



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6342

***In vivo* Modulation des
Transkriptionsfaktors AP-1
durch Glucocorticoide**

J. P. G. Tuckermann
Institut für Genetik

August 1999



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6342

***In vivo* Modulation des Transkriptionsfaktors
AP-1 durch Glucocorticoide**

Jan Peter Gottfried Tuckermann

Institut für Genetik

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1999

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe
Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)
ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Glucocorticoide entfalten ihre vielfältige Wirkung durch Veränderung der Genexpression. Durch ihre Bindung an den Glucocorticoidrezeptor (GR) wird die Transkriptionsrate Glucocorticoid-regulierter Gene über zwei verschiedene molekulare Mechanismen beeinflusst. Einerseits dimerisieren die Rezeptormoleküle und binden an spezifische DNA-Sequenzabschnitte („glucocorticoid responsive elements“: GRE) im Promotorbereich von Glucocorticoid-regulierten Genen. Zum anderen beeinflusst das monomere Glucocorticoidrezeptor-Molekül durch Protein-Protein-Wechselwirkungen die Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF κ B. Bisher ist die Modulation der transaktivierenden Funktion des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Untereinheitenzusammensetzung c-Jun/c-Fos durch den Glucocorticoidrezeptor nur in Gewebekultur untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig im Gesamtorganismus die DNA-bindungsunabhängige Eigenschaft des GR, die AP-1-gesteuerte Transkription zu hemmen, nachgewiesen werden.

Dabei wurden AP-1/GR-Interaktionen anhand der Veränderung der Expressionrate des interstitiellen Kollagenase-Gens der Maus (Kollagenase-3) und weiterer AP-1-abhängiger Gene im Knochen und in der Haut ermittelt. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte hierbei die Kollagenase-3 als Markergen für das terminale Differenzierungsstadium hypertropher Chondrozyten und Osteoblasten in der Knochenneubildung etabliert werden. In Knochengewebe wurde die Induktion des Kollagenase-3-Gens durch das knochenresorbierende Parathormon (PTH) nachgewiesen. Glucocorticoide hemmten innerhalb kurzer Zeiträume von wenigen Stunden die PTH-induzierte Expression in primären Osteoblasten und in der Schädeldecke von PTH- und Glucocorticoid-behandelten Tieren.

In der Haut bewirkte die Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA eine starke transkriptionelle Aktivierung der AP-1-Zielgene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 innerhalb von Zeiträumen, die mit den in Gewebekultur beobachteten Induktionskinetiken vergleichbar sind. Die vollständige Repression der TPA-Induktion dieser Gene in Anwesenheit des GR-Agonisten Dexamethason läßt darauf schließen, daß AP-1/GR-Interaktionen der antitumorpromovierenden Wirkungen von Glucocorticoiden im Prozeß der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese zugrunde liegen.

Zur Beurteilung, welche der beiden Eigenschaften des GR, DNA-Bindung oder Protein-Protein-Wechselwirkungen in physiologischen Prozessen bedeutender ist, wurde die Wirkung

von Glucocorticoiden auf die AP-1 abhängige Genexpression in GR^{dim}-Mäusen untersucht, die aufgrund einer Punktmutation im GR-Lokus einen dimerisierungsdefekten Rezeptor exprimieren. Ein solches Rezeptormolekül ist nicht mehr in der Lage, an GRE-Sequenzen zu binden. Sowohl in embryonalen Fibroblasten, die aus diesen Mäusen gewonnen wurden, als auch in der Haut von GR^{dim}-Mäusen konnte die fehlende Transaktivierung von Glucocorticoid-induzierten Genen nachgewiesen werden. Dagegen blieb die Eigenschaft des GR, AP-1-vermittelte Transkription zu unterdrücken, in den Fibroblasten und in der Haut von GR^{dim}-Mäusen erhalten. Dadurch konnte belegt werden, daß die Repression der AP-1 Aktivität durch Glucocorticoide *in vivo* tatsächlich keine Expression von GRE-gesteuerten Gene benötigt.

Mit diesen Ergebnissen konnte die GR^{dim}-Mauslinie als wertvolles Modell zur Untersuchung von Glucocorticoid-Wirkungen, die ausschließlich auf der Protein-Protein-Wechselwirkungen des GR beruhen, etabliert werden. Durch den Nachweis der Hemmung von Entzündungsreaktionen durch Glucocorticoide in der Haut von GR^{dim}-Mäusen wurden zum ersten Mal Hinweise darauf gegeben, daß Protein-Protein-Interaktionen des GR für diese therapeutisch bedeutende Wirkung von Glucocorticoiden ausreichend sind.

Abstract

***In vivo* Modulation of the Transcription Factor AP-1 by Glucocorticoids**

Glucocorticoids exert their various effects by alterations of gene expression. Upon binding to the glucocorticoid receptor (GR) the transcription of glucocorticoid dependent genes is regulated by two different molecular mechanisms. First, the GR molecules dimerize and bind to palindromic DNA sequences (glucocorticoid responsive elements, GRE) in the promoters of glucocorticoid regulated genes. Second, the monomeric GR molecule influences the transcriptional activity of other transcription factors such as AP-1 or NF κ B by protein/protein interactions without binding to DNA. So far only data from tissue culture work exist concerning the modulation of the transcriptional activity of AP-1 composed of the subunits c-Jun and c-Fos by the GR. In the present study I could show, for the first time, that repression of AP-1 by glucocorticoids exist *in vivo* and occurs independently from the DNA binding function of the GR.

AP-1/GR interactions were investigated by analyzing the expression of the interstitial collagenase gene of the mouse (collagenase-3, MMP-13) and additional AP-1 dependent genes in bone and skin. During this analysis the expression of collagenase-3 could be established as a new marker gene for the terminal differentiation stage of hypertrophic chondrocytes and osteoblasts. In osseous tissues I could demonstrate the induction of collagenase-3 by the bone resorbing parathyroid hormone (PTH). This induction was repressed in the presence of glucocorticoids as well in primary osteoblasts as in the calvarial bone of PTH and glucocorticoid treated animals.

In skin the topical application with the tumor promoter TPA lead to a strong activation of the AP-1 target genes collagenase-3 and stromelysin-1 within time periods that were comparable with tissue culture experiments. The complete repression of TPA mediated expression of these genes by glucocorticoids strongly suggest that AP-1/GR interactions are the molecular basis of the anti-tumorigenic effects by glucocorticoids.

In order to discriminate between the DNA binding dependent transactivation function and the DNA binding independent transrepression function of the GR *in vivo*, I investigated the expression of AP-1 dependent genes in GR^{dim} mice. These mice carry in their germ line a point mutation in the GR gene that leads to dimerization deficient protein which fails to bind DNA upon ligand activation. As well in embryonic fibroblasts, that I established from these mice, as

in the skin of GR^{dim} mice no upregulation of GRE regulated genes was detectable. In contrast the transrepression function of the GR was completely preserved in cells and in the skin of GR^{dim} mice. These results are the first evidence that the transrepression of AP-1 dependent genes *in vivo* by glucocorticoids relies on protein/protein interactions between AP-1 and GR, whereas DNA binding of the GR is not required.

The analysis of the GR^{dim} mice made it possible to use these animals to investigate, whether particular effects of glucocorticoids are based on protein/protein interactions of the GR, or whether DNA binding of the receptor is required for glucocorticoid action. By the demonstration of the repression of inflammation by dexamethasone in GR^{dim} mice I could show, for the first time, that the repression function of the GR is sufficient for the anti-inflammatory activity of glucocorticoids.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

Abkürzungen

5

1 Einleitung

7

1.1 Glucocorticoid-Hormone

9

1.2 Der Glucocorticoidrezeptor (GR) und die Regulation der Genexpression durch Dimerisierung und DNA-Bindung

10

1.3 Der Transkriptionsfaktor AP-1 als Ziel der DNA-bindungsunabhängigen Kontrolle der Genexpression durch den GR

12

1.4 Mechanismen der Wirkungen von Glucocorticoiden *in vivo*: Potentielle Rolle der AP-1/GR-Interaktion

19

1.5 Zielsetzung der Arbeit

20

2 Material

22

2.1 Bezugsquellen:

22

2.2 Radiochemikalien

24

2.3 Plasmide

24

2.4 Primer für PCR

25

2.5 Antikörper

26

2.6 Mäusestämme

26

3 Methoden

27

3.1 Behandlung von Nukleinsäuren

27

3.2 Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien

30

3.3 Genotypisierung von Knock-Out-Mäusen

31

3.4 Zellkultur-Experimente

32

3.5 Tierexperimentelle Methoden

36

3.6 Expressionsanalysen

38

4 Ergebnisse

50

4.1 AP-1/GR-Wechselwirkung im Knochenmetabolismus

50

4.2 AP-1/GR Wechselwirkung in der Haut

73

4.3 AP-1/GR-Wechselwirkungen in Abwesenheit der DNA-Bindungsfunktion des GR

83

4.4 Antiinflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden in GR^{dim}-Mäusen

92

5 Diskussion

97

5.1 Kollagenase-3, Stromelysin-1 und Gelatinase B benötigen AP-1 zur transkriptionellen Aktivierung

97

5.2 Gewebespezifische AP-1 gesteuerte Expression der Kollagenase-3 im Knochenmetabolismus

98

5.3	Repression der PTH induzierten Kollagenase-3 Expression durch Glucocorticoide	100
5.4	In der Haut aktiviert der PKC-Aktivator TPA AP-1-Zielgene Zelltyp-spezifisch	103
5.5	Die Transrepression von AP-1 durch Glucocorticoide benötigt keine DNA-Bindung des GR	106
5.6	Glucocorticoide entfalten ihre entzündungshemmende Wirkung ohne DNA-Bindung des GR	108
5.7	Antitumorogene Wirkungen von Glucocorticoiden	110
5.8	Die Dissoziation der transaktivierenden und trans-repressiven Funktion des GR: Neue Möglichkeiten zur Reduktion von Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Glucocorticoid-Analoga	112
5.9	Ausblick: Negative Regulation durch Glucocorticoide und c-Fos als Partner in der GR vermittelten Transrepression in vivo	113
6	Literatur	116

Abkürzungen

ALP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivatorprotein 1
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
b-FGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA; komplementäre DNA-Sequenz zu der Nucleotid-Sequenz einer mRNA
cpm	„counts per minute“, Maßeinheit für die gemessenen Radioaktiven Zerfälle pro Minute
DBD	DNA-Bindungsdomäne
D-Box	Dimerisierungs-Box in der DNA Bindungsdomäne des GR
DAG	Diazylglyzerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagles's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpc	day post coitum (Tag nach Detektion des Vaginalpfropfes)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
Erk	„extracellular signal-regulated protein kinase“
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
GC	Glucocorticoid
GIO	Glucose-induzierte Osteoporose
GR	Glucocorticoidrezeptor
GR ^{dim}	Dimerisierungsfektiver GR
GRE	„glucocorticoid responsive element“
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HBSS	„Hanks' balanced salts solution“
HPA-Achse	Hypothalamische-Hypophyse-Nebennieren-Achse
HSP 90	„heat shock protein“ 90
HSP-27	„heat shock protein“ 27
IHC	Immunohistochemie
IL-1	Interleukin-1
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung

<i>Itm2a</i>	integrales Membranprotein 2a
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kb	x 1000 bp
LBD	Liganden bindende Domäne
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MBq	Megabequerel
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	„messenger“ RNA
MT1-MMP	Membrantypmatrixmetalloproteinase
OA	Osteoarthritis
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PTH	Parathormon
PTHrP	PTH verwandtes Peptid
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinasen
SRF	„serum response factor“;
TCF	ternärer Komplexfaktor
TGF β	„transforming growth factor beta“
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat
TRE	„TPA responsive element“
UV	Ultraviolettes Licht
wt	Wildtyp
xg	faches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

1 Einleitung

Die komplexen Vorgänge während der embryonalen Entwicklung von Vertebraten, sowie der Aufbau und die stationäre Integrität von Geweben und Organen im ausgewachsenen Lebewesen basieren auf dem geordneten Zusammenspiel der einzelnen Zellen, die den Organismus aufbauen. Die dafür notwendige Kommunikation der Zellen untereinander findet über lösliche Mediatoren, wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren, oder über Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) statt, die innerhalb der Zellen die Auslösung von Signaltransduktionswegen bewirken, die zu einer Änderung des genetischen Programms führt. Die Vielzahl an extrazellulären Stimuli, die auf die Zelle einwirken, benötigt die kontrollierte Integration der unterschiedlichen Signaltransduktionswege und der daraus resultierenden genetischen Programme, um eine Balance zwischen entgegen gerichteten zellulären Prozessen, wie der Proliferation, der Differenzierung und dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu gewährleisten. Bestimmte extrazelluläre Stimuli zeichnen sich dadurch aus, daß sie überdies weitere Signaltransduktionswege beeinflussen können und darüber ihre vielfältigen Wirkungen in unterschiedlichen Organen des Körpers zu entfalten. Insbesondere Steroidhormone ragen unter diesen Substanzen heraus, da sie als lipophile und membranpermeable Moleküle rasch und direkt Transkriptionsfaktoren, die Steroidhormonrezeptoren, aktivieren können. Steroidhormone üben nicht nur die transkriptionelle Kontrolle über ihre eigenen Zielgene aus, sondern modulieren auch die transkriptionelle Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren, die am Endpunkt anderer Signaltransduktionskaskaden stehen und greifen damit in deren Wirkung ein (Beato et al., 1995).

Mitogene und Streß-auslösende Stimuli wie Wachstumsfaktoren, UV-Bestrahlung und Tumorpromotoren lösen intrazelluläre Signalwege aus, an deren Ende der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein 1) steht (Abb. 1; Angel und Karin, 1991). Die Modulation der Aktivität dieses Transkriptionsfaktors durch Mitglieder der Steroidhormonrezeptor-Proteinfamilie ist in Gewebekultur intensiv untersucht worden (Beato et al., 1995). Insbesondere Wechselwirkungen von AP-1 mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR; Abb. 1), die sich in einer Beeinflussung der Expression von AP-1 Zielgenen in der Anwesenheit von Glucocorticoiden auswirken, konnten in einer Vielzahl von Gewebekultur-Experimenten nachgewiesen werden (Diamond et al., 1990; Heck et al., 1994; Jonat et al., 1990; König et al., 1992; Schüle et al., 1990; Teurich und Angel, 1995; Yang-Yen et al., 1990).

