTTTGTGT GCTCTGACGG CTCGGGTCAG GCCACTGGAC AG//////////	ha NF1/X	
	GGAGTTTGTG CAGTTTGTGT GCTCTGACGG CTCGGGTCAG GCCACCGGAC AGCCCAACGG TAGCGGCCAG GGCAAAAGTCC CGGGGTCAAT TTTCGCTACCG CCGCCGCTC CAGTGGCCAG	m NF1/X1	
	-----	m NF1/X2	
	-----	m NF1/X3	
	.E..F..V..Q..F..V..C..S..D..G..S..G..Q..A..T..G..Q..//////////	ha NF1/X (402-418)	
	.E..F..V..Q..F..V..C..S..D..G..S..G..Q..A..T..G..Q..P..N..G..S..G..Q..G..K..V..P..G..S..F..L..L..P..P..P..P..V..A..R..	m NF1/X1	
	.E..F..V..Q..F..V..C..S..D..G..S..G..Q..A..T..G..Q..//////////	m NF1/X2	
	.E..F..V..Q..F..V..C..S..D..G..S..G..Q..A..T..G..Q..//////////	m NF1/X3	
	//////////	ha NF1/X	
	ACCTGTGCC CTCTCTATGC CTGATCCAA AACCCACGAC ACGGCCCGAC ACGGCCCGCC CTGACTCTT CCATCACCTT CATTCACAAC GACAGGGGCC TCCTCTGCCA ACCGGTTTGT	m NF1/X1	
	-----	m NF1/X2	
	-----	m NF1/X3	
	//////////	ha NF1/X (419-432)	
	.P..V..P..L..P..H..P..D..S..K..T..T..S..T..A..P..D..G..A..A..L..T..P..P..S..P..S..F..T..T..T..G..A..S..S..A..N..R..F..V..	m NF1/X1	
	//////////	m NF1/X2	
	//////////	m NF1/X3	
1632	CGGCATCGGA CCCCCGGACG GCA	ha NF1/X	1654
	CGGCATCGGA CCCCCGGACG GCA	m NF1/X1	
	---C-----C---	m NF1/X2	
	-----T-----T-----	m NF1/X3	
	.A..S..D..P..G..T..A..	ha NF1/X (433-439)	
	.G..I..G..P..R..D..G..	m NF1/X1	
	.A..S..D..P..G..T..A..	m NF1/X2	
	.A..S..D..P..G..T..A..	m NF1/X3	

Abb.19: Die murinen NF1/X-Transkripte (mNF 1/X 1, 2, 3): kodierende Nukleotidsequenz und deren Übersetzung in Aminosäuresequenzen im Vergleich zu dem Hamster-NF 1/X-Transkript und -Protein (haNF 1/X).

Basenübereinstimmungen sind durch das Zeichen "-" markiert, das Fehlen von Nukleotiden und Aminosäuren durch das Zeichen "/". Unterschiede zwischen Maus- und Hamsternukleotidsequenz sind markiert, daraus resultierende Aminosäureaustausche sind durch eine Einkreisung der betroffenen Aminosäure angezeigt.

Die Nummerierung der Nukleotidsequenz ist für die haNF 1/X-Sequenz angegeben, die Nummerierung der Aminosäuresequenz für das Hamster-NF 1/X-Protein (rechts, in Klammern).

Das haNF 1/X-Protein endet nicht mit Aminosäure 439, sondern besitzt noch zwei weitere Aminosäuren. Diese fehlen in der Mausequenz aufgrund der Auswahl der Primer für die Amplifikation.

Die murinen Proteine NF 1/X 2 und NF 1/X 3 sind auch nach Aminosäure 418 bis zum Ende der Proteine von dem Austausch der Aminosäure 429 (ein Alanin in der Hamstersequenz, ein Threonin in der Mausequenz) identisch mit dem Hamster-NF 1/X-Protein. Bei dem Hamster-NF 1/X-Protein folgen auf Aminosäure 439 noch zwei weitere Aminosäuren, die nicht gezeigt sind. Die murinen NF 1/X-cDNA-Klone enthalten die für diese beiden Aminosäuren kodierenden Nukleotide nicht, da die Auswahl des Primers 2 (Abb. 14a) das Fehlen dieser Nukleotide zur Folge hatte.

(Die Häufung der Abweichungen der Maus-Nukleotidsequenz von der Hamster-Nukleotidsequenz am Anfang und am Ende der gezeigten Sequenz beruht auf der Verwendung der degenerierten Oligonukleotide bei der Amplifikation durch die PCR.)

Somit liegen die kodierenden Sequenzen dreier bisher nicht bekannter muriner NF 1/X-cDNA-Klone vor. Sie werden der Nomenklatur entsprechend mit mNF 1/X 1, 2 und 3 bezeichnet. Die Expression dieser Transkriptvarianten wurde in NIH 3T3- und HC 11-Zellen nachgewiesen. Die dazu angewendete RNase-Protektionsanalyse weist auf die Existenz von noch drei weiteren NF 1/X-Transkriptvarianten hin.

Generell ist die große Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen zwischen Hamster- und Maus-cDNA bemerkenswert, von ca. 1300 Nukleotiden sind nur 60 unterschiedlich, was eine Übereinstimmung von 95% bedeutet. Nur zwei der 60 Nukleotidunterschiede führen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz der Maus-Proteine. Beide betroffenen Aminosäuren (Nr. 274 und 429) sind nicht in der die DNA-Bindungsdomäne der NF 1/X-Proteine enthaltenden konservierten Domäne (Aminosäure 1 bis 189) enthalten.

Sequenzunterschiede der NF 1/X-Proteine 1, 2 und 3 zwischen Fibroblasten- und Mammaepithelzellproteinen wurden nicht gefunden. Alle NF 1/X-Transkriptvarianten werden in einer vergleichbaren Menge in beiden Zelltypen exprimiert. Hinweise auf eine mammaepithelzellspezifisch vorkommende NF 1/X-Proteinvariante liegen somit nicht vor.

3.3.4. Funktionsanalyse der mNF1/X-Proteinvarianten

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die NF1/X-cDNA-Varianten für Transkriptionsfaktoren kodieren, und wenn ja, ob sich die Proteine in ihren Transaktivierungseigenschaften unterscheiden. Dazu wurden Fusionsproteine aus Subfragmenten der NF1/X-Varianten und der DNA-Bindungsdomäne des nur in Hefe vorkommenden Transkriptionsfaktors GAL4 hergestellt.

Die Fusionsproteine setzen sich aus den 147 aminoterminalen Aminosäuren des GAL4-Proteins, die dessen DNA-Bindungsdomäne enthalten (Keegan et al., 1986) und NF1/X-Proteinsubfragmenten zusammen. Die NF1/X-Proteinsubfragmente enthalten neben wenigen Aminosäuren der konservierten Domäne der NF1-Proteine die gesamten carboxyterminalen Hälften der NF1/X-Proteinvarianten. In diesen Proteinanteilen sind die Transaktivierungsdomänen der bisher schon funktionsanalytisch untersuchten NF1-Proteine enthalten (Mermod et al., 1989).

Diese Fusionsproteine (GAL4-NF1/X 1, 2 oder 3) wurden unter der Kontrolle des Promotors des Rous Sarkoma Virus, der in sehr vielen verschiedenen Zelltypen konstitutiv aktiv ist, in NIH 3T3- und HC 11-Zellen exprimiert.

Wenn der die GAL4-Fusionsproteine exprimierende Expressionsvektor in eine Zelle transfiziert wird, wird das Fusionsprotein synthetisiert werden. Um die Funktion dieses Proteins nachzuweisen wird ein GAL4-Reporterplasmid cotransfiziert. Das verwendete Reporterplasmid (17M X2 TK CAT) enthält das bakterielle Gen Chloramphenicol-Acetyltransferase, das unter der Kontrolle eines künstlich zusammengesetzten Promotors exprimiert wird. Der Promotor besteht aus der TATA-Box, an die die basalen Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II binden, zwei aneinander gekoppelten GAL4-Bindungssequenzen (Giniger et al., 1985) und, eingesetzt zwischen den GAL4-Bindungsstellen und der TATA-Box, den Promotorsequenzen des Thymidinkinase-Gens des Herpes simplex Virus (HSV tk). Das GAL4-NF1/X-Fusionsprotein bindet über seinen GAL4-Anteil an die GAL4-Bindungssequenz des Reporterplasmids und aktiviert die Transkription vorausgesetzt, der NF1/X-Anteil des Fusionsproteins besitzt Transaktivierungseigenschaften. Dann wird das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase synthetisiert, dessen Aktivität in einem Enzymtest nachgewiesen wird.

Wenn das Reporterplasmid 17M X2 TK CAT alleine, ohne einen, das Fusionskonstrukt enthaltenden Expressionsvektor in NIH 3T3- und HC 11-Zellen

transfiziert wurde, wurde eine geringe Menge an Chloramphenicol-Acetyltransferase synthetisiert, ohne daß der Promotor durch GAL4-Fusionsproteine aktiviert worden war (Abb. 20: Spuren 1, 6).