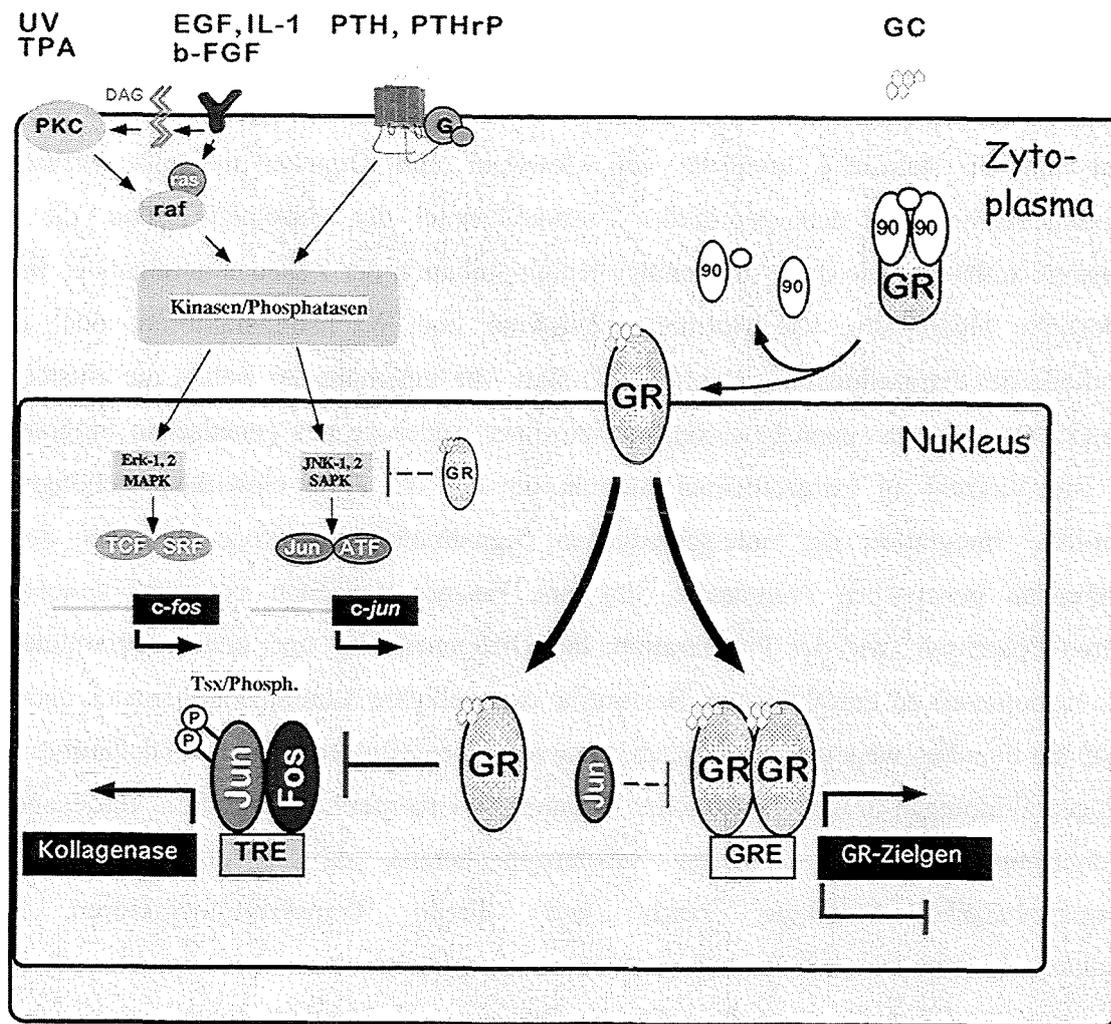


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Glucocorticoidrezeptors und des Transkriptionsfaktors AP-1 und der daraus resultierende Einfluß auf die Zielgen-Expression. 90: HSP90; b-FGF: basischer Fibroblastenwachstumsfaktor; DAG: Diacylglycerol; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; Erk: „extracellular signal-regulated protein kinase“; GC: Glucocorticoid; GR: Glucocorticoidrezeptor; GRE: „glucocorticoid responsive element“; IL-1: Interleukin-1; JNK: Jun-N-terminale Kinase; MAPK: Mitogen aktivierte Proteinkinasen; PKC: Proteinkinase C; PTH: Parathormon; PTHrP: PTH verwandtes Peptid; SAPK: Streß aktivierte Proteinkinasen; SRF: „serum response factor“; TCF: ternärer Komplexfaktor; TRE: „TPA responsive element“; Tsx/Phosph.: Transkription und Phosphorylierung; UV: UVC-Strahlung.

Glucocorticoide haben eine weitverbreitete therapeutische Anwendung erlangt, da sie effizient zur Behandlung chronischer Immun- und inflammatorischer Krankheiten, wie rheumatischer Arthritis, Asthma, Allergien und Ulcerationen eingesetzt werden. Ihr Einsatz ist jedoch von schweren Nebenwirkungen, wie Glucocorticoid-induzierte Osteoporose (GIO) und Myopathien begleitet (s. Tab. 1). Zur Entwicklung von spezifisch wirkenden Glucocorticoidanaloga, ist es daher unerlässlich aufzuschlüsseln, ob die Transaktivierung von

Genen oder die Modulation anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1, für die therapeutischen Wirkungen von Glucocorticoiden ursächlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation des Transkriptionsfaktors AP-1 durch den GR im Knochenmetabolismus, in tumorpromovierten Prozessen der Haut und in der Entzündungsreaktion im Gesamtorganismus der Maus untersucht.

	Positiver Effekt	Negativer Effekt
GC induzierte Osteoporose	Muskelatrophie Hyperparathyroidismus Stimulierung der Osteoklasten-Aktivität	Verminderte Ca^{2+} Absorption inhibierend auf gonadale Hormonachse Hemmung von Osteoblasten-Aktivität(1)
GC vermittelte Entzündungshemmung und Suppression der Aktivierung des Immunsystems	?	Inhibierung der klonalen Expansion von T-Zellen (2) Inhibierung der Sezernierung von Zytokinen (3)
GC vermittelte Hemmung der Tumorpromotion in der Mehrstufen-Karzinogenese der Haut	?	Hemmung der Proliferation Hemmung der Bildung von Papillomen (4)

Tab. 1: Positive und negative Wirkungen von Glucocorticoiden (GC) in pathophysiologischen Prozessen. Literatur: (1): (Ziegler und Kasperk, 1998); (2): (Cupps und Fauci, 1982); (3): (Taniguchi, 1988); (4): (Belman und Troll, 1972; Schwarz et al., 1977; Scribner und Slaga, 1973)

1.1 Glucocorticoid-Hormone

Die Produktion von Glucocorticoiden, die Liganden des Glucocorticoidrezeptors, wird durch die Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Achse („HPA“-Achse) reguliert. Im Hypothalamus synthetisiertes Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRF) führt zur Produktion von adrenocorticotropem Hormon (ACTH), welches im faszikulären Nebennierenkortex zur Synthese der Glucocorticoide Corticosteron und Cortisol aus Progesteron induziert. Während im Menschen hauptsächlich Cortisol produziert wird, wird im Nagetier mehr Corticosteron synthetisiert (Penzlin, 1989). Erhöhte Glucocorticoid-Spiegel im Blutkreislauf wirken hemmend auf die CRF und ACTH-Freisetzung, welches zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus in der Glucocorticoid-Synthese führt (Baxter und Rousseau, 1979).

Glucocorticoide rufen im Organismus sowohl anabole als auch katabole Wirkungen hervor (Baxter und Rousseau, 1979). In der Leber wirken sie anabol, indem die Glukoneogenese und die Glucose-Freisetzung aus Glykogen induziert wird. In peripheren Organen entfalten

Glucocorticoide dagegen katabolische Effekte, wie eine Hemmung der Glucose-Aufnahme, die Freisetzung von Aminosäuren durch Netto-Proteinabbau in Muskel und Haut, sowie die Freisetzung von Glycerol und Fettsäuren aus dem Fettgewebe. Neben der Glucose-Homöostase sind Glucocorticoide an der Regelung des Calcium-Spiegels, des kardiovaskulären Drucks, sowie an entwicklungsbiologischen Prozessen insbesondere der Reifung von Leber, Pankreas, Gastro-Intestinaltrakt und Lunge beteiligt (Baxter und Rouseau, 1979). Darüber hinaus treten erhöhte Glucocorticoid-Spiegel im Zusammenhang mit Stresssituationen auf, die zu erhöhten Glucose-Konzentrationen im Blut, zu erhöhtem Ventrikeldruck des Herzens und zu einer Hemmung der Freisetzung von Vasodilatoren führen. Im Gehirn sind Glucocorticoide vermutlich an Prozessen des Lernens und des Gedächtnis beteiligt (Wolkowitz et al., 1997).

Ein ständiges Überangebot von Glucocorticoiden im Organismus manifestiert sich im klinischen Bild des Cushing-Syndroms. Das Cushing-Syndrom zeichnet sich durch schwere Myopathien, Glucocorticoid-induzierte Osteoporose, atrophierter Haut und anderen Symptomen aus, welche die katabolischen Effekte von Glucocorticoiden demonstrieren und den Nebenwirkungen gleichen, die bei der Langzeitbehandlung mit Glucocorticoiden auftreten (Baxter und Rouseau, 1979). Ein zu niedriger Spiegel an Glucocorticoiden dagegen führt zu Symptomen, die geringere kognitive Leistungen, Appetitlosigkeit, erniedrigten Blutdruck und Störungen im Gastro-Intestinaltrakt beinhalten und als Addison-Krankheit zusammengefaßt werden (Irvine und Barnes, 1973). Patienten, die an dieser Krankheit leiden, werden daher mit Verabreichung von Glucocorticoiden behandelt.

Eine weitaus größere Bedeutung in der Therapie haben Glucocorticoide dadurch gewonnen, daß sie hemmend auf die Immun- und Entzündungsreaktionen des Körpers wirken, indem sie die Freisetzung von Zytokinen inhibieren und Apoptose in Thymozyten und B-Lymphozyten induzieren können (Cupps und Fauci, 1982). Daher werden Glucocorticoide bei septischem Schock und zur Behandlung von chronischen Entzündungskrankheiten eingesetzt (Neumann et al., 1996).

1.2 Der Glucocorticoidrezeptor (GR) und die Regulation der Genexpression durch Dimerisierung und DNA-Bindung

Der Glucocorticoidrezeptor (GR) ist ein Mitglied der Proteinfamilie der nukleären Rezeptoren, die in vier Klassen eingeteilt wird (Mangelsdorf et al., 1995). Der GR gehört zu den Klasse I Rezeptoren, den Steroidhormonrezeptoren im engeren Sinne. Diese zeichnen sich durch eine Liganden-Aktivierbarkeit und die Bindung als Homodimer an palindrome DNA-

Sequenzen aus, die als „hormone responsive elements“ (HRE) bezeichnet werden. Klasse II Rezeptoren werden ebenfalls durch Liganden induziert, heterodimerisieren jedoch mit RXR (Retinsäurerezeptoren)-Molekülen und binden an gleichgerichtete repetitive DNA-Sequenzbereiche („directed repeats“). Für Klasse III- und IV-Rezeptoren wurden bisher keine bekannten Liganden nachgewiesen und werden daher auch als „orphan receptors“ bezeichnet. Erstere homodimerisieren und binden an „direct repeats“, während letztere als Monomere an die DNA binden.

Die Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie einschließlich des GR zeichnen sich durch eine Abfolge von konservierten Domänen aus, die vom N-Terminus zum C-Terminus von A bis F bezeichnet werden (Mangelsdorf et al., 1995). Die Transaktivierungsfunktionen befinden sich in den Domänen A/B (AF1, $\tau 1$) und in F (AF2), die DNA-Bindungsdomäne (DBD) in Bereich D und die Hormon-bindende Domäne (LBD) im Bereich E.

Das monomere GR-Molekül liegt im uninduzierten Zustand in einem großen heteromeren Proteinkomplex zusammen mit den Chaperon-Molekülen HSP90, HSP70, HSP56 und weiteren Komponenten im Zytoplasma vor (Pratt, 1993). Dieser Komplex ist hochaffin für Glucocorticoide, die als lipophile Substanzen frei durch die Zellmembran diffundieren und an den GR-Chaperon-Komplex binden. Die Glucocorticoid-Bindung führt zu einer Abnahme der Protein-Protein-Wechselwirkung in diesem Komplex und der Demaskierung von nukleären Lokalisationssignalen (NLS) des GR-Moleküls, welche die Translokation des Liganden-aktivierten Rezeptors in den Kern erlaubt (Abb. 1).

Die Dimerisierung der Hormon-aktivierten GR-Moleküle ist eine Voraussetzung für die Bindung an die palindrome DNA-Sequenzelemente (GRE) in Promotoren von GR-regulierten Genen (Freedman, 1992; Abb. 1). Während die Hormon-bindende Domäne (LBD) im Falle des Östrogenrezeptors und des Thyroidhormonrezeptors durch Wechselwirkung von hydrophoben Aminosäureresten die Dimerisierung unterstützt (Fawell et al., 1990; Glass et al., 1989), ist die DNA-bindende Domäne (DBD) für die DNA-induzierte Dimerisierung unabdingbar (Perlmann et al., 1990). Die DBD besteht aus zwei Zinkfingermotiven, in denen jeweils ein Zink-Ion von vier Cystein-Seitenketten komplexiert wird. Der in der Dimerisierung involvierte Bereich ist in einem Peptidmotiv identifiziert worden, das am aminoterminalen Ende des zweiten Zinkfingers liegt und als D-Box bezeichnet wird (Dahlman-Wright et al., 1991; Umesono und Evans, 1989). Protein-DNA-Kristallisierungsstudien der DBD des GR bestätigten, daß die meisten Protein-Protein-Kontakte zwischen den monomeren Molekülen mit Aminosäureresten der D-Box stattfinden (Luisi et al., 1991). Der Austausch von

Aminosäuren in der D-Box führt zu einem Verlust der Transaktivierbarkeit von GRE regulierten Promotoren durch Glucocorticoide (Dahlman-Wright et al., 1991).

Der GR ist nach der Bindung an die DNA als Dimer in der Lage, die Transkription von Zielgenen zu aktivieren, indem die Transaktivierungsdomänen direkt oder über die Vermittlung von Brückenproteinen (Koaktivatoren) die basale Transkriptionsmaschinerie kontaktieren. Bei einigen wenigen Genen führt die DNA-Bindung des GR zur Repression der Transkription. Die in diesen Promotoren enthaltenen negativ wirkenden GRE (nGRE) werden in der Abwesenheit von Glucocorticoiden von positiv wirkenden Transkriptionsfaktoren besetzt. Nach der Stimulation mit dem Hormon werden diese durch GR-Moleküle verdrängt, die möglicherweise aufgrund der Architektur des nGRE trimerisieren und sich dann in einer nicht-transaktivierenden Konformation befinden (Drouin et al., 1993; Subramaniam et al., 1998).

1.3 Der Transkriptionsfaktor AP-1 als Ziel der DNA-bindungsunabhängigen Kontrolle der Genexpression durch den GR

Die Vielfalt der Wirkungen der Glucocorticoide beruht vor allem auf einer weiteren Eigenschaft des GR, der Modulation der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Protein-Protein-Wechselwirkung ohne Bindung an die DNA. Die Beeinflussung durch den Hormon-aktivierten GR ist für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, unter anderem AP-1 (Jonat et al., 1990), NF κ B (Heck et al., 1997), CREB (Imai et al., 1993), GATA-1 (Chang et al., 1993) und STATs (Stocklin et al., 1996).

Insbesondere die Hemmung von AP-1-vermittelter Transkription durch den GR wird als Grundlage für Glucocorticoid-Wirkungen bei Entzündungsvorgängen und in der Tumorpromotion angenommen (Jonat et al., 1990).

1.3.1 Der Transkriptionsfaktor AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein 1) ist der Oberbegriff für dimere Proteinkomplexe, die aus Mitgliedern der Jun-, Fos- und CREB/ATF-2 Proteinfamilien zusammengesetzt sind (Angel und Karin, 1991).

Die einzelnen Komponenten von AP-1 zeichnen sich durch eine gemeinsame funktionelle Domänenstruktur aus, die bZIP-Region. Diese Region besteht aus einer Aminosäuresequenz mit einem hohen Anteil an basischen Aminosäureresten (basische Region) und einem Leucinreichen (Leucin-Zipper) Bereich. Die basische Region ist für die Bindung an spezifische DNA-

Sequenzen verantwortlich (Vogt und Bos, 1990), während der Leucin-Zipper die Dimerisierungsdomäne der AP-1-Mitglieder darstellt. Die Dimerisierung findet durch hydrophobe Wechselwirkungen der Leucin-Heptaden in Kombination mit ionischen Wechselwirkungen statt, die nur ganz bestimmte Untereinheiten-Zusammensetzungen erlaubt (Angel und Karin, 1991; Kouzarides und Ziff, 1988; van Dam et al., 1998). Aufgrund dessen sind Homodimere nur unter Mitgliedern der Jun (c-Jun, JunB, JunD) und CREB/ATF-2 (ATF-2, ATF-a) Familie möglich, während Mitglieder der Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) nur Heterodimere ausbilden können. Die spezifische Zusammensetzung eines AP-1-Dimers bestimmt die Stabilität und die Affinität gegenüber AP-1 Bindestellen in Promotoren und die Effizienz der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen (Angel und Karin, 1991; Ryseck und Bravo, 1991).

c-Fos/c-Jun Heterodimere binden bevorzugt an die Sequenz 5'-TGAGTCA-3' (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b), während die Konsensussequenz für c-Jun/ATF-2 5'-TTACCTCA-3' lautet (Angel et al., 1988b; van Dam et al., 1993).

Der Expression von AP-1 Zielgenen geht die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden voraus, die durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli ausgelöst werden können (Abb. 1). Die Signaltransduktionswege können durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, wie dem EGF-, IL-1- und bFGF-Rezeptor (Chedid et al., 1991; Aho et al., 1997; Sachsenmaier et al., 1994) oder von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie der Parathormon/Parathormonverwandtes-Peptid-Rezeptor (PTH/PTHrP-Rezeptor; Clohisy et al., 1992) ausgelöst werden. Die Rezeptoraktivierung führt unter anderem zur Freisetzung des „Second Messengers“ Diacylglycerol (DAG) aus dem Lipid Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat durch die Aktivität von membranständigen Phospholipasen (Boyer et al., 1989). DAG aktiviert als natürlicher Agonist die Proteinkinase C (PKC). Außer DAG sind Phorbolster wie das 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) effiziente Aktivatoren der PKC, die gleichzeitig starke tumorpromovierende Agenzien sind (Nishizuka, 1984). Da TPA wie DAG die PKC aktiviert, imitiert die Behandlung von Zellen mit TPA zumindest teilweise die Wirkung von Serum- und Wachstumsfaktoren (Angel und Karin, 1991).

Die PKC wirkt als Serin/Threonin Kinase und aktiviert eine Vielzahl von Substraten, die stromabwärts des Signaltransduktionsweges liegen, welcher in die Aktivierung von AP-1 mündet. Die Phosphorylierung der Proteinkinase Raf (Marais et al., 1998), die durch das GTP bindende Protein Ras an die Zellmembran rekrutiert wird (Leevers et al., 1994), steht am Anfang einer Proteinphosphorylierungskaskade in deren Verlauf die MAP-Kinasen („mitogen-

activated protein kinases“) aktiviert werden. Die MAP-Kinasen modulieren die Aktivität von bereits in der Zelle vorliegenden AP-1-Komponenten und anderen Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung (Abb. 1) und werden nach ihrer Substratspezifität in drei Untergruppen eingeteilt. ERK1 und ERK2 („extracellular signal-regulated protein kinase“) modifizieren bevorzugt die Transkriptionsfaktoren TCF („ternary complex factor“) und Elk1 (Gille et al., 1995). Die auch als SAPK („stress activated kinase“) bezeichneten Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) phosphorylieren die Transaktivierungsdomänen (TAD) von c-Jun und ATF-2 (Karin, 1995; Minden und Karin, 1997). Schließlich aktiviert die p38-MAP-Kinase ATF-2 und den Transkriptionsfaktor Max (Kyriakis und Avruch, 1996). Die Phosphorylierung von TCF, c-Jun und ATF-2 führt zur raschen Expression der *c-jun* und *c-fos* Gene („immediate early genes“). *De novo* synthetisiertes c-Jun und c-Fos aktivieren dann zusammen mit bereits existierenden AP-1-Komponenten die Transkription von AP-1-Zielgenen („secondary response genes“; Angel und Karin, 1991).

1.3.2 Die transkriptionelle Regulation der interstitiellen Kollagenasen durch die AP-1-Untereinheit c-Fos

Eine besondere Rolle unter den AP-1 Zielgenen spielen die Gene der interstitiellen Kollagenasen, die Fibroblasten-Kollagenase (MMP-1) und die Kollagenase-3 (MMP-13). Da die Expression des interstitiellen Kollagenase-Gens der Maus¹ in der vorliegenden Arbeit als Maß für die AP-1-Aktivität im Organismus untersucht wird, soll zunächst die Funktion der Kollagenasen kurz vorgestellt werden. Diese sezernierten Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind als einzige Proteasen in der Lage, unter physiologischen Bedingungen die Tripelhelikalen Abschnitte der fibrillären Kollagene (Typ I, II und III) zu spalten (Birkedal-Hansen et al., 1993). Da diese den Hauptanteil der extrazellulären Matrix (ECM) ausmachen, ist die Aktivität der Kollagenasen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Einleitung der Matrixdegradation und unterliegt daher einer besonders streng kontrollierten Regulation. In

¹ In einigen Säuger-Spezies, z.B. in der Maus und der Ratte, konnte die Präsenz der Fibroblasten-Kollagenase (MMP-1) nicht nachgewiesen werden. Das Gen der interstitiellen Kollagenase der Maus und der Ratte (Henriet et al., 1992; Quinn et al., 1990), die ursprünglich als Kollagenase Typ I bezeichnet wurden, besitzen sehr hohe Homologie zum menschlichen Kollagenase-3-Gen (MMP-13; Freije et al., 1994). Möglicherweise übernimmt die Kollagenase-3 in der Maus Funktionen, die im Menschen auf die Produkte beider Gene für die interstitiellen Kollagenasen verteilt werden.

pathologischen Prozessen, die von fehlgeleitetem Gewebeumbau begleitet werden, wie in der Knorpeldegradation der rheumatische Arthritis und Osteoarthritis und in Prozessen der Tumorigenese und der Metastasierung (Krane, 1993; Stetler-Stevenson et al., 1993), scheint eine deregulierte hohe Expression von Kollagenasen eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Isolierung von Kollagenase-3 cDNAs aus cDNA-Banken, die aus Brustkrebsgeweben (Freije et al., 1994) und aus Knorpel von Patienten stammen, die an Osteoarthritis leiden (Mitchell et al., 1996), sind weitere Indizien für eine Beteiligung der Kollagenase-3 an diesen Vorgängen. Die kollagenolytische Aktivität der Kollagenasen wird durch transkriptionelle und posttranslationelle Mechanismen reguliert. Zu der posttranslationalen Regulation gehört die proteolytische Aktivierung der Prokollagenasen durch Proteinase-Kaskaden (Murphy et al., 1999), sowie deren Hemmung durch Bindung von gewebespezifischen Inhibitoren (TIMP; Birkedal-Hansen et al., 1993).

Die transkriptionelle Kontrolle der Expression der interstitiellen Kollagenasen wird durch AP-1 im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren erreicht. Zusätzlich zu der AP-1 Bindestelle, die für die Induktion der Transkription der Gene beider interstitiellen Kollagenasen durch TPA ausreichend ist (Angel et al., 1987a; Porte et al., 1999; Schorpp et al., 1995), befinden sich in den Promotoren der Kollagenase-Gene PEA-3 („polyoma virus enhancer alpha domain element 3“-Bindestellen, an die Transkriptionsfaktoren der c-Ets ("E26 transformation specific factor") Familie binden. Diese Elemente verstärken die TPA-Induzierbarkeit der Transkription beider Gene durch Wechselwirkungen zwischen gebundenen c-Fos/c-Jun an der AP-1- und dem Ets-Familienmitglied ERG an der PEA-3/Ets-Bindestelle (Basuyaux et al., 1997; Gutman und Wasyluk, 1990; Pendas et al., 1997). Außer der Gene für die interstitiellen Kollagenasen wird die Transkription von weiteren MMP-Genen durch eine ähnliche Promotorenstruktur reguliert. Zur TPA-Induzierbarkeit der Transkription des Stromelysin-1 (MMP-3)- und Gelatinase B (MMP-9)-Gens tragen ebenfalls AP-1- und PEA-3/Ets-Bindestellen in den Promotoren bei (Angel et al., 1987b; Buttice und Kurkinen, 1993; Kerr et al., 1988; Munaut et al., 1999).

Eine Vielzahl von experimentellen Ergebnissen spricht für eine Schlüsselrolle von c-Fos für die transkriptionelle Regulation des Kollagenase-3-Gens. Zum einen binden AP-1-Dimere in der Zusammensetzung c-Jun/c-Fos mit hoher Effizienz an das TRE im Kollagenase-3-Promotor (Schorpp et al., 1995). Zum zweiten kann in c-Fos-defizienten Fibroblasten, die aus c-fos-Knock-Out Mäusen isoliert worden waren, durch TPA keine Induktion des Kollagenase-3 Gens erreicht werden (Schreiber et al., 1995). Drittens sind in Osteosarkomen von Mäusen,

die durch Strahlung induziert oder spontan entstanden waren, hohe Kollagenase-3 mRNA-Mengen mit der Anwesenheit von c-Fos Protein korreliert (Tuckermann, 1995). Schließlich ist in Mäusen, die c-Fos überexprimieren, das Kollagenase-3-Gen in Knochen und in Osteosarkomen stark induziert (Gack et al., 1994; Tuckermann, 1995). Interessanterweise reflektiert dabei die Kollagenase-3-Expression die Zelltyp-spezifische Transformation durch c-Fos. Das spontane Auftreten von Osteosarkomen in den *c-fos* transgenen Mäusen beruht auf der Transformation von Osteoblasten, die durch die ubiquitäre postnatale Überexpression von *c-fos* (H-2K^b-*c-fos*-LTR, MT-*c-fos*-LTR) erreicht worden war (Rüther et al., 1989; Wang et al., 1995). Die Häufigkeit der Knochtumorentstehung wurde bei gleichzeitiger Überexpression von *c-jun* (H-2K^b-*c-fos*-LTR/H-2K^b-*c-jun*-LTR doppel-transgene Mäuse) sogar verstärkt, wobei die entstandenen Osteosarkome eine höhere Kollagenase-3-Expression aufweisen als diejenigen von *c-fos* transgenen Tieren. Die pränatale Überexpression von *c-fos*, wie sie durch die Einführung des *c-fos*-Transgens in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und nachfolgender Erzeugung chimärer Embryonen hervorgerufen werden kann, führt zur Transformation von Chondrozyten, so daß sich in den chimären Mäusen bevorzugt Chondrosarkome entwickeln (Wang et al., 1991). Diese Tumoren zeigen ebenfalls eine hohe Transkriptionsrate des Kollagenase-3-Gens (Tuckermann, 1995).

Die Zielzellen der Transformation durch Überexpression von *c-fos*, Osteoblasten und Chondrozyten, repräsentieren eben diejenigen Zellen, auf welche die Kollagenase-3 Expression in Wildtyp-Mäusen während der Embryogenese und in adulten Tieren beschränkt ist (Gack et al., 1995). Ein maßgeblicher extrazellulärer Stimulus für die Kollagenase-3-Expression in Osteoblasten ist das knochenresorbierende Parathormon (PTH; Quinn et al., 1990). In Mäusen, denen durch homologe Rekombination das Gen für den PTH/PTHrP-Rezeptor inaktiviert wurde, fehlt die osteoblastäre Kollagenase-3-Expression vollständig (Lanske et al., 1998). Der transkriptionellen Aktivierung der Kollagenase-3 Expression durch PTH geht eine Induktion des *c-fos*- und *c-jun*-Gens voraus (Clohisy et al., 1992). Im Promotor der Kollagenase-3 wird zusätzlich zur AP-1 Bindestelle ein weiteres Element für die PTH-induzierte Aktivierung der Kollagenase-3 Transkription benötigt. Dieses wird als Osteoblasten-spezifisches Element (OSE) bezeichnet und bindet Cbfa-1, einen Transkriptionsfaktor aus der Runt-Protein-Familie (Ducy et al., 1997). Die Präsenz von Cbfa-1 ist für die Differenzierung von Osteoblasten während der Embryogenese unentbehrlich, da Cbfa-1-Knock-Out-Mäuse keine Osteoblasten besitzen (Otto et al., 1997). Studien am Kollagenase-3-Promotor belegen, daß PTH die Transkription des Kollagenase-3-Gens durch das synergistische Zusammenwirken von AP-1 und Cbfa-1 reguliert (Porte et al., 1999). Die

Knochengewebe-spezifische Expression des Kollagenase-3-Gens im Organismus benötigt vermutlich die Stimulation durch PTH, die durch AP-1 (c-Fos/c-Jun) und Cbfa-1 vermittelt wird.

1.3.3 Die Modulation der Expression der interstitiellen Kollagenasen durch Glucocorticoide

Die Analyse der negativen Wirkung von Glucocorticoiden auf die TPA-induzierte Expression der Fibroblasten-Kollagenase führte zu der Entdeckung der Wechselwirkungen zwischen dem GR und AP-1 (Jonat et al., 1990).

Die Glucocorticoid-vermittelte Hemmung der Transkription der meisten AP-1-abhängigen Gene, wie der interstitiellen Kollagenase, Stromelysin-1 und Urokinase (Brinckerhoff et al., 1986; Medcalf et al., 1986; Offringa et al., 1988) benötigt nicht die DNA-Bindung des GR. Eine Ausnahme stellt das Proliferin-Gen dar, für das die Bindung des GR und AP-1 an ein sogenanntes kompositorisches Element als Grundlage für die Repression der TPA-Induzierbarkeit durch Glucocorticoide beschrieben wurde (Diamond et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Mordacq und Linzer, 1989).

Im Kollagenase-Promotor wird die transkriptionelle Aktivität von einem an die TRE-Sequenz gebundenen AP-1-Komplex durch den GR direkt beeinflusst (Jonat et al., 1990), ohne die Bindung von AP-1 am TRE zu ändern (König et al., 1992). Die Repression der transkriptionellen Aktivität findet höchstwahrscheinlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen AP-1 und dem monomeren GR-Molekül statt. Durch transiente Transfektionsexperimente konnte nachgewiesen werden, daß die Einführung von Mutationen in der D-Box des GR (A458T) zur Generierung von GR Molekülen führt, die nicht mehr dimerisieren und somit ihre Fähigkeit verloren haben, an GRE-Sequenzen zu binden. Sie sind aber dennoch in der Lage, die Transkription der interstitiellen Kollagenase zu hemmen (Heck et al., 1994). Mit der Einführung derartiger mutanter GR-Moleküle, wurde es zum ersten Mal möglich, die beiden molekularen Mechanismen der Genregulation durch den GR, die DNA-bindungsabhängige Transaktivierung von Genen und die DNA-bindungsunabhängige Modulation von Transkriptionsfaktoren, in Gewebekultur getrennt zu untersuchen.

Die Dimer-Zusammensetzung von AP-1 hat offensichtlich einen Einfluß auf die Qualität der AP-1/GR Wechselwirkungen. Unter transienten Transfektionsbedingungen können Jun/Jun-Homodimere synergistisch mit dem GR interagieren, da in der Gegenwart von Dexamethason der Kollagenase-Promotor sogar verstärkt induziert wird (Teurich und Angel, 1995). Jedoch

werden die physiologisch relevanteren Jun/Fos-Heterodimere (Schorpp et al., 1995) durch Glucocorticoide in ihrer Fähigkeit, den Kollagenase-Promotor zu aktivieren, gehemmt (Teurich und Angel, 1995). Untersuchungen am Proliferin-Gen Promotor geben einen weiteren Hinweis auf die AP-1-Dimer-spezifische Interaktion mit dem GR, da die Überexpression von c-Fos/c-Jun mit dem GR zu einer Hemmung der Promotoraktivität führt, während Fra-1/c-Jun bei Anwesenheit von transfiziertem GR die Promotoraktivität noch steigert (Miner und Yamamoto, 1992). Damit ist c-Fos als AP-1 Untereinheit nicht nur maßgeblich an der Aktivierung des Kollagenase-Gens beteiligt, sondern auch das Zielmolekül der negativen Modulation von AP-1 durch den GR. Für die wechselseitige Hemmung spielt sehr wahrscheinlich auch das Mengenverhältnis von AP-1 (Jun/Fos) und dem GR eine wichtige Rolle, da die transiente Überexpression von c-Fos die negative Wirkung des GR auf Jun/Fos aufheben kann (Kerppola et al., 1993). Das Verhältnis zwischen Rezeptor und AP-1 beeinflusst ebenfalls die Hemmung der transkriptionellen Aktivität des GR durch AP-1. Durch die Überexpression von AP-1-Komponenten konnte die Inhibierung der Glucocorticoid-induzierten Transkription von GRE regulierten Genen nachgewiesen werden (Berko-Flint et al., 1994; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Abb. 1).