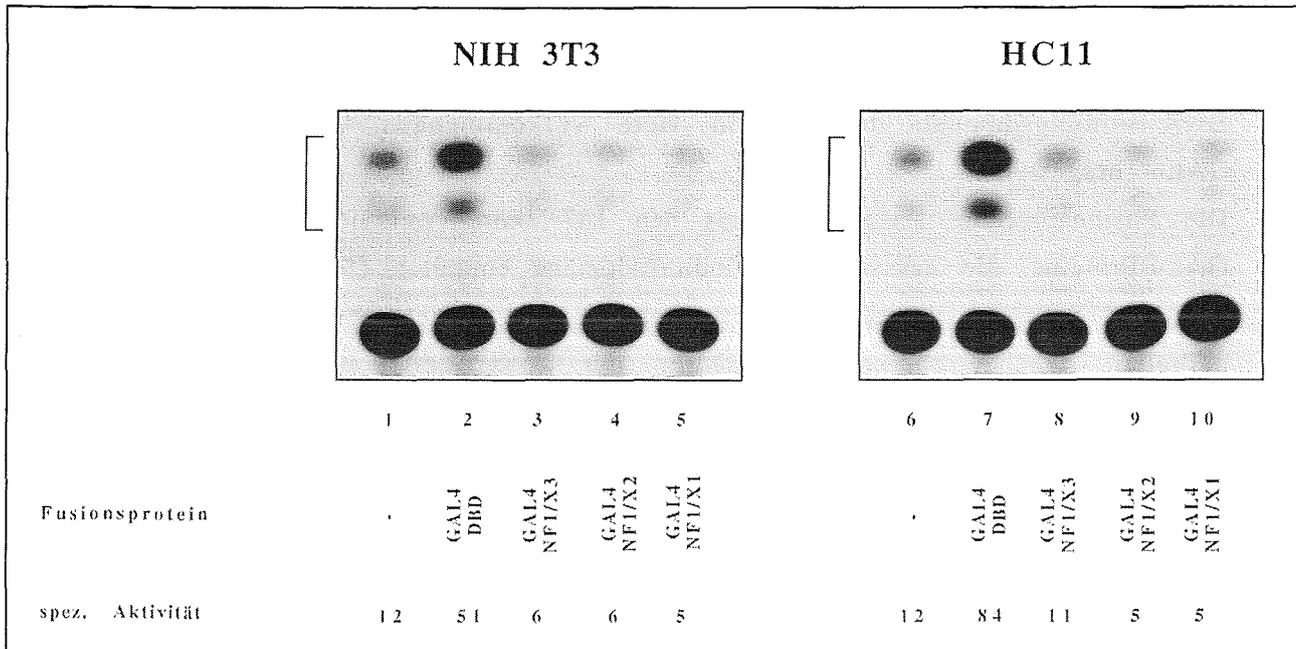


Abb. 20: Expression von GAL4-NF 1/X-Fusionsproteinen in NIH 3T3- und HC 11-Zellen. Je 10µg des angegebenen GAL4-Fusionsprotein-Expressionsvektors und 4µg des GAL4-Reporterplasmids 17M X2 TK CAT wurden transfiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, Zellextrakte hergestellt und die darin enthaltene Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase gemessen. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme der zur Trennung der Acetylierungsprodukte des Chloramphenicols verwendeten Dünnschichtchromatographieplatten. Die Klammer markiert die beiden Acetylierungsprodukte des Chloramphenicols. Die spezifische Aktivität gibt die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase in p mol umgesetztem Chloramphenicol pro Stunde und pro µg Zellextraktprotein an.

Wurde nur die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Proteins in den Zellen exprimiert, so stieg die Umsetzung des Chloramphenicols leicht an (Abb. 20: Spuren 2, 7). Durch die Expression der GAL4-NF 1/X-Fusionsproteine in den Zellen nahm die Umsetzung des Chloramphenicols dagegen ab auf ein Maß, das sogar leicht unter dem lag, das erhalten wurde, wenn das Reporterplasmid ohne einen GAL4-NF 1/X-Fusionsprotein-Expressionsvektor transfiziert wurde (Abb. 20: vgl. Spur 1 mit Spuren 3 bis 5 und Spur 6 mit Spuren 8 bis 10). Die Aktivitäten der drei GAL4-Fusionsproteine in NIH 3T3- (Abb. 20: Spuren 1 bis 5) und HC 11-Zellen (Abb. 20: Spuren 6 bis 10) unterscheiden sich weder zwischen den Proteinen noch zwischen den Zelltypen.

Es könnte sein, daß die Aktivität des Promotors des GAL4-Reporterplasmids deshalb nach der Expression der GAL4-NF1/X-Fusionsproteine in den Zellen nicht zunahm, weil diese Proteine nicht synthetisiert werden.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde ein weiterer experimenteller Ansatz gewählt: Durch den Nachweis der Verdrängung eines anderen GAL4-Fusionsproteins durch die GAL4-NF1/X-Fusionsproteine von der GAL4-Bindungsstelle des Reporterplasmidpromotors soll die Existenz der GAL4-NF1/X-Fusionsproteine in den Zellen bewiesen werden. Dazu wurde ein GAL4-p65-Fusionsprotein in den Zellen exprimiert. Das verwendete GAL4-p65-Fusionsprotein besteht aus den 147 Aminosäuren, die die GAL4-DNA-Bindungsdomäne enthalten und den Aminosäuren 286 bis 550 des Transkriptionsfaktors p65, die dessen Transaktivierungsdomäne enthalten (Schmitz und Bäuerle, 1991). Das GAL4-p65-Fusionsprotein erhöht die Aktivität des Promotors eines GAL4-Reporterplasmids deutlich: in NIH3T3-Zellen wird durch die Expression des GAL4-p65-Fusionsproteins die CAT-Enzymaktivität um einen Faktor 58 und in HC11-Zellen um einen Faktor 90 verstärkt (Abb. 21: Spuren 2, 12). Die Aktivität des Promotors des Reporterplasmids alleine ist in diesem Experiment niedriger als in dem letzten, weil ein GAL4-Reporterplasmid verwendet wurde, dessen Promotor nur aus GAL4-Bindungsstellen und der TATA-Box bestand (GAL4-Reporter).

Wenn nun die GAL4-NF1/X-Fusionsproteine in den Zellen synthetisiert werden, so sollten sie in der Lage sein, die Aktivität des durch das GAL4-p65-Fusionsprotein aktivierten Promotors zu senken. Dies erfolgt primär durch die Verdrängung des GAL4-p65-Fusionsproteins von der GAL4-Bindungssequenz wodurch dieses den Promotor nicht länger aktivieren kann, sekundär auch durch etwaige reprimierende Eigenschaften des GAL4-NF1/X-Fusionsproteins. Auch die isolierte GAL4-DNA-Bindungsdomäne senkt die Aktivität des durch das GAL4-p65-Fusionsprotein aktivierten Promotors, da sie an die GAL4-Bindungsstelle bindet und nicht transaktiviert (siehe Abb. 21: Spuren 3, 4 und 13, 14, es wurden ein 10- und ein 20-facher Überschuß des GAL4-DNA-Bindungsdomänen-Expressionsvektors über den GAL4-p65-Expressionsvektor eingesetzt). In diesem Experiment verhielten sich die GAL4-NF1/X-Fusionsproteine wie die isolierte GAL4-DNA-Bindungsdomäne, auch sie verminderten die Aktivität des Promotors wenn ein 10-facher (Abb. 21: Spuren 5, 7, 9, 15, 17 und 19) und stärker, wenn ein 20-facher Überschuß des GAL4-NF1/X-Expressionsvektors eingesetzt wurde (Abb. 21: Spuren 6, 8, 10, 16, 18 und 20). Dieses Experiment zeigt, daß die Fusionsproteine in den Zellen synthetisiert

werden und diese an die GAL4-Bindungssequenz binden. Also sind mindestens die GAL4-Anteile der Proteine in der Zelle vorhanden.

In dem vorherigen Experiment (Abb. 20) unterschied sich jedoch die Aktivität, die von den GAL4-NF1/X-Fusionsproteinen ausging von der Aktivität der isolierten GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Letztere aktivierte den Promotor des Reporterplasmids leicht, während die GAL4-NF1/X-Fusionsproteine eine hemmende Aktivität aufwiesen. Also werden die GAL4-NF1/X-Fusionsproteine in beiden Zelltypen synthetisiert und haben eine die Transaktivierung reprimierende Aktivität. Diese ist im Vergleich der drei NF1/X-Proteinvarianten bei dem GAL4-NF1/X1-Fusionsprotein etwas größer als bei den anderen beiden Fusionsproteinen, tritt aber in beiden Zelltypen gleichartig auf.

Der Nachweis der reprimierenden Eigenschaften der GAL4-NF1/X-Fusionsproteine stellt die NF1/X-Proteine den transaktivierenden NF1-Proteinen gegenüber. Vermutungen, daß NF1-Proteine nicht nur transaktivierende sondern auch transreprimierende Eigenschaften besitzen, gibt es bereits seit längerem (Paonessa et al., 1988, Santoro et al., 1988, Inoue et al., 1990). Die NF1/X-Proteine sind aufgrund der transreprimierenden Eigenschaften der GAL4-NF1/X-Fusionsproteine sehr gute Kandidaten für diese Transrepressoren. Die Wahrscheinlichkeit, daß die GAL4-NF1/X-Fusionsproteine die Aktivität der vollständigen NF1/X-Proteine zeigen, ist sehr groß, weil die meisten der bisher konstruierten GAL4-Fusionsproteine die Transaktivierungseigenschaften der untersuchten Transkriptionsfaktoren behielten (z.B. Sadowski et al., 1988, Tanese et al., 1991, Schmitz und Bäuerle, 1991, Lemaigre et al., 1993).