Die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem GR und AP-1 findet entweder direkt statt oder benötigt weitere Partnermoleküle, welche zur Zeit noch nicht identifiziert sind. Als beteiligte Moleküle werden der transkriptionelle Koaktivator CBP/p300 und das akzessorische pCIP diskutiert, da dieser Komplex als Koaktivator sowohl für c-Jun- als auch für Steroidhormonrezeptor-vermittelte Transkription dienen kann und die Konkurrenz um diesen Komplex möglicherweise wechselseitige transkriptionelle Hemmung bewirken kann (Aarnisalo et al., 1998; Kamei et al., 1996; Torchia et al., 1997). Kürzlich wurde ein zusätzlicher Mechanismus der Beeinflussung AP-1 abhängiger Transkription durch den GR von Munoz und Mitarbeitern (Caelles et al., 1997) beschrieben. Demnach interferiert der GR mit der Kinase-Aktivität der Jun-N-terminalen Kinase (JNK), und hemmt dadurch die AP-1 Aktivität (Abb. 1).

1.4 Mechanismen der Wirkungen von Glucocorticoiden *in vivo*: Potentielle Rolle der AP-1/GR-Interaktion

Die Wirkung von Glucocorticoiden wird durch den GR ausgeübt, indem er Gentranskription aktiviert oder über die oben diskutierten Mechanismen hemmt (Abb. 1). Weitgehend unbekannt bleibt jedoch, welche Eigenschaft des GR jeweils für die vielfältigen Wirkungen von Glucocorticoiden im Gesamtorganismus verantwortlich sind. Die bekanntesten pathophysiologischen Effekte von Glucocorticoiden sind Knochenschwund (Glucocorticoid-induzierte sekundäre Osteoporose), die Unterdrückung von Entzündungsreaktionen und Hemmung des Immunsystems und, damit assoziiert, die hemmende Wirkung auf die experimentelle Tumorigenese in der Haut. In diesen Prozessen scheinen negative Effekte von Glucocorticoiden eine bedeutende Rolle zu spielen (Tab. 1). Den inhibierenden Wirkungen von Glucocorticoiden könnten repressive transkriptionelle Effekte zu Grunde liegen. Vor allem die Modulation der transkriptionellen Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFkB durch den GR ist aufgrund von Gewebekulturexperimenten als Ursache für die repressiven Wirkungen von Glucocorticoiden postuliert worden (Göttlicher et al., 1998).

In der Glucocorticoid-induzierten Osteoporose wird die Aktivität von Osteoblasten zum einen durch die Hemmung der Differenzierung, zum anderen durch die Repression der Synthese von ECM Molekülen und des Insulin like growth factor I (IGF-1) inhibiert (Canalis, 1998; Ziegler und Kasperk, 1998). Der Transkriptionsfaktor AP-1, insbesondere die Untereinheit c-Fos, spielt bei der Wachstumskontrolle dieser Zellen eine bedeutende Rolle und vermittelt die genregulatorische Wirkung des knochenresorbierenden Hormons PTH (s. Kap. 1.3.2).

Im Immunsystem hemmen Glucocorticoide die akzessorischen Funktionen von Lymphozyten, die klonale Expansion von T-Zellen und die Sekretion von Zytokinen (Cupps und Fauci, 1982; Taniguchi, 1988). In diesen Prozessen sind Genprodukte, wie z.B. die Interleukine 1, 2 und 8 (Bailly et al., 1996; Muegge et al., 1989; Shapiro et al., 1997; Yasumoto et al., 1992) und das MCP-1 (Martin et al., 1997) involviert, deren Expression durch AP-1 reguliert wird.

Bei der Tumorpromotion in der chemisch induzierten Mehrstufen-Karzinogenese der Maushaut hemmen Glucocorticoide die Entstehungshäufigkeit von Papillomen, sowie die vorangehende Hyperproliferation von Keratinozyten in der Haut (Belman und Troll, 1972; Schwarz et al., 1977; Scribner und Slaga, 1973). Dieser experimentell herbeigeführte Tumorentstehungsprozeß läßt sich in drei Phasen einteilen, die pharmakologisch kontrolliert

werden können: Initiation, Tumorpromotion und maligne Progression (Marks und Fürstenberger, 1990).

Die Tumorinitiation wird in diesem Modell durch die Applikation einer genotoxischen Substanz (z.B. Dimethylbenthrasen, DMBA) auf die rasierte Rückenhaul von Mäusen erzielt, wodurch zahlreiche Mutationen in Epithelzellen ausgelöst werden. Insbesondere Mutationen im *Ha-ras*-Protoonkogen konnten als initiiierende Mechanismen identifiziert werden (Brown et al., 1986; Quintanilla et al., 1986). In der zweiten Phase, der Tumorpromotion, führt die wiederholte Behandlung mit reizenden Agenzien oder wiederholte Verwundungen der Haut über chronische Entzündungsreaktion und Hyperplasie zur Entwicklung von gutartigen Papillomen (Marks und Fürstenberger, 1990). In der dritten Phase tritt die maligne Progression auf, die sich durch Ausbildung von bösartigen Hauttumoren, wie invasive Plattenepithelkarzinome auszeichnet. Diese können sich zu metastasierenden Spindelzellkarzinomen entwickeln.

Die Aktivierung von Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 spielen vermutlich eine entscheidende Rolle in der Tumorpromotion und malignen Progression. Die wirksamsten tumorpromovierenden Substanzen sind nämlich Phorbolster, die als potente Aktivatoren der Proteinkinase C extrazelluläre mitogene Stimuli imitieren und in Gewebekultur den Transkriptionsfaktor AP-1 stimulieren. Darüber hinaus wird beim Fehlen der AP-1 Komponente *c-fos* die maligne Progression unterbrochen. In *c-fos*-Knock-Out-Mäusen treten in der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese nur gutartige Papillome auf (Saez et al., 1995).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Beteiligung von AP-1 an Prozessen, die durch Glucocorticoide inhibiert werden können legt die Vermutung nahe, daß diese durch Wechselwirkung zwischen AP-1 und dem GR über Protein-Protein-Interaktionen bewirkt werden.

Der Nachweis von AP-1/GR Wechselwirkungen im Knochenmetabolismus, in Entzündungsprozessen und in der Tumorigenese im Kontext des Gesamtorganismus ist bislang nicht erbracht worden. Zielsetzung dieser Arbeit ist es, diese Lücke zu schließen und den Anteil der Wechselwirkung des GR und des Transkriptionsfaktors AP-1 an knochenmetabolischen, antitumorpromovierenden und antiinflammatorischen Wirkungen von Glucocorticoiden *in vivo* zu untersuchen.

Zur Bestimmung der AP-1-Aktivität wurde die Expression des Kollagenase-3 Gens (MMP-13) der Maus analysiert. In Gewebekultur wurde gezeigt, daß die Aktivität von AP-1 essentiell für die Kollagenase-3 Expression ist und durch eine hochaffine c-Jun/c-Fos-Bindungsstelle im Kollagenase-3 Promotor vermittelt wird (Schorpp et al., 1995). Weiterhin zeigten erste *in vivo* Studien, daß AP-1 für die Kollagenase-3 Expression eine Schlüsselrolle spielt: In *c-fos* und *c-fos/c-jun* überexprimierenden Mäusen ist die Expression der Kollagenase-3 im Knochengewebe erhöht (Gack et al., 1994; Tuckermann, 1995).

Daher sollten im ersten Teil der Arbeit AP-1/GR Interaktionen im Knochengewebe untersucht werden, da die basale Expression des AP-1 Zielgens der Kollagenase-3 weitgehend auf osteogene Gewebe beschränkt ist (Gack et al., 1995) und veränderte Expression von Fos/AP-1 sich am auffälligsten im Knochen auswirkt (Grigoriadis et al., 1995).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von AP-1 durch den GR in der Haut als mögliche Ursache der antitumorpromovierenden Wirkung von Glucocorticoiden in der Mehrstufenkarzinogenese angesehen werden kann.

Um in der *in vivo* Situation Glucocorticoid-Effekte auszuschließen, die auf der transaktivierenden Eigenschaft des GR beruhen, welche durch DNA-Bindung zu Stande kommt, sollten im dritten Teil der Arbeit Mäuse charakterisiert werden, die einen mutierten GR exprimieren (GR^{dim}). Dabei sollte die Eignung dieser Maus-Linie als *in vivo*-Modell für die Dissoziation der DNA-Bindungsfunktion von der Protein-Protein-Interaktionsfunktion des GR etabliert werden. Diese Mausmutante besitzt aufgrund einer durch homologe Rekombination eingeführten Punktmutation (A458T) in der D-Box des GR einen DNA-bindungsdefizienten GR (GR^{dim}).

Bei erfolgreichem Nachweis der fehlenden Transaktivierungseigenschaften des GR in den GR^{dim} Mäusen bei gleichbleibenden Repressionseigenschaften sollte anhand des GR^{dim} Mausmodells die Frage beantwortet werden, welchen Anteil Protein-Protein-Wechselwirkungen des GR bei der antiinflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden haben, und ob sich antiinflammatorische Effekte in Abwesenheit von Glucocorticoid-induzierten Genen erzielen lassen.

2 Material

2.1 Bezugsquellen:

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in pro analysi (p.A.) Qualität bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser (über ein Milli-Q Reinstwasser-System [Millipore] gereinigt) in sterilen Gefäßen angesetzt und bei geeigneter Temperatur gelagert.

Allgemein gebräuchliche Chemikalien

Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Serva, Heidelberg
Sigma, Deisenhofen

Azetyl-Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
3-Aminopropyltriethoxy-Silan (TESPA)	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Typ I)	Appligene, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Roche Diagnostics, Mannheim
APS	BioRad, München
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (Giemsa)	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco-Laboratories, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco-Laboratories, Augsburg
Bakterienplatten (10 cm)	Greiner, Nürtingen
Biopsy Punch, $\varnothing=4$ mm	Stiefel Laboratories, Offenbach
Bryostatin-1	Gminsky, Hecker, DKFZ, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
CTAB	Sigma, Deisenhofen
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason, water soluble	Sigma, Deisenhofen
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Buchs
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco, Eggenstein
Eichproteine, gefärbt	BioRad, München
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Emulsifier Safe ®	Packard Instrument Company, Illinois
Entellan neu ® (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie)	Merck, Darmstadt
Eosin B	Sigma, Deisenhofen

Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälber Serum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Formamid	Sigma, Deisenhofen
GeneScreen Plus®	NEN, Life Science Products, Köln
Glycerin	BRL Inc., Neu-Isenburg
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München
HEPES	Roth, Karlsruhe
Heringsperma-DNA Typ III	Sigma, Deisenhofen
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hyperfilm™-MP	Amersham, Braunschweig
Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica-Reichert-Jung, Nußloch
Ketanest	Bayer, Leverkusen
Kodak Developer D-19	Kodak, Rochester
Kodak Fixer	Kodak, Rochester
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
Mayer's Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen
mouse IL-6 ELISA-Kit	R&D Systems, Minneapolis
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio Rad Laboratories, München
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin TEMED	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
NTB-2 Emulsion für die Autoradiographie	Kodak, Rochester
Ribonukleotidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Ohrmarken	National Band and Tag Corporation, New Port
Oligo-d(T)-Cellulose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Oligotex Spin Column	Quiagen, Hilden
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Parathormon (PTH Rat Fragment 1-34)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Eggenstein
Polyoxymethylen Färbegestelle	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbetröge	Bender und Hobein, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	USB, Cleveland
	Promega Mannheim
	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Rompun	Parke-Davis, Berlin
Röntgenfilme (Fuji RX)	Siemens AG, Stuttgart
Sephadex G25 und G50	Pharmacia, Freiburg
Silan GF31	Wacker Chemie, München
Silikonlösung	Serva, Heidelberg
Szintillationsröhrchen	Packard Instrument Company, Illinois

T7-Sequenase-Kit	USB, Cleveland
TPA	Sigma, München, bzw. AG Prof. Hecker, DKFZ, Heidelberg
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Whatman 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkultur-Medien	Life Technologies, Eggenstein
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen

2.2 Radiochemikalien

α - ³⁵ S-UTP (370 Mbq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
α - ³² P-dCTP (370 MBq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
α - ³³ P-dATP (370 MBq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
D-threo-(dichlorazetat-1- ¹⁴ C)-Chloramphenicol (7,4 MBq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.3 Plasmide

2.3.1 DNA-Sonden für Northern-Blot Analysen

GAPDH:	PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985)
<i>c-jun</i> :	HindIII/PstI-Fragment des Plasmids RSV- <i>c-Jun</i> (Angel et al., 1988a)
<i>c-fos</i> :	EcoRI/HindIII-Fragment des Plasmids pGEM-4-mouse- <i>c-fos</i>
Kollagenase-3:	PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mColl-1 (Gack et al., 1994)
Stromelysin-1:	PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mStrom-1 (Gack et al., 1994)
18 S	amplifiziertes PCR-Fragment aus cDNA von MEF mit Hilfe der Primer OC91 und OC92 (s. Kap. 2.4)
PGX-3	amplifiziertes PCR-Fragment aus cDNA von Dexamethason-behandelter Maushaut mit Hilfe der Primer PGX-3 up und PGX-3 down (s. Kap. 2.4)
HSP27	amplifiziertes PCR-Fragment aus cDNA von Dexamethason-behandelter Maushaut mit Hilfe der Primer HSP27 up und HSP27 down (s. Kap. 2.4)

2.3.2 Matritzen für die in vitro Transkription

Kollagenase-3:	EcoRI/DraI Fragment (359 bp) der Maus-Kollagenase-3-cDNA (Positionen 295-656) im Plasmid pGem4 (Promega, Mannheim) (Gack et al., 1995)
<i>Itm2a</i>	SalI/NotI Fragment (1,6 kb) der Maus- <i>Itm2a</i> -cDNA im Plasmid pSPORT1 (Life Technologies, Eggenstein)

Alkalische Phosphatase	2,2 kb Fragment der Ratten-Alkalischen-Phosphatase-cDNA im Plasmid pBlueskript SK (Stratagene, Heidelberg) wurde freundlicherweise von Dr. Rodan (Weinreb et al., 1990) zur Verfügung gestellt
Osteocalcin	EcoRI/PstI Fragment (0,5 kb) aus der Maus-Osteocalcin-cDNA im Plasmid pBlueskript SK (Stratagene, Heidelberg) (Celeste et al., 1986)

2.3.3 Reporter-Konstrukte für den „CAT-Assay“

MMTV-CAT und 2xGRE, sowie RSV-CAT wurden beschrieben in (Cato et al., 1988) und (Oehler und Angel, 1992).

2.4 Primer für PCR

β-Actin "antisense"	5'-TGGACAGTGAGGCCAGGATG-3'
β-Actin "sense"	5'-TCGTGCGTGACATCAAAGAG-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus cDNA ein 429 bp großes DNA-Fragment.	
Col24	5'-GGTCACACTTCTCTGGT-3'
Col29	5'-GTTTTCCCTAGAACAACACTC-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus cDNA ein 541 bp großes DNA-Fragment.	
OC 91	5'-AGATCAAAACCAACCCGGTGAG-3'
OC 92	5'-CGAGAGGCAAGGGCGGGGACG-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus cDNA ein 527 bp großes DNA-Fragment.	
Proliferin 5'	5'-TTGAATTAGCCGGCAGTTTTGTC-3'
Proliferin 3'	5'-TGCGAGCATCTTCATTGTCAG-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus cDNA ein 426 bp großes DNA-Fragment.	
PGX-3 up	5'-TACATGAGGCGGCAGGCAGC-3'
PGX-3 down	5'-CTTGGGGGCTCAGGAGGGTC-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus cDNA ein 484 bp großes DNA-Fragment.	
HSP27	5'-GATCAAGCTTTCGGGGTGCC-3'
HSP27	5'-CTCGAAAGTAACCGGAATGG-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus cDNA ein 477 bp großes DNA-Fragment.	
FosRT1	5'-TTCCTACTACCATTCCTCCAGCCG-3'
FosRT2	5'-GCCATCTTATTCCGTTCCCTT-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus genomischer DNA ein 1527 bp großes DNA-Fragment aus dem Wildtyp-Fos-Locus und ein 1935 bp großes DNA-Fragment aus dem c-Fos-Knock-Out-Locus.	
GR 5'	5'-GTGTCTTGATGATAGTCTGCTC-3'
GR 3'	5'-CCATTACCTCCAGGTTTCATTC-3'
Dieses Primerpaar amplifiziert aus genomischer DNA ein 0,24 kb großes DNA-Fragment aus dem GR-Lokus.	