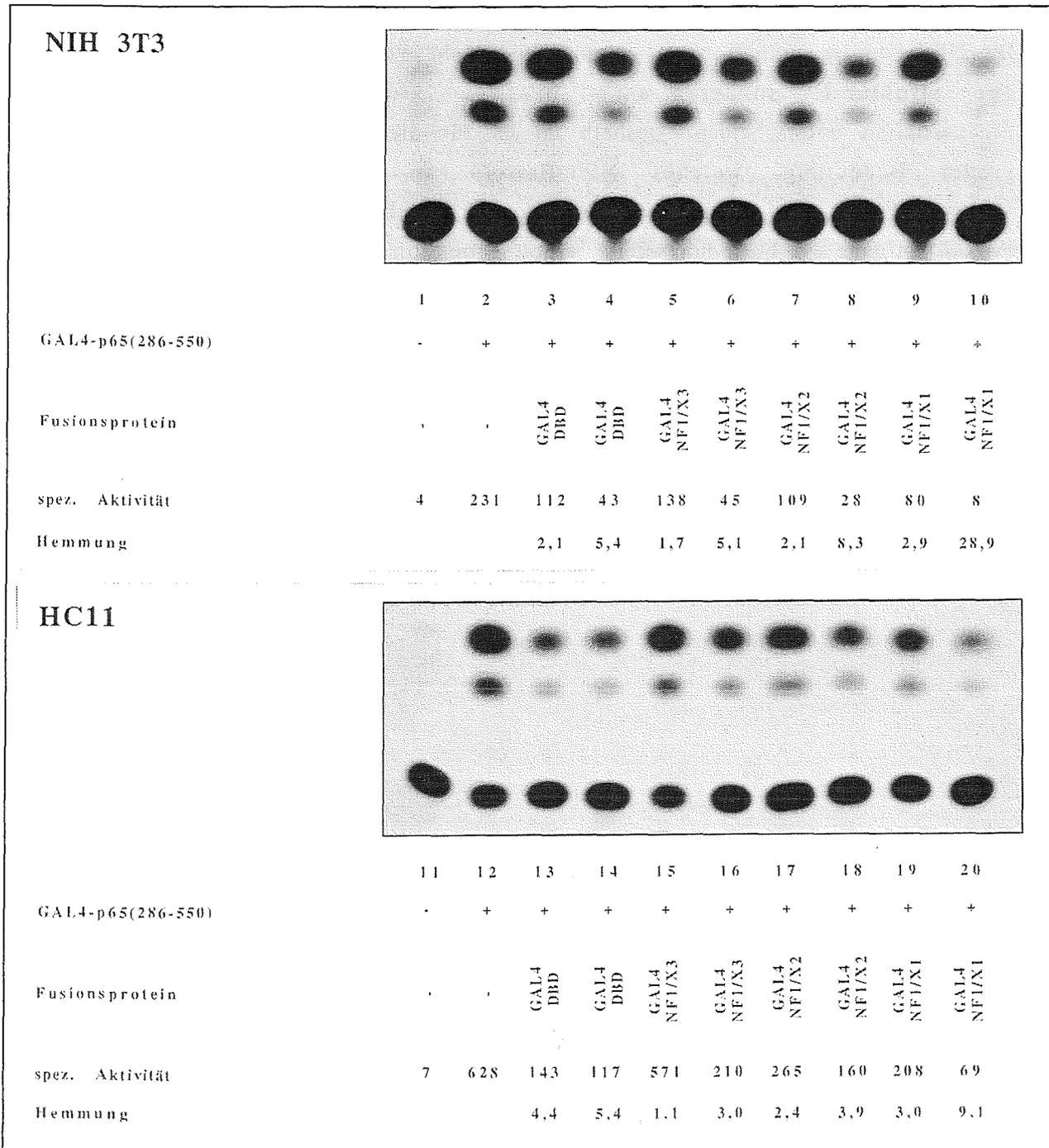


Abb. 21: Hemmung der GAL4-p65-vermittelten Transaktivierung eines GAL4-Promotors durch GAL4-NF 1/X-Fusionsproteine.

NIH 3T3- und HC 11-Zellen wurden mit 0,5µg des GAL4-p65-Fusionsprotein-Expressionsvektors (RSV GAL4 p65 (286-550)), 4µg des GAL4-Reporterplasmids (GAL4-Reporter) und 5 (Spur 3, 5, 7, 9, 13, 15, 17, 19) bzw. 10µg (4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20) der GAL4-Fusionsprotein-Expressionsvektoren (RSV GAL4 und RSV GAL4-NF 1/X 1, 2, 3) in der angegebenen Weise transfiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt und die darin enthaltene Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase gemessen. Die Abbildung zeigt Autoradiogramme der zur Trennung der Acetylierungsprodukte des Chloramphenicols verwendeten Dünnschichtchromatographieplatten.

Die spezifische Aktivität gibt die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase in pmol umgesetzt Chloramphenicol pro Stunde und pro µg Zellextraktprotein an. Die Hemmung beschreibt die Reduktion der p65-vermittelten Transaktivierung durch die Expression der GAL4-NF 1/X-Fusionsproteine.

Die NF1-Familie enthält somit eine große Zahl von Proteinen, die sich nicht nur strukturell sondern auch in den grundlegenden funktionellen Eigenschaften unterscheiden. Deshalb ist es für die Expression eines Gens von großer Bedeutung, welches NF1-Protein an seinen Promotor bindet. Untersuchungen der Frage, wie im Detail entschieden wird, welches NF1-Protein an eine NF1-Bindungsstelle eines Promotors bindet, werden in Zukunft wichtige Impulse für das Verständnis der Vermittlung der Expression von Genen geben können.

4. Diskussion

NF 1-Proteine sind an der Vermittlung der zelltypspezifischen Transkription in Mammaepithelzellen beteiligt (Mink et al., 1992). Zur Zeit gibt es jedoch keinen Hinweis auf die Existenz eines mamepithelzellspezifisch vorkommenden NF 1-Proteins: In Mammaepithelzellen sind zwar mehrere verschiedene NF 1-Proteine vorhanden, ihre Anzahl und Größe unterscheidet sich jedoch nicht von der der NF 1-Proteine aus Fibroblasten. Unter den NF 1-Transkripten und den in dieser Arbeit isolierten NF 1/X-Transkriptvarianten der Zellen ist keine(s) spezifisch nur in einem der beiden Zelltypen vorhanden. Die große Zahl und Variabilität der NF 1-Proteine der Mammaepithelzellen deutet vielmehr darauf hin, daß NF 1-Proteine für jeden Promotor spezifisch ausgewählt werden. Dies schließt die Existenz zelltypspezifisch vorkommender NF 1-Proteine nicht aus, macht sie aber für die Vermittlung der zelltypspezifischen Genexpression auch entbehrlich.

4.1. Die Vielfalt der NF 1-Transkripte der Mammaepithelzellen

Die NF 1-Transkripte der Mammaepithelzellen stammen von vier NF 1-Genen, wobei von zwei NF 1-Genen (NF 1/A und NF 1/C) mehrere verschieden große Transkripte (Unterschiede > 2kb) in den Zellen vorhanden sind.

Die detaillierte Analyse des NF 1/X-Transkripts in dieser Arbeit zeigt, daß die Zahl der NF 1-Transkripte noch weitaus größer ist, als die Northern Blot Analyse vermuten läßt. Hinter der in der Northern Blot Analyse detektierten NF 1/X-Transkriptbande verbirgt sich nicht nur ein einzelnes Transkript, sondern wahrscheinlich sechs unterschiedliche. Die Analyse der Nukleotidsequenz dreier dieser NF 1/X-Transkripte ergab, daß in der 3' gelegenen Hälfte der kodierenden Sequenz der Transkripte, die für den carboxyterminalen Anteil der Proteine kodiert, Blöcke von Nukleotiden herausgeschnitten und eingesetzt werden. Dies könnte auf einem alternativen

Spleißvorgang beruhen, der verschiedene Exons des NF1/X-Gens alternativ zusammensetzt.

Das alternative Spleißen von NF1-Transkripten wurde erstmals von Santoro et al., 1988 vermutet, die drei NF1/CTF-Transkripte der menschlichen HeLa-Zellen untersuchten. Herausgetrennte bzw. eingeschobene Nukleotidblöcke dieser HeLa-Zell-Transkripte decken sich exakt mit Exon-Intron-Grenzen des NF1/C-Gens (Meisterernst et al., 1989). Deshalb entstehen die NF1/CTF-Transkripte vermutlich während eines alternativen Spleißprozesses.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind in jeder NF1-Genklasse unterschiedliche Transkripte beschrieben worden. Die Unterschiede betreffen fast nie die für den Aminoterminus mit der DNA-Bindungsdomäne sondern in der Regel die für die carboxyterminale Hälfte der Proteine kodierenden Abschnitte der Transkripte (NF1/A: Inoue et al., 1990, NF1/B: Sippel, pers. Mitteilung, NF1/C: Santoro et al., 1988, Meisterernst et al., 1988, NF1/X: Apt et al., 1993 und diese Arbeit).

Dies bedeutet, daß es eine Vielzahl von NF1-Transkripten und unterschiedlich strukturierten NF1-Proteinen gibt. Diese sollten sich in ihren funktionellen Eigenschaften unterscheiden, da ansonsten nicht verständlich wäre, warum diese Vielfalt den evolutionären Selektionsprozess überstehen konnte.

4.2. Die funktionellen Eigenschaften der NF1-Proteine

NF1-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und binden als solche sequenzspezifisch an DNA und beeinflussen die Aktivierung der Transkription eines Gens. Beide Eigenschaften, DNA-Bindung und Transaktivierung, werden getrennten Bereichen der NF1-Proteine zugeordnet: Die DNA-Bindungsdomäne wurde in der aminoterminalen Hälfte, die Transaktivierungsdomäne in der carboxyterminalen Hälfte der Proteine lokalisiert (Mermod et al., 1989, Gounari et al., 1990).

In der Fähigkeit sequenzspezifisch an DNA zu binden, unterscheiden sich die NF1-Proteinvarianten wahrscheinlich nicht. Denn alle der bekannten NF1-Proteinvarianten enthalten dieselbe, konservierte, die DNA-Bindung vermittelnde Proteindomäne. Da neben der DNA-Bindung diese Domäne auch die

Dimerisierung der NF1-Proteine ermöglicht, können neben NF1-Homo- auch NF1-Heterodimere entstehen (Sippel, pers. Mitteilung), wodurch sich die Zahl der in einer Zelle möglicherweise gleichzeitig vorhandenen NF1-Proteine (-Dimere) enorm vergrößert.

NF1-Proteine können die Transkription eines Gens aktivieren, denn eine Zerstörung der NF1-Bindungsstelle der Promotoren vieler Gene vermindert deren transkriptionelle Aktivität sehr stark (z.B. Morgan et al., 1987, Mellon et al., 1981, Charnay et al., 1985, Maire et al., 1989, Tamura et al., 1988, Nehls et al., 1991, van Dam et al., 1993, Miksicsek et al., 1987).

Die Existenz von Proteindomänen, die die Transaktivierung eines Promotors vermitteln können wurden für die NF1-Proteine NF1/CTF (Klasse NF1/C), NF1/L und NF1/B2 (beide Klasse NF1/A) nachgewiesen (Mermod et al., 1989, Gounari et al., 1990, Inoue et al., 1990). Im NF1/CTF-Protein wurde die Transaktivierungsdomäne in einem Bereich von ca. 100 Aminosäuren eingegrenzt. In dieser Sequenz sind etwa 25% der Aminosäuren Proline, weshalb man annimmt, daß für die Transaktivierungsdomänen dieser Proteine ein hoher Gehalt an Prolinen charakteristisch ist. Die Aktivität eines Promotors kann aber auch durch eine NF1-Bindungsstelle vermindert werden. Deshalb wird seit längerem vermutet, daß es auch transreprimierende NF1-Proteine geben muß. Das NF1/Red1-Protein (Klasse NF1/B) kann z.B. eine Aktivierung eines Promotors verhindern (Chu et al., 1991). Ein weiteres reprimierendes NF1-Protein ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt, das NF1/X-Protein, weil ein GAL4-NF1/X-Fusionsprotein die basale und induzierte Aktivität eines GAL4-Reporterplasmidpromotors verminderte (Abb. 20 und 21). Transreprimierende Proteindomänen konnten bisher nicht genau definiert werden. DNA-bindende Proteine wie das eve-Protein von Drosophila und das WT1-Protein enthalten Domänen, denen eine reprimierende Aktivität zugeschrieben wird. Diese sind entweder Prolin-reich oder die Aminosäuren Prolin und Glutamin überwiegen (Han und Manley, 1993, Madden et al., 1991). Die Carboxylenden der NF1/X-Proteine haben einen höheren Gehalt an Prolinen als das Aminoende, bei der in dieser Arbeit isolierten Variante NF1/X1 sind zum Beispiel zwischen Aminosäure 419 und 489 16 der 70 Aminosäuren Proline, nur eine davon ist ein Glutamin. Da aber dem Prolinreichtum einer Aminosäuresequenz auch transaktivierende Eigenschaften zugeschrieben werden, müssen zusätzliche, noch nicht identifizierte, Aminosäuren vorhanden sein, die die Art der Aktivität bestimmen.

NF1-Proteine können also sowohl die Aktivierung eines Promotors verstärken als auch vermindern. Durch die Heterodimerisierung von aktivierenden und reprimierenden NF1-Proteinen könnten NF1-Proteindimere gebildet werden, die abgestufte Transaktivierungspotentiale besitzen. Dann entscheidet, welches der NF1-Proteindimere an einen Promotor bindet darüber, wie stark dieser aktiviert wird. Ein NF1-Proteindimer kann also nicht automatisch ein anderes gleichwertig ersetzen. Wie aber wird entschieden, welches NF1-Proteindimer an einen Promotor bindet?

Die strukturellen Grundlagen, auf denen die Auswahl basiert, beruhen sehr wahrscheinlich auf den Unterschieden der Sequenzen des Carboxylendes der NF1-Proteine. Die große Variabilität dieser Sequenz innerhalb der NF1-Familie könnte die Basis für Interaktionen mit vielen anderen Proteinen sein, wodurch die Auswahl der NF1-Proteine bewirkt werden könnte. Die Existenz der Interaktion zwischen NF1-Proteinen und anderen an denselben Promotor bindenden Proteinen würde nicht nur das Problem der promotorspezifischen Rekrutierung der NF1-Proteine sondern auch den Widerspruch zwischen folgenden experimentellen Daten lösen: NF1-Bindungsstellen in Promotoren sind wichtig für deren Aktivität, da eine Zerstörung der NF1-Bindungsstelle die Promotoraktivität meist drastisch vermindert. Andererseits ist eine isolierte NF1-Bindungsstelle oder die alleinige Bindung eines NF1-Proteins an einen Promotor nicht in der Lage eine deutliche Aktivierung des Promotors zu bewirken (Mink et al., 1992, Archer et al., 1992). Wenn NF1-Proteine, um funktionell aktiv zu sein mit anderen an den Promotor bindenden Faktoren interagieren müssen, dann verlieren sie ihr Aktivitätspotential, wenn diese Interaktion nicht stattfinden kann, weil die beteiligten Proteine nicht auch an den Promotor binden.

Für die Existenz der Interaktionen von NF1- und anderen Proteinen spricht auch, daß NF1-Bindungsstellen und Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren (Glucocorticoidrezeptor, AP2 und AP4) die Aktivierung der Transkription kooperativ vermitteln. Neben nicht auszuschließenden indirekten Ursachen, könnte diese Kooperativität auch auf einer direkten Interaktion der an die Bindungsstellen bindenden Proteine beruhen (Strähle et al., 1988, Schüle et al., 1988, Chu et al., 1991).

Somit unterscheiden sich die verschiedenen NF1-Proteine in ihrer Fähigkeit die Transkription zu beeinflussen und die Selektion der Bindung an einen

bestimmten Promotor könnte über Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren erfolgen.

4.3. Die Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression durch NF1-Proteine

Da in den Geweben, in denen NF1-Proteine an der Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression beteiligt sind (Mammadrüse, Leber, Gehirn), mehrere verschiedene NF1-Proteine gleichzeitig vorkommen (Paonessa et al., 1988, Inoue et al., 1990, diese Arbeit), ergeben sich drei Möglichkeiten, wie die Rolle der NF1-Proteine in der Vermittlung der gewebespezifischen Genexpression aussehen könnte:

Neben anderen NF1-Proteinen, könnte jeweils eine NF1-Proteinvariante nur in einem dieser Gewebe vorkommen. Diese müßte an den Promotor eines in dem Gewebe spezifisch exprimierten Gens rekrutiert werden, wobei die Auswahl durch die anderen, ebenfalls an den Promotor bindenden, Proteine bewirkt werden könnte. Die Gewebespezifität der Transkription beruht dann auf dem gewebespezifischen Vorkommen des NF1-Proteins, die Aktivierung des Promotors erfolgt aber durch das Zusammenwirken aller beteiligten Transkriptionsfaktoren (Abb. 22 A.).

In Mammaepithelzellen konnte in der vorliegenden Arbeit kein zelltypspezifisch vorkommendes NF1-Protein identifiziert werden. Versuche anderer Arbeitsgruppen, ein gewebespezifisch vorkommendes NF1-Protein nachzuweisen waren bislang ebenfalls nicht erfolgreich. Paonessa et al., 1988 isolierten aus Rattenleber ein dort angereichertes NF1-Protein, das NF1/L-Protein. Die cDNA dieses Proteins detektierte in Leberzellen mehrere verschieden große NF1/L-Transkripte und alle NF1/L-Transkripte waren, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, in allen untersuchten Geweben vorhanden. Inoue et al., 1990 isolierten aus einer Mauskleinhirn-cDNA-Bank mehrere im kodierenden Bereich fast identische NF1/B-cDNA-Klone. NF1/B-Transkripte wurden jedoch auch in allen anderen untersuchten Geweben nachgewiesen. (Obwohl in beiden Fällen die intakten Gewebe, in denen die

gewebespezifische Genexpression beobachtet wird, verwendet wurden, konnten keine gewebespezifischen NF1-Proteine nachgewiesen werden.)

Somit war es bisher nicht möglich, gewebespezifisch vorkommende NF1-Proteine zu identifizieren. Würden sie tatsächlich existieren, so müßte es sich um sehr geringe Mengen handeln, deren Nachweis technisch sehr schwierig ist.