2.5 Antikörper

α GR (M-20; sc-1004)

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.6 Mausstämme

Adulte Mäuse der Mausstämme C57BL/6 und A/J wurden von BRL, Schweiz, bezogen. *c-fos*-Knock-Out Mäuse wurden durch Dr. Agamemnon Grigoriadis, Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie, Wien, zur Verfügung gestellt und wurden seit 1995 kongen in den C57BL/6 Hintergrund eingekreuzt. GR^{dim}-Mäuse wurden von Holger Reichardt, DKFZ, Heidelberg, zur Verfügung gestellt und befanden sich in einem gemischten Stammhintergrund von 129Sv und C57BL/6.

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor des DKFZ unter SPF-(specific pathogen free)-Bedingungen in einem 12 stündlichen Lichtzyklus gehalten. Die Tiere hatten freie Verfügung über Futter (Purina Chow 5008) und Wasser.

Paraffinschnitte von Geweben von Mäusen (genetischer Hintergrund C57BL/6), bei denen das endogene *Cbfa-1* Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde (homozygot), wurden von Dr. Stefan Mundlos, Uniklinik, Mainz, und Dr. Michael Owen, ICRF, London, zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

3.1 Behandlung von Nukleinsäuren

3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml (doppelsträngiger) DNA, 40 µg/ml Ribonukleinsäure (RNA) oder 20 µg/ml Oligonukleotid DNA.

3.1.2 Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung einer Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde diese mit Wasser auf mindestens 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1x TNE gesättigt; 1x TNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) nochmals gut gemischt. Die Phasen wurden durch 3 min zentrifugieren wieder getrennt. Die Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) auf die gleiche Weise extrahiert.

3.1.3 Präzipitierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die Nukleinsäurelösung wurde mit Natriumacetat (pH 4.8) bis zu einer Endkonzentration von 0.25-0.3 M versetzt. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol wurde 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei 13000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde das Präzipitat noch mal mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator („speed vac“) getrocknet.

3.1.4 DNA/RNA-Gelelektrophorese

3.1.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8% bis 1,5% Agarose-Gele benutzt. Es handelt sich hierbei um Mini-Gele: Gelvolumen 50 ml, Puffervolumen 100 ml, Taschenvolumen 30 µl. Das Gel war völlig von Puffer bedeckt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1x TBE (90 mM Tris pH 8.3, 90 mM kristalline Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8) gegeben und 5 min im Mikrowellenherd aufgeköcht. Für „low melting“ Gele wurde Agarose Typ VII verwendet. Nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

wurde das Gel gegossen und ca. 30 min abkühlen gelassen. Nach Eingießen des Laufpuffers (1x TBE) wurde der Kamm entfernt und die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 100 V. Die DNA-Banden werden unter UV (256 nm) sichtbar gemacht.

3.1.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Diese Gele dienen zur Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten unter denaturierenden Bedingungen, hervorgerufen durch die 8,3 M Harnstoffkonzentration und die hohe Temperatur während der Auftrennung. Es wurden 20x39 cm große Glasplatten und 0.1 mm dicke Abstandhalter benutzt. Die Glasplatten wurden gut poliert und mit den 0,1 mm dicken Abstandhaltern zusammengebaut. Für ein 6% Gel werden 30 ml einer 6% Acrylamid-Lösung mit 8,3 M Harnstoff² benötigt. Nach Zufügen von 30 µl TEMED und 300 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung wurde das Gel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach etwa 30 min ist das Gel polymerisiert.

Die Gelplatte wurde dann senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und zur gleichmäßigen Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienen je etwa 375 ml 1x TBE. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einer Spritze ausgespült. Zur Erwärmung des Gels diente ein Vorlauf von 30 min bei 25 bis 30 Watt. Die in 3 µl Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7,8, 99% Formamid, 0,03% Xylencyanol, 0,03% Bromphenolblau) gelösten Proben wurden 3 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Nachdem die Taschen nochmals ausgespült wurden, wurden die Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25 bis 30 Watt bis zur gewünschten Laufstrecke. Mit einem dünnen Spatel wurde dann die Dimethyldichlor-Silan beschichtete Glasplatte abgehoben. Durch sofortiges Einlegen in 10% Essigsäure für 10 min wurde der Harnstoff herausgelöst. Das Gel wurde dann nach Spülen mit Wasser für etwa zwei Stunden bei 80°C auf der Glasplatte getrocknet und anschließend bei -80°C autoradiographiert.

² 100 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung werden mit 50 ml 10x TBE (1x: 90 mM Tris pH 8,3, 90 mM kristallisierte Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8,0) versetzt und darin 250 g Harnstoff gelöst. Die mit Wasser auf 500 ml aufgefüllte Lösung wird noch steril filtriert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt]

3.1.5 Transformation von Bakterien

3.1.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm XL1 blue oder K12/CMK 603 wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6 ml Kultur mit PSI-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD (Optische Dichte) von 0,28 (bei 600 nm) inkubiert. Mit diesem Ansatz wurde eine 100 ml Kultur mit PSI-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD von 0,48 (bei 600 nm) wachsen gelassen. Danach wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Nach Sedimentation der Bakterien bei 1500 rpm für 10 min bei 4°C, wurden diese in 10 ml vorgekühltem (4°C) TFBI-Puffer (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, pH 7.2 mit 0.2 M Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert) für 3 h auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C sedimentiert, in 10 ml vorgekühltem TFBII-Puffer (10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin) resuspendiert und in 100 µl Aliquots abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.1.5.2 Transformation von kompetenten Zellen

Ein 100 µl Aliquot mit kompetenten Bakterien (s. 3.2.1) wurde auf Eis aufgetaut, 5 µl des Ligationsansatzes zugemischt, und eine Stunde auf Eis gestellt. Nach 90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis wurden 3 ml SOC-Medium (0.5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben und 60 min bei 37°C geschüttelt. 200 µl der Bakteriensuspension wurden danach auf eine Selektiv-Agarplatte ausgestrichen.

3.1.5.3 Herstellung von Selektiv-Agarplatten

In einem 2 l Kolben wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agarplatten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme entfernt. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert.

3.1.6 DNA-Präparation

3.1.6.1 Plasmid DNA-Mini-Präparation

Die Bakterien wurden in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden 5 min bei 4000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 0.1% Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris pH 8.0) und 20 µl Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Minute Kochen wurde die Lösung 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem Zahnstocher entfernt, zum Überstand wurden 8 µl CTAB-Ionenaustauscher (5% CTAB in 500 mM NaCl) zugegeben. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000xg wurde der Überstand verworfen, das Sediment in 300 µl 1.2 M NaCl aufgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 750 µl Ethanol 10 min bei -70°C gefällt. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde dann 10 min bei 13000 rpm pelletiert und nochmals mit 70% Ethanol gewaschen.

3.1.6.2 Plasmid DNA Präparation

Die Bakterien wurden in 2 ml Nährmedium (L-Broth) mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) etwa 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. 500 µl dieser Vorkultur dienten zum Animpfen von 200 ml Selektionsmedium (TY+ 100 µg/ml Ampicillin). Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 37°C im Erlenmeyer-Kolben geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 5000 rpm sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A) resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) für 5 min Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysate wurde mit 10 ml P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) neutralisiert (10 min bei Raumtemperatur), bei 4°C und bei 10000 rpm für 30 min zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip 500-Säulen (Quiagen, Hilden) laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

3.2 Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien

Um Embryonen eines bestimmten Embryonalstadiums zu erhalten wurden weibliche Mäuse eines Wildtyp- oder eines Heterozygoten Knock-Out-Stammes (*c-fos*^{-/-} und *GR*^{dim/+}) mit einem Lebendgewicht von ca. 20 g wurden mit männlichen Tieren des jeweiligen gleichen

Mausstammes am späten Nachmittag verpaart. Bei Vorhandensein eines Vaginalpfropfs ("vaginal plug") am folgenden Morgen wurde der Mittag als Stadium der Embryonalentwicklung *0.5 dpc* („0.5 days post coitum“) angenommen, da die cervixstimulierte Ovulation der weiblichen Mäuse, die in einem 12 Stundentag-Rhythmus gehalten werden, in der Mitte der Dunkelphase stattfindet.

3.3 Genotypisierung von Knock-Out-Mäusen

3.3.1 Isolation von genomischer DNA

Für die Bestimmung des Genotyps der Embryonen oder geborenen Nachkommenschaft der gehaltenen *c-Fos*-Knock-Out-Linie und der GR^{dim} -Mauslinie wurde zunächst aus Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Tiere genomische DNA isoliert. Dazu wurden die Biopsien in 400 μ l „Tailbuffer“ (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) und Zugabe von 25 μ l Proteinase K (10 mg/ml) bei 55° C über Nacht verdaut. Durch Zugabe von 250 μ l 6 M NaCl-Lösung und anschließendem 2 minütigen Schütteln die Proteine ausgefällt und durch Zentrifugation (13.000 rpm, 7 min) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 500 μ l Isopropanol versetzt und für 2 min durch Schütteln bei RT inkubiert. Durch 7 minütige Zentrifugation wurde die ausgefallene genomische DNA pelletiert, mit 80% Ethanol gewaschen, für eine Stunde an der Luft getrocknet und in 400 μ l TE (pH 8,0) aufgenommen.

3.3.2 PCR mit Genlokus-spezifischen Primern zur Identifikation des Genotyps

In der daran anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu Bereichen des zu untersuchenden Gen-Locus sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Perkin-Elmer-Cycler (Norwalk, USA): 1/10 Volumen 10xPCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM $MgCl_2$), 1/10 Volumen 10 x dNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10xPrimer (100 pmol/ μ l), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen 25 μ l aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94° C für 1 Minute, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur für 1 Minute und die DNA-Synthese bei 72° C für 1-2 Minuten. Die Amplifikationsprodukte (nach 35 Zyklen) wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

Zur Identifikation des Genotyps der Mäuse aus der c-Fos-Knock-Out-Linie wurde durch PCR mit c-Fos spezifischen Primern ein 1527 bp großes Fragment kennzeichnend für das Wildtyp-Allel und ein 1935 bp großes Fragment kennzeichnend für das Knock-Out-Allel amplifiziert.

Zur Identifikation des Genotyps der Mäuse aus der GR^{dim}-Linie wurde durch Verwendung von GR-spezifischen Primern ein 0,24 kb großes Fragment amplifiziert. Um zwischen Wildtyp- und mutierten Allel zu unterscheiden, wurde das Fragment mit dem Restriktionsenzym BsrGI verdaut, wobei das Wildtyp-Allel eine 0,24 kb Bande ergab, während das mutierte Allel zwei fast gleich große 0,12 kb Banden ergaben.

3.4 Zellkultur-Experimente

3.4.1 Allgemeine Arbeitsgänge

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitsbank der Klasse 2 (Baker) durchgeführt.

Die Inkubation der adhärent auf Plastikschalen wachsenden Zellen (primäre und immortalisierte MEF und primäre Osteoblasten) fand im Brutschrank bei 37° C und 6% CO₂ statt.

3.4.1.1 Trypsinieren von Zellen

Bei 80% Konfluenz, wurden die Zellen unter Verdünnung in neue Schalen transferiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin überschichtet und bis zum beginnenden Abschwimmen bei 37° C oder RT inkubiert (ca. 5 Minuten). Durch Zugabe von FCS enthaltendem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (900xg, 3 Minuten) sedimentiert und nach Absaugen des Überstands in einem entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer. Danach wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausgesät.

3.4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und gezählt, die Zellsuspension in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt und in diesem für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment (ca. 1×10^6 Zellen) in 1 ml Einfriermedium (20% FCS-Medium + 10% DMSO) resuspendiert und in ein Einfriereröhrchen transferiert. Die

Zellen wurden anschließend für 1 Stunde auf Eis inkubiert, dann auf -80°C gebracht. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C .

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen schnell auf 37°C erwärmt, in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium überführt, 3 Minuten bei 900xg sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes in Medium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

3.4.2 Präparation von primären Osteoblasten der Calvaria (nach Shalhoub et al., 1992)

Für die Präparation von Calvariae wurden Mäuse 9 Tage nach der Geburt (P9) durch Genickbruch getötet und durch Eintauchen in 100% Ethanol desinfiziert. Mit sterilem Präparationsbesteck wurde unter der Sterilbank die Kopfhaut entfernt und die Calvaria freipräpariert. Nach Entfernen des Nasenknorpels und der Dura mater encephali wurden die Calvariae in HBSS („Hanks' balanced salts solution“) zwischen gelagert. Die Calvariae wurden darauffolgend einer sequentiellen proteolytischen Verdauung mit bakterieller Kollagenase und Trypsin unterzogen. Dabei wurde zunächst die HBSS Lösung entfernt und die Calvariae mit einer Verdaulösung (2 mg/ml Collagenase A von Roche Diagnostics-Mannheim, 0.25% Trypsin (Gibco) in 1 X PBS) bei 37°C unter kräftigem Schütteln für 20 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Calvariae mit frischer Verdaulösung bei 37°C unter kräftigem Schütteln für 40 min inkubiert. Der Überstand wurde wiederholt verworfen und die Calvariae mit frischer Verdaulösung bei 37°C unter kräftigem Schütteln für 90 min inkubiert. Dieser dritte Überstand wurde in reines FCS transferiert und für 8 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in Medium (MEM, 10% FCS, 1x Penicillin/Streptomycin, 1 X Non Essential Aminoacids, alle Reagenzien von Life Technologies, Eggenstein) aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro 10 cm Gewebekulturschale ausgesät und bei 37°C und 6% CO_2 kultiviert. Nach Erreichen von 100% Konfluenz der Zellen (ca. 7-10 Tagen) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Differenzierungsmedium (BGJb-Medium mit 10% FCS, Penicillin, Streptomycin, 1 X Non Essential Aminoacids, 10 mM β -Glycerolphosphat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ascorbinsäure) versetzt. Die Zellen wurden in diesem Medium für weitere 2 Wochen kultiviert (Mediumwechsel alle drei Tage) bis zur „nodul-formation“ (Bildung von kleinen Mineralisationsknoten). In diesem Differenzierungszustand wurden die Zellen mit 10^{-8} M PTH (rat fragment 1-34, Sigma, Deisenhofen) und mit 10^{-7} M Dexamethason (Sigma,

Deisenhofen) behandelt und für vier Stunden inkubiert und danach für die Expressionsanalyse geerntet (s. Kap. 3.6 ff.).

3.4.3 Präparation von primären embryonalen Fibroblasten

Für die Präparation von primären Fibroblasten wurden Mausembryonen zum Stadium 14.5 dpc präpariert, durch Dekapitierung getötet, und nach Transfer unter die Sterilbank die Leber entfernt. Der Corpus wurde in DMEM-Medium (mit 20% FCS, Penicillin/Streptomycin, 1 X Glycin) durch Saugen in sterilen 2,5 ml Einwegspritzen 21-Gauche-Kanülen in kleine Gewebefragmente und Zellgruppen zerkleinert. Die zerkleinerten Teile eines Embryos wurden in einer 10 cm Schale ausgesät und in DMEM-Medium im Brutschrank über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden Gewebefragmente durch Waschen mit PBS entfernt und die angewachsenen primären Maus-embryonalen Fibroblasten (MEF) durch Gabe von neuem DMEM-Medium weiterkultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen durch Trypsinierung passagiert (vgl. Kap. 3.4.1.1) und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 10 cm Schale ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde kryokonserviert (vg. Kap. 3.4.1.2), ein weiterer Teil für die Immortalisierung verwendet (s. unten) und der dritte Teil mit 10^{-7} M TPA und/oder 10^{-7} M Dexamethason Agenzien behandelt und nach 6 Stunden Inkubation für die Expressionsanalyse geerntet (s. Kap. 3.6 ff.).