Wenn NF1-Proteine dagegen nicht gewebespezifisch verteilt sind, könnte die Zelltypspezifität der Aktivität eines Promotors durch andere zelltypspezifisch vorkommende Proteine, die an den Promotor binden, bestimmt werden. Diese könnten dann wiederum nur bestimmte der NF1-Proteine, ohne die der Promotorkomplex nicht aktiv ist, bei der Bildung des Promotorkomplexes zulassen. Dann wären die betreffenden NF1-Proteine, ohne selbst zelltypspezifisch zu sein, dennoch unabdingbar für die zelltypspezifische Aktivität des Promotors. Man könnte sie als promotorspezifisch bezeichnen (Abb. 22 B.). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, daß die zelltypspezifisch aktiven Promotoren oder Enhancerelemente sich aus Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren zusammensetzen. Der leberzellspezifisch aktive Albuminhancer z.B. enthält Bindungsstellen für HNF3 und NF1, HNF3 ist nur in Leberzellen aktiv (Lai et al., 1990). In dem mammaepithelzellspezifischen Enhancerelement des MMTV-Promotors gibt es neben der NF1-Bindungsstelle noch Bindungsstellen für vier weitere DNA-bindende Proteine, die mit einem NF1-Protein interagieren könnten. Diese Proteine (F4, F5, F11 und MAF) sind derzeit noch nicht isoliert.

Im extremsten aus den bisherigen Überlegungen abgeleiteten Fall müßte keines der an der Vermittlung der gewebespezifischen Transkription beteiligten Proteine strikt gewebespezifisch exprimiert werden. Wenn man davon ausgeht, daß zu einer Aktivierung eines Promotors dessen Besetzung mit einer funktionsfähigen Kombination von Proteinen nötig ist, dann würde es zu der Vermittlung der Gewebespezifität der Transkription ausreichen, wenn die Kombination von Proteinen gewebespezifisch vorkommt. Dann wären nur wenige verschiedene Proteine nötig, eine spezifische Expression in den vielen verschiedenen Zelltypen eines Organismus zu gewährleisten, denn über eine variable Kombination relativ weniger Proteine könnte eine ausreichend große Zahl unterschiedlicher Komplexe entstehen. Durch eine geringfügige Veränderung jedes der beteiligten Proteine (z.B. durch ein Fehlen/Vorhandensein von Domänen, eine Modifikation) kann die Zahl der Kombinationsmöglichkeiten noch vergrößert werden (Abb. 22 C.).

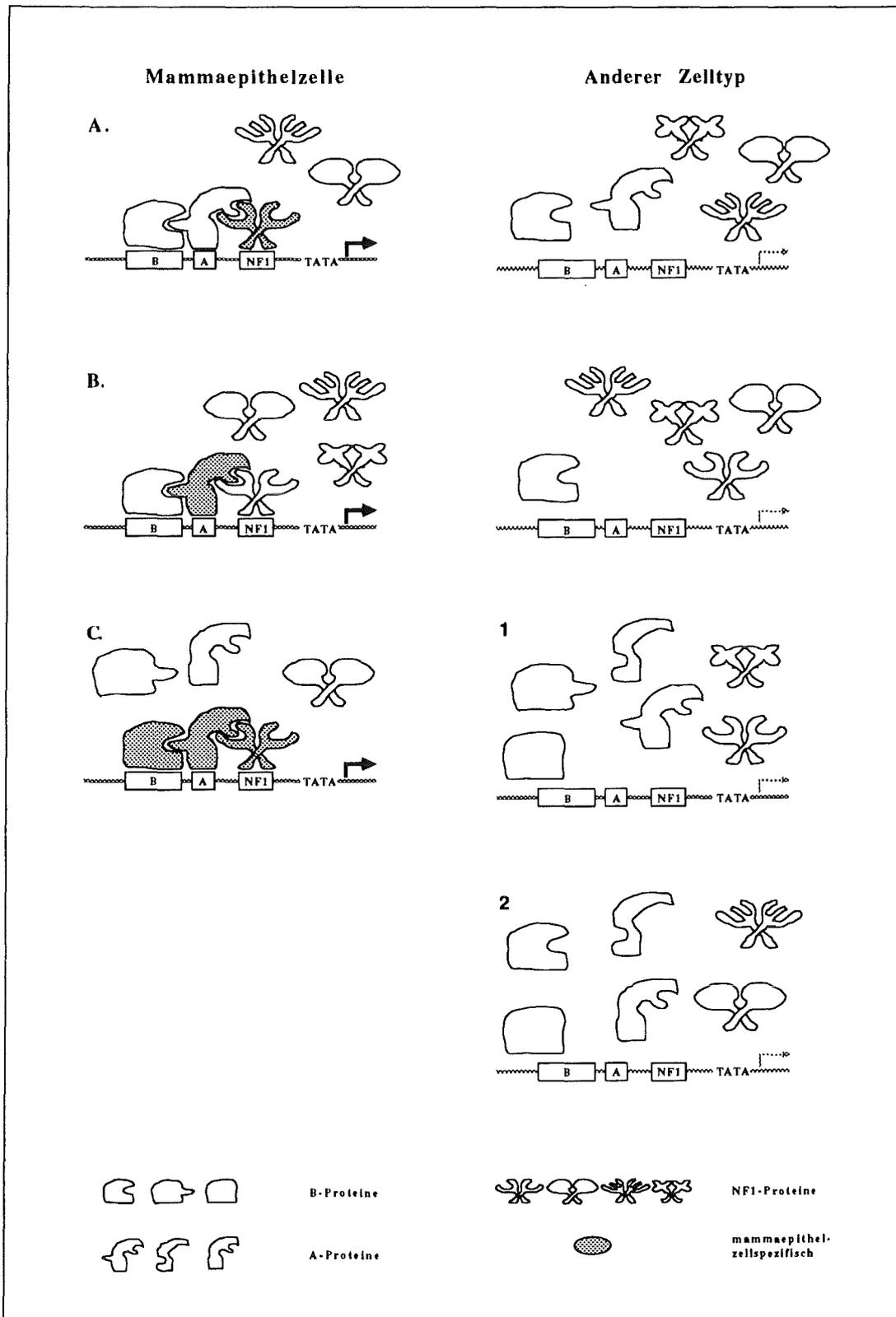


Abb. 22: Graphische Darstellung der Modellvorstellungen, die die Rolle der NF 1-Proteine in der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression beschreiben. In dem imaginären Promotor sind neben einer TATA-Box Bindungsstellen für drei Transkriptionsfaktoren vorhanden (A, B, NF 1), von denen mehrere Proteinformen vorkommen (siehe Legende). Eine Aktivierung des Promotors ist durch einen dick-gezeichneten Pfeil dargestellt.

Allen drei ausgeführten Überlegungen ist gemeinsam, daß ein bestimmtes NF1-Protein an der Vermittlung einer gewebespezifischen Genexpression beteiligt ist. Es wird durch andere Proteine, die an den Promotor binden, ausgewählt. Das NF1-Protein ist nicht unbedingt gewebespezifisch, in jedem Fall aber spezifisch für einen Promotor. Diese Hypothese erklärt die existierende hohe Variabilität der in einer Zelle vorhandenen NF1-Proteine mit der Notwendigkeit für verschiedene Promotoren jeweils passende NF1-Proteine bereitzustellen und basiert auf der Annahme der Existenz von Interaktionen zwischen NF1-Proteinen und anderen DNA-bindenden Proteinen.

Zukünftige Untersuchungen des Mechanismus der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression sollten die Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Proteinen berücksichtigen, denn wenn die Hypothese zutrifft, werden alle im Mammaepithelzell-Enhancerelement identifizierten Bindungsstellen und die daran bindenden Proteine konzentriert zu der gewebespezifischen Aktivierung benötigt. Die Identifikation der beteiligten Proteine kann dann nur durch die auftretenden Protein-Protein-Interaktionen erfolgen.

4.4. Die Beeinflussung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens

Die Untersuchungen der Auswirkungen der Expression des Ha-rasA-Onkogens zeigte, daß dadurch in der Mammaepithelzelllinie RAC311C die Stabilität der NF1-Transkripte C und X auf 1/3 bis 1/5 des Ausgangswerts vermindert wird. (Vermutlich gilt entsprechendes auch für die NF1-Transkripte A und B, da deren Gesamtmenge wie die der NF1/C- und NF1/X-Transkripte in der Zelllinie RAC311C-6E vermindert ist.) Durch die Verminderung der Stabilität der NF1-Transkripte wird die NF1-Bindungsaktivität in den Zellen erniedrigt und die Aktivität von Promotoren, die von dem Transkriptionsfaktor NF1 abhängig ist, wird vermindert.

In Mammaepithelzellen sind die NF1-Proteine wichtig für die gewebespezifische Expression der Milchproteingene, was eine der höchsten Differenzierungsstufen einer Mammaepithelzelle darstellt.

Mammaepithelzellen, die das Ha-rasA-Onkogen exprimieren können nicht vollständig differenzieren und die Milchproteingene exprimieren (Jehn et al., 1992). Möglicherweise enthalten Mammaepithelzellen in verschiedenen Differenzierungsstufen geringere Mengen an NF1-Proteinen, wodurch die mammaepithelzellspezifische Genexpression verhindert wird und die Expression des Ha-rasA-Onkogens fixiert durch eine Verminderung der NF1-Transkriptstabilität solche Differenzierungsschritte in der Zelle.

Das Ha-ras-Protein ist ein membranassoziiertes regulatorisches Protein. Das in dieser Arbeit verwendete Ha-rasA-Onkogen unterscheidet sich von dem Ha-ras-Gen in einer Veränderung eines Codons, wodurch das Ha-rasA-Onkoprotein immer aktiviert ist und seine Aktivität nicht wie die des Ha-ras-Proteins reguliert werden kann.