3.4.4 Immortalisierung von embryonalen Fibroblasten nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963)

MEF wurden alle drei Tage durch Trypsinierung passagiert und in einer spezifischen Dichte von ca. 3×10^4 Zellen pro cm^2 ausgesät. Ab der siebten bis zehnten Passage wurde das exponentielle Wachstum durch eine Wachstumskrise abgelöst. Durch stetes Weiterpassagieren entstanden nach 15 bis 17 Passagen immortalisierte Zelllinien, die kryokonserviert oder für transiente Transfektionsexperimente (s. Kap. 3.4.5) verwendet wurden.

3.4.5 Transiente Transfektion und „CAT-Assay“

3.4.5.1 Transiente Transfektion (nach Graham und Eb, 1973)

18 Stunden vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsiniert und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 10 cm Petrischale ausgesät. Für den Transfektionsmix wurden $7,5 \mu\text{g}$ DNA in 250 mM CaCl_2 gelöst und dann Tropfen für Tropfen mit dem gleichen Volumen 2xHBS (280 mM NaCl; 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 50 mM HEPES) gemischt. Nach 20 min wurde das Calciumphosphat/DNA-Präzipitat tropfenweise, über die

Zellkulturschale verteilt, ins Medium gegeben. Die Zellen wurden 8-14 Stunden lang im Brutschrank bei 37° C und 6% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit je ca. 5 ml PBS (Entfernen des Präzipitates) wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen vor der Induktion für weitere 8-14 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10⁻⁷ M Dexamethason für 12 Stunden inkubiert und danach für den „CAT-Assay“ geerntet.

3.4.5.2 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität („CAT-Assay“)

Transient transfizierte und Dexamethason behandelte Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gespült. Mit Hilfe eines Gummispatels wurden die Zellen in PBS abgeschabt und bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl 0,25M Tris-HCl, pH 7,8 resuspendiert und 3x schockgefroren, um die Zellen aufzubrechen. Durch anschließendes 10minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm ließen sich Zelltrümmer und Zellextrakt voneinander trennen. Von dem in ein neues Reaktionsgefäß überführten Überstand wurden 5 µl zur Proteinbestimmung eingesetzt (s. Kap. 3.4.5.3).

20-100 µg Proteinlösung wurden mit 250 mM Tris-HCl, pH 7,8 auf ein Volumen von 80 µl gebracht, mit 1,25 µl ¹⁴C-Chloramphenicol und 20 µl 4 mM Acetyl-CoA (in 250 mM Tris) versetzt und für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat gestoppt.

Nach Evaporation des Ethylacetats in der Vakuumzentrifuge „speed-vac®“ wurde das Pellet in 18 µl Ethylacetat gelöst, auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-(DC) Platte aufgetragen und in eine Chromatographie-Kammer gestellt, die 150 ml Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel enthält. Nach 45 min wurde die DC-Platte aus der Kammer genommen und getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 16 h.

Die Filmentwicklung zeigte die unterschiedlich acetylierten Derivate des Chloramphenicol: das nicht-acetylierte Chloramphenicol ist am wenigsten polar und wandert daher am langsamsten. Die 1'-acetylierte, 3'-acetylierte und die 1',3'-diacetylierten Formen sind stärker polar und laufen deshalb schneller.

Zum Zwecke der Auswertung wurden die acetylierten und nicht-acetylierten Formen aus der DC-Platte ausgeschnitten, in Szintillationsröhrchen gegeben und diese mit 5 ml Emulsifier Safe® überschichtet. Nach Messung im Szintillationszähler (1 min) konnte berechnet werden, wieviel Prozent des Chloramphenicols in seine acetylierte Form umgesetzt wurde.

3.4.5.3 Proteinbestimmung mit der Biorad-Methode

Aus einer Proteinlösung wurden 5 µl entnommen und mit 200 µl einer 1:5 mit H₂O verdünnten „Proteinassay-Lösung“ der Firma Biorad vermischt und die Absorption spektrometrisch bei 600 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve, welche durch gleichzeitiges Messen bekannter Mengen an BSA („bovine serum albumine“) erstellt worden war, ließ sich die Konzentration der Proteinlösung bestimmen.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Gewebeentnahme aus adulten Mäusen und Isolation der Mausembryonen für die Expressionsanalyse

Die adulten Mäuse wurden, sowohl zur Gewebeentnahme, als auch zur Isolation von Embryonen durch Luxation der Halswirbelsäule getötet und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Die zu untersuchenden Gewebe wurden (Herz, Niere, Hoden, Milz, Leber, Uterus, Knie und Ellbogen) sofort entnommen. Diese wurden 3 mal in PBS gewaschen. Für die RNA-Analyse wurden die aus Mäusen isolierten Embryonen und Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Für die ISH-Analyse wurden Gewebe und Embryonen wurden über Nacht in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (4% Paraformaldehyd in 1x PBS) bei 4°C fixiert.

Es wurden nur postimplantierte Embryonen (ab Tag E 5.5) isoliert. Dabei wurden bei frühen Stadien (5.5 dpc, 6.5 dpc, 7.5 dpc) das Uterusstroma mit dem darin befindlichen embryonalen Geweben intakt gelassen. Bei späteren Stadien wurden die Föten von sämtlichen embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) getrennt, sowie die Plazenten an der Nabelschnur (ab Stadium 12.5 dpc) entfernt. Die Plazenten von den Stadien 14.5 dpc bis 16.5 dpc wurden getrennt isoliert.

Verknöcherte Strukturen, wie Schädel, Röhrenknochen und Wirbelsäule wurden nach der Fixierung in 0,5 M EDTA/PBS pH 7,4 5 Tage bis 2 Wochen dekalzifiziert, bevor sie über die steigende Alkoholreihe in Ethanol überführt wurden.

3.5.2 Dexamethason-Behandlung von schwangeren Mäusen

Vom Tag 11.5 dpc bis 14.5 dpc (Tage nach Vaginalpfropf s. 3.2) wurde jeweils alternierend in die rechte und linke Hüfte der Muttertiere (A/J-Mäuse) 0,15 mg Dexamethason in 50 µl 0,85% NaCl-Injektionslösung intramuskulär injiziert. Die behandelten Tiere wurden am Tag

15.5 getötet und die Embryonen isoliert (vgl. Kap. 3.5). Diese wurden nach 4%iger Paraformaldehydfixierung über Nacht über eine steigende Alkoholreihe (s. Kap. 0) in absolutes Ethanol überführt und bei -20° C gelagert. Die Embryonen wurden in Paraffin eingebettet. Mit den davon hergestellten histologischen Schnitten wurde eine *in situ* Hybridisierungsanalyse durchgeführt (vgl. Kap. 3.6.5). Die Kontroll-behandelte Gruppe und die Dexamethason-behandelte Gruppe bestand aus jeweils zwei Muttertieren, die jeweils 7 bis 10 Embryonen lieferten.

Jeweils zwei weitere Kontroll- und Dexamethason-behandelten Muttertiere wurden erst nach dem Wurf (Tag 19) getötet, um das Auftreten von Gaumenspalten bei den neugeborenen Mäusen zu erfassen und damit eine Kontrolle für die teratogene Wirkung der verwendeten Dexamethason-Dosis zu erhalten.

3.5.3 PTH/Dexamethason-Behandlung von adulten Mäusen

3.5.3.1 Calvaria-Injektion nach (Pollock et al., 1996)

Adulte weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6 wurden mit Kethanest (100 mg/kg Körpergewicht) und Rompun (0,2 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Anschließend wurden 50 µl 0,9% NaCl-Lösung als Kontrolle oder 20 µg PTH („rat fragment 1-34“) und/oder 50 µg Dexamethason („water soluble“) subkutan über die Mittellinie der Calvaria injiziert. Jede Behandlungsgruppe bestand aus zwei Tieren. Die Tiere wachten nach einer Stunde auf und wurden 8 Stunden nach der Injektion getötet. Die Calvariae wurden präpariert und für die ISH-Analyse in 4% PFA fixiert oder für die RNA-Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Jede Behandlungsgruppe bestand aus zwei Tieren.

3.5.3.2 Systemische Behandlung

6 Wochen alten weiblichen Mäusen vom Stamm A/J wurden 200 µl NaCl-Lösung als Kontrolle oder 3 mal im Abstand von 6 Stunden jeweils 20 µg PTH und/oder einmal 50 µg Dexamethason subkutan unter die Nackenhaut injiziert. Nach 16 bis 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Tiere getötet und die Femuralknochen freipräpariert und für die RNA-Präparation in flüssigen Stickstoff Schockgefroren und bei -80° C gelagert. Jede Behandlungsgruppe bestand aus zwei Tieren.

3.5.4 Topische Behandlung der Rückenhaut von Mäusen mit TPA und Dexamethason

Der Rücken von 8 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6 oder 6 Monate alte Wildtyp- und GR^{dim}-Geschwister der GR^{dim}-Mauslinie wurde drei Tage vor der Behandlung auf der Rückenhaut rasiert (ca. 9 cm² rasierte Rückenfläche). Die Behandlung erfolgte mit einer Pipette durch Aufbringen von 100 µl Aceton als Kontrolle, 0,1 bis 50 nmol TPA in 100 µl Aceton, 50 µg Dexamethason in 100 µl Aceton oder 10 nmol TPA und 50 µg Dexamethason gemeinsam in 100 µl Aceton. Jede Behandlungsgruppe bestand aus zwei Tieren. Nach 1 bis 12 Stunden wurden die Tiere getötet, eine kleine Biopsie der Rückenhaut mit einem Stanzer („Biopsy Punch“, 4 mm Durchmesser,) für die ISH-Analyse in 4% PFA fixiert und der Rest der unbehaarten Rückenhaut präparatorisch entfernt. Die abgezogene Haut, die aus Epidermis, Dermis, subdermalem Fettgewebe und dem *Panniculus carnosus* besteht wurde für die RNA-Präparation in flüssigen Stickstoff Schockgefroren und bei -80° C gelagert.

3.5.5 Ohrödem-Bildungsassay

Auf das Außenohr von 6 Monate alten Mäusen der GR^{dim}-Mauslinie wurden 10 µl acetonische Lösung mit einer Pipette aufgebracht, die entweder 1 nmol TPA, 1 nmol TPA und 5 µg Dexamethason enthielt oder als reines Aceton als Kontrolle diente. Nach 6 Stunden wurden die Mäuse getötet, mit einem stabilen Stanzer (Durchmesser, 8 mm, Herkunft: Werkstatt des DKFZ) eine 50 mm² des Ohres ausgestanzt und auf einer Feinwaage gewogen.

3.6 Expressionsanalysen

3.6.1 RNA-Isolierung (modifiziert nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Zellen und bei -80° C gelagertes Gewebe wurden mit einem Volumen (1-3 ml) RNA-Clean™ (AGS, Heidelberg, Guanidinthiocyanat mit Phenol) versetzt. Um die genomische DNA zu scheren, wurden die RNA-Clean™ behandelten Zellen 10 mal durch eine Injektionskanüle (21 Gauche) gesaugt und das RNA-Clean™ behandelte Gewebe durch einen Ultraturrax bei 16.000 rpm für drei Minuten zerkleinert. Die Homogenisate wurden mit 1/10 Volumen Chloroform versetzt kräftig gevortext und auf Eis für 15 min inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4° C bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einem Volumen von -20° C vorgekühlten Isopropanol versetzt und für 1 Stunde bei -20° C inkubiert. Die gefällte Gesamt-RNA wurde durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert und mit 80% Ethanol

gewaschen und in „Aqua ad injectabilia“ (Braun, Melsungen) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Ein Aliquot von $4\ \mu\text{l}$ wurde für die Extinktionsmessung zur Bestimmung der Konzentration verwendet (vg. Kap. 3.1.1).

3.6.2 RT-PCR

Jeweils $0,5\text{-}1,0\ \mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von $20\ \mu\text{l}$ mit einem 18mer Oligo(dT)nukleotid-Primer wie folgt revers transkribiert: $5\ \text{mM MgCl}_2$, $50\ \text{mM KCl}$, $10\ \text{mM Tris-HCl pH } 8,3$, $1\ \text{mM Desoxynukleotidtriphosphate}$, $50\ \text{pmol Primer}$, $2,5\ \text{U AMV-Reverse Transkriptase}$ sowie $1,7\ \text{U RNase-Inhibitor}$. Der Ansatz wurde $30\ \text{Minuten}$ bei 42°C inkubiert, danach $5\ \text{Minuten}$ bei 95°C denaturiert und schließlich auf Eis gestellt. In der daran anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Perkin-Elmer-Cycler (Norwalk, USA): $1/10$ Volumen $10\times\text{PCR-Puffer}$ ($500\ \text{mM KCl}$; $100\ \text{mM Tris pH } 8,4$; $15\ \text{mM MgCl}_2$), $1/10$ Volumen $10\times\ \text{dNTP-Lösung}$ (je $2\ \text{mM dATP}$; dCTP ; dGTP ; dTTP ; $\text{pH } 7,0$), je $1/10$ Volumen $10\times\text{Primer}$ ($100\ \text{pmol}$), $1\text{-}2\ \text{U Taq-Polymerase}$ und $10\text{-}500\ \text{ng Matrizen-DNA}$ wurden mit Wasser auf das Endvolumen ($20\text{-}25\ \mu\text{l}$) aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für $1\ \text{Minute}$, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur für $1\ \text{Minute}$ und die DNA-Synthese bei 72°C für $1\text{-}2\ \text{Minuten}$. Die Amplifikationsprodukte (nach $15\text{-}30$ Zyklen) wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

3.6.3 Northern Blot-Analyse

3.6.3.1 Gelelektrophorese von RNA

$15\ \mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurde in Denaturierungspuffer (21% deionisierte Glyoxallösung, 73% DMSO, $15\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4\ \text{pH } 6,9$) aufgenommen, für $8\ \text{min}$ bei 50°C inkubiert und anschließend für $5\ \text{min}$ auf Eis gestellt. Nach Zugabe von $1/6$ Volumen RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, $10\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $0,4\%$ Bromphenolblau, $0,5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid) wurden die Proben in einem $1,4\%$ Agarosegel in $10\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4\ \text{pH } 6,9$ aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für $2\text{-}3\ \text{Stunden}$ bei einem Stromfluß von $80\ \text{mA}$ bis die Bromphenolblaufront ca. $6\ \text{cm}$ weit gewandert war. Während der Elektrophorese wurde der Laufpuffer zwischen Anode und Kathode zirkuliert.

3.6.3.2 Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht fotografiert und die 18S- und 28S-RNA markiert. Das Gel wurde auf eine Glasplatte plaziert, worauf sich drei Lagen mit 10x SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Na₃Citrat x 2 H₂O) getränktes 3MM-Papier befanden, die in ein mit 10x SSC gefülltes Reservoir hineinragten. Auf das Gel wurde Luftblasen frei die Nylon-Membran (GeneScreen Plus®) gelegt, auf diese wiederum 3-lagig 3-MM-Papier (ebenfalls mit 20x SSC getränkt), über welches ein Kleenex-Stapel, der mit einem 1 kg schweren Gewicht beschwert wurde, geschichtet wurde. Mittels Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Membran transferiert. Das „Blotten“ erfolgte über Nacht; anschließend wurde die Membran in 2x SSC gewaschen. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Membran, wurde die Membran mit UV bestrahlt (Stratalinker 2400-Autocrosslink-Modus).

3.6.3.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Sondenherstellung wurde die "Random Primer"-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) benutzt. Hierbei wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen denaturiert und das Hybridisieren kurzer DNA-Stücke randomisierter Sequenzen an die resultierenden Einzelstränge erlaubt. Die hybridisierten Stücke dienen als Primer für die nachfolgende Polymerisation durch das Klenow-Fragment aus der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotidtriphosphate werden die entstehenden Doppelstränge radioaktiv markiert. Verwendet wurde das Protokoll des "rediprime-Kits" der Firma Amersham: 10-20 ng DNA-Fragment wurden in einem Volumen von 45 µl durch 5 minütige Inkubation bei 100°C und danach 5 minütiger Inkubation bei 4°C denaturiert und in ein rediprime-Röhrchen gegeben. Dieses enthält ein Lyophilisat aus Desoxynukleotidtriphosphaten, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Nach Zugabe von 5 µl α³²P-dCTP erfolgte eine Inkubation bei 37° C für 10 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Zur Trennung des markierten Fragments von nicht eingebauten Nukleotiden wurde der Ansatz über eine Sephadex-G50-Säule geleitet (Gelfiltration). Die Packung dieser Säule mit in TE äquilibriertem Sephadex-G50 und die chromatographische Auftrennung von Fragment und freien Nukleotiden erfolgte unter Zentrifugation bei 1000 rpm für jeweils 4 Minuten. Anschließend wurde 2x mit je 100 µl TE nachgewaschen. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide wurde durch Messen von 1 µl des Eluates im Szintillationszähler bestimmt.

3.6.3.4 Hybridisierung

Nach der kovalenten Fixierung der RNA an die Membran wurde diese in einer Röhre mit 15 ml Hybridisierungslösung („Church-Puffer“: 1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer, 7 % SDS) in einem Ofen bei 65°C unter Rotation für mindestens eine Stunde prähybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung durch 15 ml neue auf 65°C erhitze Hybridisierungslösung ausgetauscht und diese mit ca. 2×10^7 cpm radioaktiv-markierter Probe, die zuvor 5 Minuten bei 100°C denaturiert wurde, versetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotieren der Röhre wie folgt gewaschen: 2x 10 Minuten 2x SSC/0,1% SDS, dann 2x10 Minuten 1x SSC/0,1% SDS. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet. Sollte eine Membran nach Hybridisierung mit einer anderen Probe hybridisiert werden, so wurde die ursprüngliche Probe durch 10 minütige Inkubation in kochender 0,1% SDS-Lösung entfernt. Die erneute Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

3.6.4 Hybridisierung von „Mouse Atlas™ cDNA Expression Array“ Filtern mit radioaktiv-markierter cDNA

Polyadenylierte (poly(A⁺)-RNA wurde aus Gesamt-RNA von nicht behandelter und Dexamethason-behandelter Haut wurde durch Reinigung mit einer Oligo(dT)-Nukleotid enthaltenden Säule („Oligotex Spin Column“, Quiagen) gewonnen. In einem 10 µl Transkriptionsansatz wurden denaturierte 700 ng poly(A⁺) mit 20 mM DTT, 50 Units MMLV Reverser Transkriptase, Dexoxyribonukleotiden (1x Mix, Clontech, Heidelberg) und 35 µCi [α -³³P]dATP in einem Clontech-Reaktionspuffer bei 50° C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte wie beschrieben (s. Kap. 3.6.3.4) wobei 10^6 cpm cDNA Probe pro ml Hybridisierungslösung verwendet wurden. Die gewaschenen Filter wurden autoradiographiert. Die Unterschiede zwischen den Expressionsmustern wurde mit Hilfe der Software „Array Vision Software Module (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada) analysiert.

3.6.5 In Situ Hybridisierung an Gewebeschnitten (nach Wilkinson und Green, 1990)

3.6.5.1 Präparation der Gewebeschnitte

Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und Glasfärbegestellen.

Die Objektträger wurden durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 10% HCl/70% Ethanol, Wasser und 96% Ethanol gespült und im Ofen 5 min bei 150°C getrocknet. Die Beschichtung erfolgte durch 10 sekündiges Eintauchen der Objektträger in eine 2% TESPA/Aceton-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 100% Aceton und einmal Waschen in Wasser wurden die Objektträger 15 min bei 42°C im Ofen getrocknet.

Die Deckgläschen wurden in eine Silikon-Lösung getaucht und bei RT getrocknet. Dann wurden sie in 100% Ethanol durch kurzes Eintauchen gewaschen und ebenfalls bei RT trocknen gelassen. Die Deckgläschen wurden in einem Becherglas gesammelt und im Ofen bei 160°C gebacken.

Zur Beseitigung von Spuren von RNase wurden die Glaskästen und Glasfärbegestelle im Ofen bei 250°C für zwei Stunden gebacken.

Einbetten und Anfertigen von histologischen Schnitten der Embryonen und Gewebe

Die fixierten Gewebe wurden mit einer Pinzette in eine Einbettkassette transferiert und in einem 1 Liter Becherglas 4 bis 5 h in 600 ml PBS und anschließend für die gleiche Dauer und im gleichen Volumen in einer 0.83%-igen NaCl-Lösung gewässert. Danach wurden sie in einem Becherglas für 5 h unter ständigem Rühren in 50%-igem Ethanol gehalten. Die weitere Entwässerung und die darauffolgende Einbettung erfolgte in einem 2 Liter Gewebeeinbettautomaten (Shandon, Frankfurt) mit folgenden Schritten:

70% Ethanol:	1x 1 h
100% Ethanol:	3x 1 h
Aceton:	2x 1 h
Xylol:	1x 2 h
Xylol/Histowax (1:1) bei 59°C:	1x 3 h:
Histowax bei 59°C:	1x 3 h

Nach Ablauf dieser Prozedur wurden die Gewebe aus den Kassetten herausgenommen und in vorgewärmte Einbettformen (59°C; Reichert und Jung, Nußloch) gelegt. Die Einbettformen wurden dann mit flüssigem Wachs (Histowax; 59°C) aufgefüllt und eine Einbettkassette daraufgedrückt. Nach Erkalten des Wachses wurden die Wachsböcke aus den Einbettformen genommen. Das Loslösen des Wachsblockes aus der Einbettform wurde, nachdem das Wachs auf Raumtemperatur abgekühlt war, durch Abschrecken auf Eis unterstützt.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Wachsböcke in die Halterung eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2035, Reichert und Jung, Nußloch) eingespannt und parallel

zum Messer ausgerichtet. Es wurden dann Schnitte von 6 μm angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42°C geätzt und auf die beschichteten Objektträger transferiert.

3.6.5.2 Radioaktive Markierung von RNA durch *in vitro* Transkription.

Die *in vitro* Transkription wurde zur Herstellung von „antisense“ und „sense“ RNA-Sequenzen von einem Transkriptionsvektor (pGEM-4, Promega, Mannheim; pBluescript KS oder SK, Stratagene, Heidelberg; pSPORT, Life Technologies, Eggenstein) durchgeführt. Die Transkriptionsvektoren besitzen zwei verschiedene Promotorsequenzen für Phagen-RNA-Polymerasen (SP6, T7 bzw. T3). Zwischen den Promotorsequenzen liegt die „multiple cloning site“ (MCS), in welche das cDNA Fragment kloniert worden war. Die cDNA-Sequenz wird nun an beiden Seiten von den Promotoren flankiert, so daß eine „sense“- und „antisense“-Transkription möglich wird. Durch Linearisierung der Transkriptionsplasmide mittels Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungsstellen in der MCS distal von den Promotorsequenzen liegen, wurde der nicht für die Transkription benötigte Promotor von der cDNA-Sequenz abgetrennt. Dadurch konnten durch zwei Linearisierungsansätze von einem Transkriptionsvektor zwei Matrizen hergestellt werden, die jeweils für die „sense“ oder „antisense“ Transkription benutzt werden konnten. Das „sense“-Transkript wurde als Kontrolle für das Vorhandensein von Hintergrundsignal verwendet.

Die *in vitro* Transkription wurde in Anwesenheit von α -³⁵S-UTP und unmarkiertem ATP, CTP und GTP durchgeführt.

Linearisierung der Transkriptions-Plasmide

Zur Linearisierung wurde eine wässrige Plasmid-DNA-Lösung durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salz-Lösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu, entsprechend den Herstellerangaben, eingestellt. Pro μg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2 h.

Nach dem Verdau wurden die linearisierten Plasmide mit Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Nach dem Waschen und Trocknen der DNA wurden sie in sterilem Wasser gelöst und ihre Konzentration auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

***In vitro* Transkription**

Zur radioaktiven Markierung des Transkripts wurde α -³⁵S-UTP als Nukleotid verwendet. In einem 20 μ l Transkriptionsansatz wurden 0.5 μ g/ μ l DNA in 1x TSC-Puffer (40 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM NaCl, 4 mM Spermidin, 50 μ g/ml BSA) mit 20 mM DTT, 2 U RNasin, 625 μ M rNTPs (ohne UTP), 50 μ Ci α -³⁵S-UTP und 30 U Phagenpolymerase (T7, T3 oder SP6) inkubiert.

Darauf wurde die Plasmid DNA 15 min bei 37°C unter Zugabe von 7.5 μ g tRNA und 3 U RQ1 DNase verdaut. Es folgte eine Phenol/Chlorform-Extraktion, um die Proteine zu extrahieren. Das RNA-Transkript wurde zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide zweimal mit 2 M NH₄Ac und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Nach der letzten Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde das Pellet getrocknet und in 50 μ l 100 mM DTT aufgenommen. 1 μ l davon wurde in 3 ml Szintillationslösung gemessen, 2 μ l wurden auf einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die restliche Probe wurde wieder in 2 M NH₄Ac und 2,5 Volumen Ethanol aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

3.6.5.3 Vorbehandlung der Gewebeschnitte: „Prähybridisierung“

Bei dieser Behandlung wurden die angefertigten Schnitte für die Hybridisierung mit der RNA-Probe derart vorbereitet, daß die aufgetragene Probe in das Gewebe eindringen kann, unspezifische Bindungen vermieden werden und das RNA:RNA-Hybrid nicht aus dem Gewebe diffundieren kann.

Die Objektträger mit Gewebeschnitten, die zur Hybridisierung vorgesehen waren, wurden in ein Glasfärbegestell transferiert. Die Prähybridisierung der Schnitte erfolgte durch Eintauchen der Gestelle in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen:

Um die Schnitte zu entwachsen wurden die Färbegestelle je 2x 10 min in Xylol inkubiert. Durch die folgende absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte gewässert (100% , 95%, 90%, 80%, 70%, 30% Ethanol, je 2 min). Nach zwei Waschrufen in 1x PBS und 0.83% NaCl (je 5 min) wurden die Schnitte 20 min in 4%-igem Paraformaldehyd/1x PBS fixiert. Nach zweimal Waschen in 1x PBS (je 5 min) erfolgte ein Verdau im Gewebe mit Proteinase K (10 mg/ml, Endkonzentration: 500 μ l/250 ml) in 20 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA für 10 min. Nach nochmaligem 5 min Waschen in 1x PBS erfolgte eine weitere Fixierung in 4% Paraformaldehyd/1x PBS für 5 min und nochmaliges Waschen in 1x PBS (5 min). Die

daraufliegende 10 minütige Inkubation in einer Triethanolamin / Essigsäureanhydridlösung (3,125 ml:0,625 ml/250ml Wasser) diente zur Neutralisierung positiver Ladungen und damit zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Nach jeweils 5 min Waschen in 1x PBS und 0.83% NaCl wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und danach bei RT getrocknet.

3.6.5.4 Hybridisierungsreaktion

Die in Ethanol aufbewahrte radioaktiv markierte RNA Probe (s. Kap. 0) wurde 10 min bei 13000rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert und einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Präzipitat wurde getrocknet und in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Dabei wurde die spezifische Aktivität der RNA-DTT-Lösung auf $1,5 \times 10^6$ cpm/ μ l eingestellt (entspricht $1,5 \times 10^5$ cpm/ μ l in der Gesamthybridisierungslösung).

Die Hybridisierungslösung enthielt folgende Bestandteile: 1x Hyb-Salz (10x Hyb-salt: 0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.38% NaH_2PO_4 pH 6.8, 50 mM EDTA, 3 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8), 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 10 mM DTT, 1 μ l tRNA (10 mg/ml) und 10% RNA-DTT-Lösung ($1,5 \times 10^6$ cpm/ μ l). Der Gehalt von tRNA wurde bei den meisten Hybridisierungen auf das fünffache erhöht (50 μ g pro ml Hybridisierungslösung), um den unspezifischen Hintergrund auf ein Minimum zu reduzieren.

Um die Probe vollständig zu denaturieren, wurde die Hybridisierungslösung vor dem dem Auftragen auf die Gewebeschnitte 3 Minuten bei 90°C inkubiert und auf Eis abgeschreckt.

Die vorhybridisierten Schnitte wurden mit einem DAKO-Stift kreisförmig umrundet, um ein Mischen von verschiedenen Hybridisierungslösungen auf dem selben Objektträger zu vermeiden.

15 bis 20 μ l Hybridisierungslösung wurden auf einen vorhybridisierten Schnitt gleichmäßig verteilt und mit einem silikonisierten Deckgläschen (18 x 18 mm) abgedeckt. Wenn möglich wurden auf einen Objektträger sowohl ein Schnitt mit der „antisense“-Probe und der Parallelschnitt mit der weiteren Proben oder der entsprechenden „sense“-Probe hybridisiert.

Zur Inkubation der Objektträger wurde eine Glasschale mit drei Lagen 3MM Whatman-Filter und einer Lage Aluminiumfolie ausgelegt. Das Filterpapier wurde mit 2x SSC, 50% Formamid getränkt. Die Objektträger wurden in die Schale gelegt, diese mit einem Deckel abgedichtet und über Nacht bei 59°C im Wasserbad inkubiert.

3.6.5.5 Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte

Nach der Inkubation wurden die Objektträger aus der feuchten Kammer genommen und wieder in die Glasfärbegestelle gestellt. Das Waschen der Schnitte erfolgt unter stringenten und ³⁵S-stabilisierenden Bedingungen. Dieses wird erreicht durch die hohe Formamidkonzentration (50%), die den Schmelzpunkt der RNA:RNA-Duplexe herabsetzt, durch die relativ hohe Temperatur von 65 °C und durch die Anwesenheit von β-Mercaptoethanol, welches vor der Oxidation des Schwefels schützt.

Die Färbegestelle mit den Objektträgern wurden in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen eingetaucht:

- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37°C; 15 min
- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 65°C 30 min
- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37°C 2 h
- NTE (0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA) bei 37°C 15 min
- NTE mit RNase (Endkonz.: 20 µg/ml) bei 37°C 15 min
- NTE bei 37°C 15 min
- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37°C 30 min
- 2x SSC bei RT 15 min
- 0.1x SSC bei RT 15 min

Eine Entwässerung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

- 30% Ethanol, 0.25 M NH₄OAc 2 min
- 50% Ethanol, 0.25 M NH₄OAc 2 min
- 70% Ethanol, 0.25 M NH₄OAc 2 min
- 80% Ethanol 2 min
- 90% Ethanol 2 min
- 95% Ethanol 2 min
- 100% Ethanol 2 min

Anschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet, mit einem Klebeband in einer Expositionskassette befestigt, und über Nacht ein Röntgenfilm (HyperTM-MP) aufgelegt.

3.6.5.6 Visualisierung

Beschichten der Objektträger mit einer Photoemulsion

Die NTB-2 Photoemulsion wurde in der Dunkelkammer in einem Wasserbad bei 42°C geschmolzen und 5 ml davon mit Wasser 1:1 verdünnt. Das Gemisch wurde dann möglichst blasenfrei in ein Gefäß eingefüllt, das speziell zur Beschichtung der Objektträger angefertigt wurde. Diese Vorrichtung wurde dann in das Wasserbad (42°C) gestellt, um die Photoemulsion flüssig zu halten. Nach Entfernen der Blasen aus der Photoemulsion wurden die Objektträger nacheinander durch Eintauchen in die Photoemulsion beschichtet. Dabei sollte die Photoemulsion so gleichmäßig wie möglich auf den Objektträgern verteilt sein. Die beschichteten Objektträger wurden im Dunkeln 2 h getrocknet. Danach wurden sie in Polyoxymethylen Färbegestelle gestellt, in die entsprechenden Färbetröge eingepackt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Objektträger wurden mehrere Tage (wenigstens 5, höchstens 15) bei 4°C exponiert.