Das Ha-ras-Protein ist Teil einer Signaltransduktionskette über die Wachstumsfaktoren Zellen beeinflussen. Die Anlagerung des Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor aktiviert das Ha-ras-Protein, wodurch verschiedene intrazelluläre Reaktionen hervorgerufen werden. Dazu gehören z.B. die Aktivierung von Enzymen und die Aktivierung der Transkription von Genen, die dazu den Transkriptionsfaktor AP1 benötigen. Es war aber bisher nicht beschrieben worden, daß die Aktivierung des Ha-ras-Proteins die Stabilität eines Transkripts vermindern kann (Übersichten: Lowy und Willumsen 1993, Marx, 1993, McCormick, 1993).

Die Stabilität eines Transkripts wird, soweit heute bekannt ist, durch verschiedene Sequenzen in dem Transkript selbst bestimmt (Brawerman, 1989, Schiavi et al., 1992). Diese Sequenzen sind Bindungsstellen für RNA-bindende Proteine. Durch die Bindung verschiedener RNA-bindender Proteine wird die RNA für den Abbau durch RNasen markiert oder davor geschützt.

Die Aktivierung des Ha-rasA-Proteins könnte RNA-bindende Proteine über eine Modifikation oder aber deren Neusynthese beeinflussen. Andererseits ist auch denkbar, daß das aktivierte Ha-ras-Protein zelluläre Ribonukleasen beeinflusst. Bindungsstellen RNA-bindender Proteine, durch die die Verringerung der Stabilität der NF1-Transkripte bewirkt werden könnte, sind derzeit nicht bekannt. Ihre Identifizierung ist nicht möglich, da bisher nur ein NF1-Transkript der Maus vollständig isoliert worden ist und Sequenzvergleiche, die Hinweise auf solche Bindungsstellen geben könnten, nicht durchgeführt werden können.

Der Ha-ras-vermittelte Signaltransduktionsweg, der zu der Destabilisierung von NF1-Transkripten führt, könnte in der Mamdrüse Einfluß auf die

mammaepithelzellspezifische Genexpression nehmen. Indirekte Hinweise auf einen solchen Mechanismus ergeben sich aus der Literatur: Der Wachstumsfaktor TGF β wird in der Mamdrüse in großen Mengen synthetisiert, nachdem die Laktation eines Säuglings beendet worden ist (Strange et al., 1992). Dann wird die Mamdrüse zurückgebildet, Mammaepithelzellen produzieren keine Milch mehr. In Epithelzellen aktiviert TGF β das ras-Protein und die Behandlung von Mammaepithelzellen mit TGF β vermindert die transkriptionelle Aktivität eines transient transfizierten MMTV-LTR-Promotors über dessen NF1-Bindungsstelle (Mulder und Morris, 1992, Cato et al., 1990). Neben der ihm zugeschriebenen Hemmung des Wachstums von Epithelzellen könnte der Wachstumsfaktor TGF β durch die Verminderung der NF1-Transkriptstabilität auch die Milchproteingenexpression in Mammaepithelzellen verhindern.

Der Signaltransduktionsweg von der Aktivierung des Ha-ras-Proteins zu der NF1-Transkriptstabilität selbst ist jedoch nicht mammaepithelzellspezifisch, weil auch in NIH 3T3-Fibroblasten die NF1-Transkriptmenge durch die Expression des Ha-rasA-Onkogens vermindert wird. Da das Ha-ras-Protein durch viele Faktoren aktiviert werden kann (Smith et al., 1986, Gibbs et al., 1990, Satoh et al., 1990, Burgering et al., 1991) und NF1-Proteine die Expression vieler Gene beeinflussen, könnte es sich um einen wichtigen generellen Regulationsweg handeln über den Wachstumsfaktoren und Onkogene die Expression von Genen beeinflussen.

Die Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression ist ein komplexer, durch extrazelluläre Faktoren beeinflussbarer Vorgang. Die Rolle der daran beteiligten NF1-Proteine basiert auf Grund der nun verfügbaren Informationen vermutlich auf der Auswahl eines bestimmten NF1-Proteins aus der großen Zahl der gleichzeitig vorhandenen NF1-Proteine durch andere, an der Vermittlung der mammaepithelzellspezifischen Genexpression beteiligte, Transkriptionsfaktoren. Möglicherweise ist dabei der kürzlich identifizierte Faktor MAF von größter Bedeutung, da die Kombination der Bindungsstellen für MAF und NF1-Proteine gerade ausreicht die Mammaepithelzellspezifität der Genexpression zu bestimmen (Mink et al., 1992, Huck, 1993). Die derzeit noch ausstehende Isolierung von MAF wird zeigen können, ob diese Vermutung zutrifft.

5. Literatur

- Angel, P., Allegretto, E.A., Okino, S.T., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T., Karin, M. (1988): Oncogene jun encodes a sequence-specific transactivator similar to AP1. *Nature* **332**, 166-171
- Anzano, M.A., Roberts, A.B., deLarco, J.E., Wakefield, L.M., Assoian, R.K., Roche, N.S., Smith, J.M., Lazarus, J.E., Sporn, M.B. (1985): Increased Secretion of Type β Transforming Growth Factor Accompanies Viral Transformation of Cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 242-247
- Apt, D., Chong, T., Liu, Y., Bernhard, H.U. (1993): Nuclear Factor I and Epithelial Cell-Specific Transcription of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* **67**, 4455-4465
- Archer, T.K., Lefebvre, P., Wolford, R.G., Hager, G.L. (1992): Transcription Factor Loading on the MMTV Promoter: A Bimodal Mechanism for Promoter Activation. *Science* **255**, 1573-1576
- Avvedimento, V.E., Musti, A., Fusco, A., Bonapace, M.J., Di Lauro, R. (1988): Neoplastic transformation inactivates specific trans-acting factor(s) required for the expression of the thyroglobulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1744-1748
- Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., Groner, B. (1988): Prolactin regulation of β -casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* **7**, 2089-2095
- Barberis, A., Superti-Furga, G., Busslinger, M. (1987): Mutually exclusive interaction of the CCAAT binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter. *Cell* **50**, 335-359
- Bargmann, C.I., Hung, M., Weinberg, R.A. (1986): Multiple Independent Activations of the *neu* Oncogene by a Point Mutation Altering the Transmembrane Domain of p185. *Cell* **45**, 649-657
- Brawerman, G. (1989): mRNA Decay: Finding the Right Targets. *Cell* **57**, 9-10
- Burgering, B.M.T., Medema, R.H., Maassen, J.A., van de Wetering, M.L., van der Eb, A., McCormick, F., Bos, J.L. (1991): Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation. *EMBO J.* **10**, 1103-1109
- Cato, A.C.B., Mink, S., Nierlich, B., Ponta, H., Schaap, D., Schuurig, E., Sonnenberg, A. (1990): Transforming growth factor- β represses transcription of the mouse mammary tumour virus DNA in cultured mouse mammary cells. *Oncogene* **5**, 103-110
- Cato, A.C.B., Skroch, P., Weinmann, J., Butkeraitis, P., Ponta, H. (1988): DNA sequences outside the receptor-binding sites differentially modulate the responsiveness of the mouse mammary tumour virus promoter to various steroid hormones. *EMBO J.* **7**, 1403-1410

- Charnay, P., Mellon, P., Maniatis, T. (1985): Linker Scanning Mutagenesis of the 5'-Flanking Region of the Mouse β -Major-Globin Gene: Sequence Requirements for Transcription in Erythroid and Nonerythroid Cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1498-1511
- Chu, H.M., Fischer, W.H., Osborne, T.F., Comb, M.J. (1991): NF-I proteins from brain interact with the proenkephalin cAMP inducible enhancer. *Nucleic Acids Research* **19**, 2721-2728
- Ciardello, F., Kim, N., Hynes, N., Jaggi, R., Redmond, S., Liscia, D.S., Sanfilippo, B., Merlo, G., Callahan, R., Kidwell, W.R., Salomon, D.S. (1988): Induction of Transforming Growth Factor α Expression in Mouse Mammary Epithelial Cells after Transformation with a Point-Mutated c-Ha-ras Protooncogene. *Molecular Endocrinology* **2**, 1202-1216
- Coppola, J.A. & Cole, M.D. (1986): Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment. *Nature* **320**, 760-763
- Costa, R.H., Grayson, D.R., Darnell, J.E. (1989): Multiple Hepatocyte-Enriched Nuclear Factors Function in the Regulation of Transthyretin and α ₁-Antitrypsin Genes. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1415-1425
- Courtois, G., Morgan, J.G., Campbell, L.A., Fourel, G., Crabtree, G.R. (1987): Interaction of a Liver-Specific Nuclear Factor with the Fibrinogen and α ₁-Antitrypsin Promoters. *Science* **238**, 688-694
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A., Ullrich, A. (1985): Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with *neu* Oncogene. *Science* **230**, 1132-1139
- Danielson, K.G., Oborn, C.J., Durban, E.M., Butel, J.S., Medina, D. (1984): Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis *in vivo* and functional differentiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3756-3760
- Doppler, W., Villunger, A., Jennewein, P., Brduscha, K., Groner, B., Ball, R.K. (1991): Lactogenic Hormone and Cell Type-Specific Control of the Whey Acidic Protein Gene Promoter in Transfected Mouse Cells. *Molecular Endocrinology* **5**, 1624-1632
- Falcone, G., Tatò, F., Alemà, S. (1985): Distinctive effects of the viral oncogenes *myc*, *erb*, *fps*, and *src* on the differentiation program of quail myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 426-430
- Fazioli, F., Kim, U., Rhee, S., Molloy, C., Segatto, O., Di Fiore, P.P. (1991): The *erbB-2* Mitogenic Signaling Pathway: Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C- γ and GTPase-Activating Protein Does Not Correlate with *erbB-2* Mitogenic Potency. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2040-2048
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P., Blanchard, J.M. (1985): Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Research* **13**, 1431-1442
- Gebel, S. (1992): Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren c-Fos und cJun: Ein Schlüssel zum Verständnis der schnellen Induktion von Genen. *Doktorarbeit, Universität Karlsruhe*