Entwickeln, Färben und Mikroskopieren der Schnitte

Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Objektträger in folgenden Lösungen entwickelt:

- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| • 16% Kodak D-19 Entwickler | 3 min |
| • 1% Eisessig | 1 min |
| • 30% Natriumthiosulfat | 3 min |
| • Wasser | 2 x 10 min
1 x 30 min; |

Die Schnitte wurden getrocknet und mit Hämatoxylin-Eosin (Mayer's Hämatoxylin: 8 min; kurz Aqua bidest ; 15 min in laufendem Leitungswasser; kurz Aqua bidest; Eosin, 1% Essigsäure für 1 min, 1 min 70% Ethanol, 1 min 100% Ethanol) gegengefärbt. Nach Trocknen der Objektträger wurden sie mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckelt. Die derart hergestellten Präparate wurden anschließend im Zeiss Axioskop-Mikroskop im Hell- und Dunkelfeld analysiert und photographiert. Für die Analyse der histologischen Schnitte wurde ein DMLB Mikroskop (Leica, Wetzlar) verwendet. Die Dokumentation wurde mit einer CCD-Kamera (HVC 20, Hitachi Denshi), und mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Photoshop 4.0 (Adobe) auf einem 8500/180 Power Macintosh (Apple) durchgeführt.

3.6.6 Immunohistochemie (IHC)

Die Paraffinschnitte auf den Objektträger wurden zur Entparaffinierung in folgenden Lösungen inkubiert:

Xylol: 2 x 10 min; 100% Ethanol: 2 x 5 min; 95% Ethanol: 5min; PBS: 5 min

Die entparaffinierten Schnitte wurden in 0,01 M Citratpuffer pH 6.0 überführt. In diesem Medium wurden sie in der Mikrowelle bei 500 W für ca. 10 min inkubiert. Anschließend wurden sie in PBS bei Raumtemperatur abgeschreckt.

Darauf wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten wie folgt behandelt:

- Inkubation in PBS, währenddessen wurden die Schnitte mit dem Dakostift umrundet. 10 min
- Die Schnitte wurden mit 10% Ziegenserum in PBS beträufelt; die Objektträger wurden auf eine schwarze Folie gelegt und mit einem Deckel abgedeckt, so daß feuchte Kammer entstand, 15 min
- Das Serum wurde auf Saugpapier abgeklopft und sofort die primäre Antikörper-Lösung hinzugegeben (ca. 200 µl pro Schnitt; Verdünnung in 1% globulinfreiem BSA / PBS; Inkubation mit dem primären Antikörper 60 min
- Waschen mit PBS (im Glaskasten) 3 x 2 min
- Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität: in 0.3% H₂O₂ / Methanol (im Glaskasten)
- Waschen: PBS (im Glaskasten) 3 x 2 min
- Hinzugabe des Sekundären Antikörpers (1:400 der Stamm-Lsg (biotinylierter Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper) in PBS) 30 min
- Waschen: PBS (im Glaskasten) 3 x 2 min
- Hinzugabe des Streptavidin-Biotin-Komplex (10 µl „Solution A“ (Streptavidin) in 1 ml PBS, Zugabe von 10 µl „Solution B“ (biotynilierte Meerrettichperoxidase) Inkubation bei RT Zugabe von 1 ml PBS und 20 µl Ziegenserum) 30 min
- Waschen: PBS (im Glaskasten) 5 min
- Farbenentwicklung mit AEC³ 2-30 min
- Nach kurzem Spülen in Aqua dest. (im Glaskasten) wurden die Schnitte getrocknet und mit Glycergel eingedeckelt.

³ 10 mg AEC (3,3-amino-9-ethyl carbazole) in 1 ml N, N-Dimethylformamid Hinzugabe von 20 ml Acetat-Puffer; Filtration und Hinzugabe von 6,5 µl H₂O₂

3.6.7 ELISA aus Blutplasma

Aus frisch getöteten Mäusen wurde mit Hilfe einer Herzpunktion ca. 500 µl Blut pro Maus gesammelt. Das Blut wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Plasma wurde auf -80° C gelagert. Die ELISA-Messungen für Maus-IL-6 wurden gemäß den Herstellerangaben mit einem „mouse IL-6 ELISA“-Kit (R&D Systems, Minneapolis) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 AP-1/GR-Wechselwirkung im Knochenmetabolismus

4.1.1 Expression des AP-1-Zielgens Kollagenase-3 und des GR in osteogenen Geweben

Um potentielle Zielzellen der AP-1/GR-Wechselwirkungen zu identifizieren, wurde zunächst die spezifische Lokalisation der Transkripte des AP-1-Zielgens Kollagenase-3 (MMP-13) im Knochen bestimmt. Aufgrund von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und anderer Forschungsgruppen (Gack et al., 1995; Johansson et al., 1997b; Mattot et al., 1995) wurde die Kollagenase-3-Expression während der endochondralen Ossifizierung im hypertrophen Knorpel und in Osteoblasten sowie während der desmalen Knochenbildung in Osteoblasten lokalisiert. Zur näheren Eingrenzung der Kollagenase-3 produzierenden Zellpopulationen und der Bestimmung ihrer Funktion in Physiologie und Pathologie wurden *in situ* Hybridisierungen (ISH) mit Kollagenase-, „antisense“-RNA-Proben an Gewebeschnitten von Mausembryonen, postnatalen Knochen und Knochen von Mäusen mit experimenteller Osteoarthritis durchgeführt.

4.1.1.1 Kollagenase-3 ist ein Markergen während der Osteogenese

Die endochondrale Ossifizierung beginnt während der Embryonalentwicklung, indem die Knorpelanlage des Knochens durch Knochensubstanz ersetzt wird (als Übersichtsartikel (Horton, 1993)). Während dieses Prozesses streben vom Zentrum der knorpeligen Vorform zwei Ossifizierungsfronten, die Wachstumszonen, zum distalen Ende des Knochens (Abb. 2). Eine zeitlich determinierte Abfolge von Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten in der Wachstumszone ist für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich. Diese zeitliche Abfolge wird im räumlichen Aufbau der epiphysären Wachstumszonen durch einen kontinuierlichen Gradienten von Differenzierungsstadien der Chondrozyten repräsentiert. Die Wachstumszone wird daher von epiphyseal nach diaphyseal in eine proliferative Zone, in eine Reifungszone und in eine hypertrophe Zone eingeteilt.

Zur Bestimmung des Differenzierungsstadiums der Kollagenase-3-produzierenden Zellen in der Wachstumszone wurde die Kollagenase-3-Genexpression mit derjenigen des Gens *Itm2a*, der Alkalischen Phosphatase und Osteocalcin verglichen. Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin sind etablierte Markergene für hypertrophe Chondrozyten und Osteoblasten (Althoff et al., 1982; Ducy et al., 1996; Habuchi et al., 1985; Mark et al., 1988; McKee et al.,

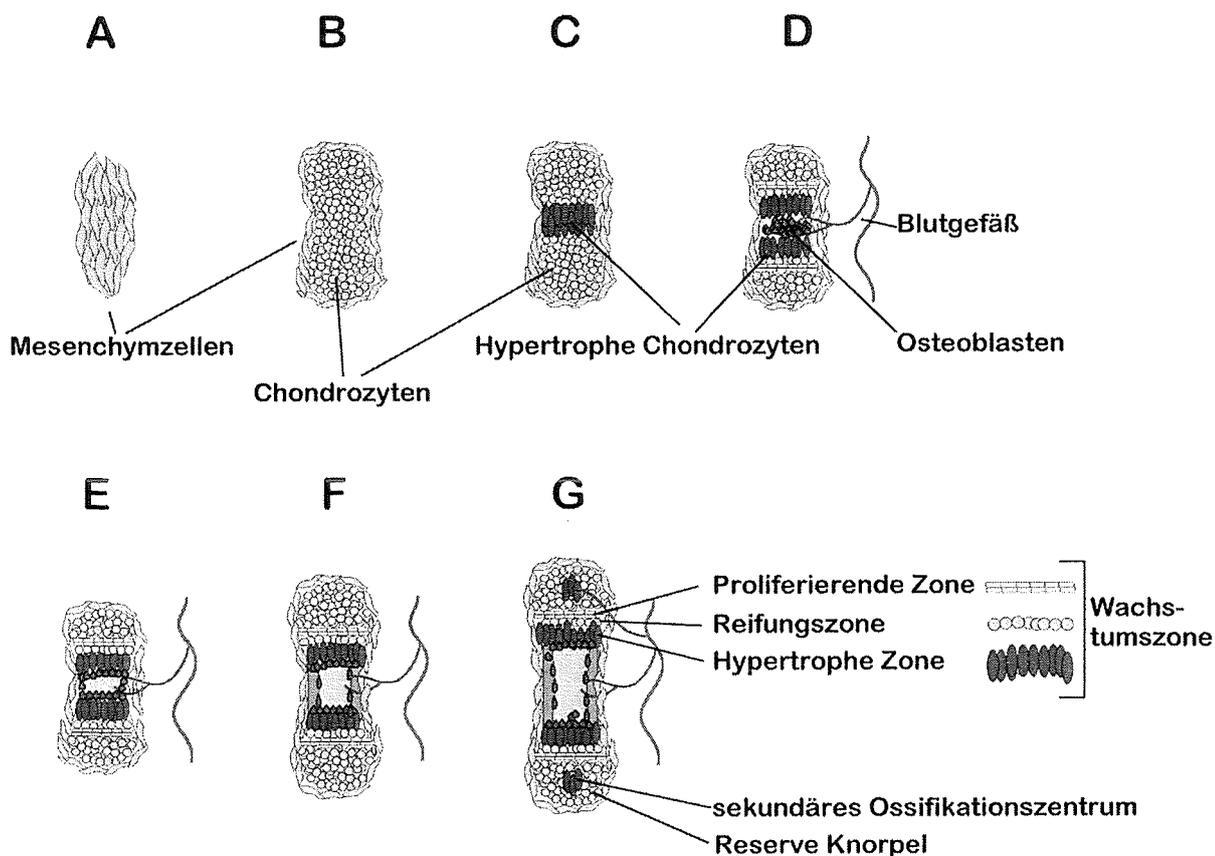


Abb. 2: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifizierung bei der Entwicklung eines Röhrenknochens (A-G). A: Kondensierende Mesenchymzellen in der Extremitätenknospe. B: Knorpeliges Knochenmodell, das von perichondralen Mesenchymzellen umgeben ist. C: Hypertrophe Chondrozyten differenzieren im Zentrum. D: Vaskularisierung und Einwandern bzw. Differenzierung von Osteoblasten. E: Zentripetale Wanderung der Ossifikationsfronten. F: Verknöcherung des Schaftes (Diaphyse) und Proliferation der epiphysären Chondrozyten. G: Entstehung eines sekundären Ossifikationszentrums im epiphysären Knorpel. Epiphysäre Chondrozyten differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten. Nach (Gilbert, 1994), verändert.

1992; Stein und Lian, 1993). Itm2a ist ein in der Osteogenese exprimiertes Protein (Deleersnijder et al., 1996), das früh differenzierte Chondrozyten in der Wachstumszone charakterisiert (Tuckermann et al., 1999). Um die Expressionsmuster des Kollagenase-3-Gens mit dem der Markergenen zu vergleichen, wurden *in situ* Hybridisierungen mit den jeweilig passenden „antisense“-RNA-Proben auf parallelen Paraffinschnitten von embryonalen Geweben und postnatalen Knochen durchgeführt.

Während der Embryonalentwicklung konnte das Kollagenase-3-Transkript in Prozessen der Knochenneubildung nachgewiesen werden (Abb. 3 A). Signale für die Kollagenase-3-Expression erschienen in Anlagen der dorsalen Rippen, der Wirbelkörper, der Röhrenknochen

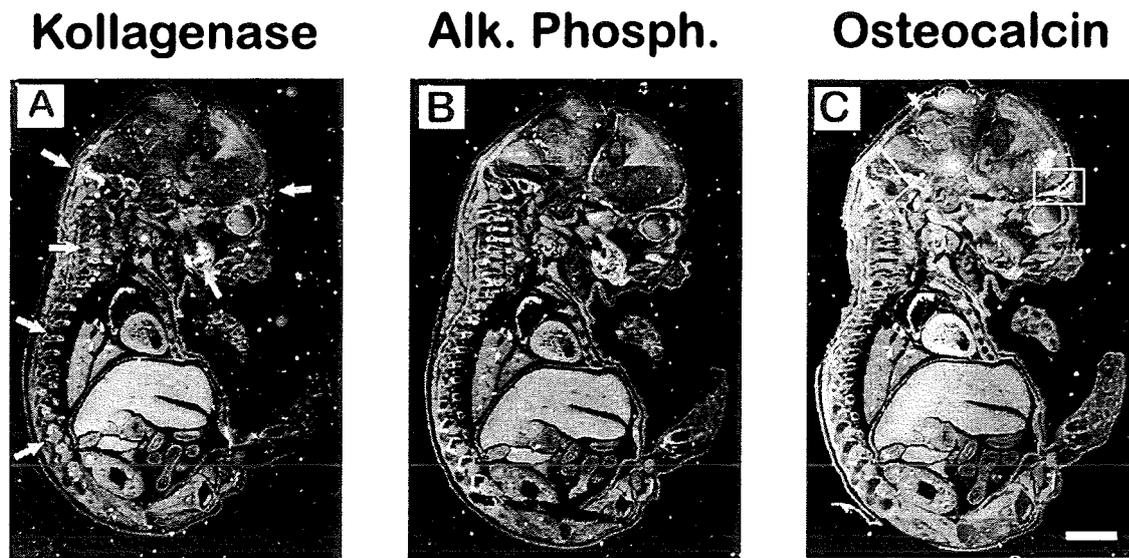


Abb. 3: Die Expression der Kollagenase-3, Alkalischen Phosphatase und Osteocalcin im Embryonalstadium 16.5 dpc ist auf die Knochenbildung beschränkt. A: Dunkelfeldansicht einer *in situ* Hybridisierung (ISH) eines Sagittalschnittes durch einen 16,5 Tage alten Mausembryo (16.5 dpc). Als „antisense“-Probe wurde eine Kollagenase-3-spezifische Sequenz verwendet, die mit ^{35}S -UTP radioaktiv markiert war. Die Signale für die Kollagenase-3-Expression befanden sich in endochondral und desmal ossifizierenden Strukturen (Pfeile): In den dorsalen Rippen und den Wirbelkörperanlagen (linke Pfeile) sowie in der Mandibel um den Meckelschen Knorpel und im Frontalknochen (rechte Pfeile). **B:** Dunkelfeldansicht eines Parallelschnittes zu (A), der mit einer Alkalischen Phosphatase-spezifischen „antisense“-Probe hybridisiert worden war. Die Signale für die Alkalische Phosphatase-Expression befanden sich ebenfalls in ossifizierenden Strukturen, unterschieden sich jedoch in ihrem Muster von dem der Kollagenase-3 (vgl. Abb. 4 und Abb. 5). **C:** Parallelschnittes zu (A), der mit einer Osteocalcin-spezifischen Probe hybridisiert worden war. Signale für Osteocalcin-Expression befanden sich ausschließlich im Frontalknochen (rechtes Kästchen). Das linke Kästchen stellt den Ausschnitt der Detail-Ansicht in Abb. 4, das rechte Kästchen den Ausschnitt der Detail-Ansicht in Abb. 5 dar. Maßstab (A), (B), (C) 