- Geiser, A.G., Kim, S.J., Roberts, A.B., Sporn, M.B. (1991): Characterization of the Mouse Transforming Growth Factor- β 1 Promoter and Activation by the Ha-ras Oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 84-92
- Gibbs, J.B., Marshall, M.S., Scolnick, E.M., Dixon, R.A.F., Vogel, U.S. (1990): Modulation of Guanine Nucleotides Bound to Ras in NIH3T3 Cells by Oncogenes, Growth Factors, and the GTPase Activating Protein (GAP). *J. Biol. Chem.* **265**, 20437-20442
- Gil, G., Smith, J.R., Goldstein, J.L., Slaughter, C.A., Orth, K., Brown, M.S., Osborne, T.F. (1988): Multiple genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8963-8967
- Gilman, M.Z. (1987): Ribonuclease protection assay. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, New York. Unit 4.7.
- Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M. (1985): Specific DNA Binding of GAL4, A Positive Regulatory Protein of Yeast. *Cell* **40**, 767-774
- Gloss, B., Chong, T., Bernhard, H.U. (1989): Numerous Nuclear Proteins Bind the Long Control Region of Human Papillomavirus Type 16: A Subset of 6 of 23 DNase I-Protected Segments Coincides with the Location of the Cell-Type-Specific Enhancer. *J. Virol.* **63**, 1142-1152
- Gorman, C.M., Moffat, L.F., Howard, B.H. (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1057
- Gounari, F., De Francesco, R., Schmitt, J., van der Vliet, P.C., Cortese, R., Stunnenberg, H. (1990): Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* **9**, 559-566
- Goyal, N., Knox, J., Gronostajski, R. (1990): Analysis of Multiple Forms of Nuclear Factor I in Human and Murine Cell Lines. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1041-1048
- Graham, F.L. & van der Eb, A.J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *J. Virol.* **52**, 456-467
- Graves, R.A., Tontonoz, P., Ross, S.R., Spiegelman, B.M. (1991): Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes & Dev.* **5**, 428-437
- Greenberg, M.E. & Ziff, E.B. (1984): Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* **311**, 433-438
- Gronostajski, R.M., Adhya, S., Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Hurwitz, J. (1985): Site-Specific DNA Binding of Nuclear Factor I: Analyses of Cellular Binding Sites. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 964-971
- Groudine, A., Peretz, M., Weintraub, H. (1981): Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 281-288
- Han, K. & 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. (1986): Techniques for the transformation of *E. coli*. "DNA cloning" (D.M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford 1, 109-135
- Herbst, R.S., Friedman, N., Darnell, J.E., Babiss, L.E. (1989): Positive and negative regulatory elements in the mouse albumin enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1553-1557
- Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, U., Zimmer, S.G., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R.B., Herrlich, P., Ponta, H. (1993): A Link between *ras* and Metastatic Behavior of Tumor Cells: *ras* Induces CD44 Promoter Activity and leads to Low-Level Expression of Metastasis-specific variants of CD44 in CREF Cells. *Cancer Research* 53, 1516-1522
- Huck, C. (1993): Charakterisierung der Faktoren, die in die mammazellspezifische Expression des Maus Mamma Tumor Virus involviert sind. *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe*
- Hynes, N., van Ooyen, A.J.J., Kennedy, N., Herrlich, P., Ponta, H., Groner, B. (1983): Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid-responsive expression of mouse mammary tumor virus and of an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3637-3641
- Inoue, T., Tamura, T., Furuichi, T., Mikoshiba, K. (1990): Isolation of Complementary DNAs Encoding a Cerebellum-enriched Nuclear Factor I Family That Activates Transcription from the Mouse Myelin Basic Protein Promoter. *J. Biol. Chem.* 265, 19065-19070
- Jackson, S.P. & Tjian, R. (1988): O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors: Implications for Mechanisms of Transcriptional Regulation. *Cell* 55, 125-133
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., Tjian, R. (1990): GC Box Binding Induces Phosphorylation of Sp1 by a DNA-Dependent Protein Kinase. *Cell* 63, 155-165
- Jaggi, R., Salmons, B., Muellener, D., Groner, B. (1986): The *v-mos* and *H-ras* oncogene expression represses glucocorticoid hormone-dependent transcription from the mouse mammary tumor virus LTR. *EMBO J.* 5, 2609-2616
- Jehn, B., Costello, E., Marti, A., Keon, N., Deane, R., Li, F., Friis, R.R., Burri, P.H., Martin, F., Jaggi, R. (1992): Overexpression of *Mos*, *Ras*, *Src*, and *Fos* Inhibits Mouse Mammary Epithelial Cell Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3890-3902
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J., Tjian, R. (1987): A Cellular DNA-Binding Protein That Activates Eucaryotic Transcription and DNA Replication. *Cell* 48, 79-89
- Karin, M., Haslinger, A., Heguy, A., Dietlin, T., Cooke, T. (1987): Metal-Responsive Elements Act as Positive Modulators of Human Metallothionein-II_A Enhancer Activity. *Mol. Cell. Biol.* 7, 606-613
- Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M. (1986): Separation of DNA Binding from the Transcription-Activating Function of a Eukaryotic Regulatory Protein. *Science* 231, 699-704
- Klemenz, R., Fröhli, E., Aoyama, A., Hoffmann, S., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Schäfer, R. (1991): α B Crystallin accumulation Is a Specific response to *Ha-ras* and *v-mos* oncogene Expression in Mouse NIH 3T3 Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 11, 803-812

- Kraus, M.H., Poescu, N.C., Amsbaugh, S.C., King, C.R. (1987): Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene *erbB-2* in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J.* **6**, 605-610
- Kumar, C.C. & Chang, C. (1992a): Human Smooth Muscle Myosin Light Chain-2 Gene Expression Is Repressed in *ras* Transformed Fibroblast Cells. *Cell Growth & Differentiation* **3**, 1-10
- Kumar, C.C., Bushel, P., Mohan-Peterson, S., Ramirez, F. (1992b): Regulation of Smooth Muscle α -Actin Promoter in *ras*-transformed Cells: Usefulness for Setting up Reporter Gene-based Assay System for Drug Screening. *Cancer Research* **52**, 6877-6884
- Laemmli, U.D. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684
- Lai, E., Prezioso, V.R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R.H., Darnell, J.E. (1990): HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes & Dev.* **4**, 1427-1436
- Laughon, A. & Gesteland, R.F. (1984): Primary Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 Gene. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 260-267
- Leegwater, P.A.J., van Driel, W., van der Vliet, P.C. (1985): Recognition site of nuclear factor I, a sequence specific DNA-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* **4**, 1515-1521
- Lemaigre, F.P., Ace, C.I., Green, M.R. (1993): The cAMP response element binding protein, CREB, is a potent inhibitor of diverse transcriptional activators. *Nucleic Acids Research* **21**, 2907-2911
- Lichtsteiner, S., Wuarin, J., Schibler, U. (1987): The Interplay of DNA-Binding Proteins on the Promoter of the Mouse Albumin Gene. *Cell* **51**, 963-973
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951): Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Lowy, D.R. & Willumsen, B.M. (1993): Function and Regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 851-891
- Madden, S.L., Cook, D.M., Morris, J.F., Gashler, A., Sukhatme, V.P., Rauscher III, F.J. (1991): Transcriptional Repression Mediated by the WT1 Wilms Tumor Gene Product. *Science* **253**, 1550-1553
- Maire, P., Wuarin, J., Schibler, U. (1989): The Role of Cis-Acting Promoter Elements in Tissue-Specific Albumin Gene Expression. *Science* **244**, 343-346
- Marx, J. (1993): Forging a Path to the Nucleus. *Science* **260**, 1588-1589
- McCormick, F. (1993): How receptors turn Ras on. *Nature* **363**, 15-16
- Meisterernst, M., Rogge, L., Foeckler, R., Karaghiosoff, M., Winnacker, E.L. (1989): Structural and Functional Organization of a Porcine Gene Coding for Nuclear Factor I. *Biochemistry* **28**, 8191-8299

- Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y., Maniatis, T. (1981): Identification of DNA Sequences Required for Transcription of the Human $\alpha 1$ -Globin Gene in a New SV40 Host-Vector System. *Cell* 27, 279-288
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Research* 12, 7035-7056
- Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J., Tjian, R. (1989): The Proline-Rich Transcriptional Activator of CTF/NF-I Is Distinct from the Replication and DNA Binding Domain. *Cell* 58, 741-753
- Miksicek, R., Borgmeyer, U., 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., Härtig, E., Jennewein, P., Doppler, W., Cato, A.C.B. (1992): A Mammary Cell-Specific Enhancer in Mouse Mammary Tumor Virus DNA Is Composed of Multiple Regulatory Elements Including Binding Sites for CTF/NFI and a Novel Transcription Factor, Mammary Cell-Activating Factor. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4906-4918
- Mink, S., Ponta, H., Cato, A.C.B. (1990): The long terminal repeat region of the mouse mammary tumour virus contains multiple regulatory elements. *Nucleic Acids Research* 18, 2017-2024
- Minty, A.J., Caravatti, M., Robert, B., Cohen, A., Daubas, P., Weydert, A., Gros, F., Buckingham, M.E. (1981): Mouse Actin Messenger RNAs. *J. Biol. Chem.* 256, 1008-1014
- Morgan, W.D., Williams, G.T., Morimoto, R.I., Greene, J., Kingston, R.E., Tjian, R. (1987): Two Transcriptional Activators, CCAAT-Box-Binding Transcription Factor and Heat Shock Transcription Factor, Interact with a Human hsp70 Gene Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1129-1138
- Mulder, K.M. & Morris, S.L. (1992): Activation of p21^{ras} by Transforming Growth Factor β in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 267, 5029-5031
- Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Hurwitz, J. (1983): Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6177-6191
- Nehls, M.C., Rippe, R.A., Veloz, L., Brenner, D.A. (1991): Transcription Factors Nuclear Factor I and Sp1 Interact with the Murine Collagen $\alpha 1(I)$ Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4065-4073
- Olson, E.N., Spizz, G., Tainsky, M.A. (1987): The Oncogenic Forms of N-ras or H-ras Prevent Skeletal Myoblast Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2104-2111
- Paonessa, G., Gounari, F., Frank, R., Cortese, R. (1988): Purification of a NF1-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA. *EMBO J.* 7, 3115-3123
- Peterson, M.G. & Tjian, R. (1992): The tell-tail trigger. *Nature* 358, 620-621

- Pitelka, D.R. (1983): The Mammary Gland. In: Weiss, L. (ed.): "Cell and Tissue Biology", Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich; Chapter 28
- Rayter, S.I., Woodrow, M., Lucas, S.C., Cantrell, D.A., Downward, J. (1992): p21^{ras} mediates control of *IL-2* gene promoter function in T cell activation. *EMBO J.* **11**, 4549-4556
- Ringold, G.M., Yamamoto, K.R., Tomkins, G.M., Bishop, J.M., Varmus, H.E. (1975): Dexamethasone-Mediated Induction of Mouse Mammary Tumor Virus RNA: a System for Studying Glucocorticoid Action. *Cell* **6**, 299-305
- Rosenfeld, P.J. & Kelly, T.J. (1986): Purification of Nuclear Factor I by DNA Recognition Site Affinity Chromatography. *J. Biol. Chem.* **261**, 1398-1406
- Rupp, R.A.W. & Sippel, A.E. (1987): Chicken liver TGGCA protein purified by preparative mobility shift electrophoresis (PMSE) shows a 36.8 to 29.8kd microheterogeneity. *Nucleic Acids Research* **15**, 9707-9726
- Rupp, R.A.W., Kruse, U., Multhaup, G., Göbel, U., Beyreuther, K., Sippel, A.E. (1990): Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research* **18**, 2607-2616
- Rüther, U., Wagner, E.F., Müller, R. (1985): Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible *c-fos* genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **4**, 1775-1781
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988): GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563-564
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P.C., Tjian, R. (1988): A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* **334**, 218-224
- Sassone-Corsi, P. & Borelli, E. (1986): Transcriptional regulation by *trans*-acting factors. *Trends Genet.* **2**, 215-219
- Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S., Kaziro, Y. (1990): Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21^{ras}-GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5993-5997
- Schiavi, S.C., Belasco, J.G., Greenberg, M.E. (1992): Regulation of proto-oncogene mRNA stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1114**, 95-106
- Schmidt, A., Rossi, P., Crombrughe, B. (1986): Transcriptional Control of the Mouse α_2 (I) Collagen Gene: Functional Deletion Analysis of the Promoter and Evidence for Cell-Specific Expression. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 347-354
- Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R.K., Groner, B. (1991): β -Casein Gene Promoter Activity Is Regulated by the Hormone-Mediated Relief of Transcriptional Repression and a Mammary-Gland-Specific Nuclear Factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3743-3755

- Schmitz, M.L. & Baeuerle, P.A. (1991): The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B. *EMBO J.* **10**, 3805-3817
- Scholer, H., Haslinger, A., Heguy, A., Holtgreve, H., Karin, M. (1986): In Vivo Competition Between a Metallothionein Regulatory Element and the SV40 Enhancer. *Science* **232**, 76-80
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H. (1988): Requirement for *fos* Gene Expression in the Transcriptional Activation of Collagenase by Other Oncogenes and Phorbol Esters. *Cell* **54**, 325-334
- Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., Renkawitz, R. (1988): Many Transcription Factors Interact Synergistically with Steroid Receptors. *Science* **242**, 1418-1420
- Serfling, E., Jasin, M., Schaffner, W. (1985): Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends Genet.* **1**, 224-230
- Shih, C. & Weinberg, R.A. (1982): Isolation of a Transforming Sequence from a Human Bladder Carcinoma Cell Line. *Cell* **29**, 161-169
- Sistonen, L., Hölttä, E., Mäkelä, T.P., Keski-Oja, J., Alitalo, K. (1989): The cellular response to induction of the p21^{c-Ha-ras} oncoprotein includes stimulation of *jun* gene expression. *EMBO J.* **8**, 815-822
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987): Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/*neu* Oncogene. *Science* **235**, 177-182
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., Press, M.F. (1989): Studies of the HER-2/*neu* Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* **244**, 707-712
- Smith, M.R., DeGudicibus, S.J., Stacey, D.W. (1986): Requirement for *c-ras* proteins during viral oncogene transformation. *Nature* **320**, 540-543
- Sonnenberg, A., Daams, H., Calafat, J., Hilgers, J. (1986): In Vitro Differentiation and Progression of Mouse Mammary Tumor Cells. *Cancer Research* **46**, 5913-5922
- Southern, P.J. & Berg, P. (1982): Transformation of Mammalian Cells to Antibiotic Resistance with a Bacterial Gene Under Control of the SV40 Early Region Promoter. *J. Mol. Appl. Genetics* **1**, 327-341
- Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J.J., Rommelaere, J. (1991): Initiation of Transcription from the Minute Virus of Mice P4 Promoter Is Stimulated in Rat Cells Expressing a *c-Ha-ras* Oncogene. *J. Virol.* **65**, 4919-4928
- Stacey, D.W., Watson, T., Kung, H., Curran, T. (1987): Microinjection of Transforming *ras* Protein Induces *c-fos* Expression. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 523-527
- Strähle, U., Schmid, W., Schütz, G. (1988): Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J.* **7**, 3389-3395
- Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A., Friis, R.R. (1992): Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* **115**, 49-58

-
- Strawhecker, J.M., Betz, N.A., Neades, R.Y., Houser, W., Pelling J.C. (1989): Binding of the 97kD glucocorticoid receptor to the 5' upstream flanking region of the mouse *c-Ha-ras* oncogene. *Oncogene* 4, 1317-1322
- Streuli, C.H., Bailey, N., Bissel, M.J. (1991): Control of Mammary Epithelial differentiation: Basement Membrane Induces Tissue-specific Gene Expression in the Absence of Cell-Cell Interaction and Morphological Polarity. *J. Cell Biol.* 115, 1383-1395
- Tamura, T., Miura, M., Ikenaka, K., Mikoshiba, K. (1988): Analysis of transcription control elements of the mouse myelin basic protein gene in HeLa cell extracts: demonstration of a strong NFI-binding motif in the upstream region. *Nucleic Acids Research* 16, 11441-11459
- Tanese, N., Pugh, B.F., Tjian, R. (1991): Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes & Dev.* 5, 2212-2224
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., van der Eb, A. (1993): Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 12, 479-487
- Webster, N., Jin, J.R., Green, S., Hollis, M., Chambon, P. (1988): The Yeast UAS_G Is a Transcriptional Enhancer in Human HeLa Cells in the Presence of the GAL4 Trans-Activator. *Cell* 52, 169-178
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, Y., Lassar, A. (1991): The *myoD* Gene Family: Nodal Point During Specification of the Muscle Cell Lineage. *Science* 251, 761-766

Abkürzungen

A/ G/ C/ TTP	Adenosin/Guanosin/ Cytidin/Thymidintriphosphat
Abb.	Abbildung
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP 1, 2, 4	Aktivator Protein 1, 2, 4
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine (engl.: Rinder) Serumalbumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	engl.: counts per minute
dA/ G/ C/ TTP	2'-Desoxy-Adenosin/Guanosin/ Cytidin/Thymidintriphosphat
ddA/ G/ C/ TTP	2',3'-Didesoxy-Adenosin/Guanosin/ Cytidin/Thymidintriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	(Ethylendinitrilo)tetraessigsäure
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylennitrilo)]- tetraessigsäure
FCS	foetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G418	Geneticin-Sulfat
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
h	Stunde

Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRE	Hormon responsives Element
k b	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
l	Liter
LTR	engl.: Long terminal repeat
M	molar
MAF	Mammazell-Aktivierungs-Faktor
Mes	2-Morpholinethansulfonsäure
min	Minute
MMTV	Maus-Mamma-Tumor-Virus
mRNA	messenger (engl.: Boten) Ribonukleinsäure
NF 1	Nukleärer Faktor 1
NP 40	Nonidet® P40
NTP s	Nukleotidtriphosphate
Nukl.	Nukleotid
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (engl.: Polymerasekettenreaktion)
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodium (engl.: Natrium) dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	Unit (engl.: Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt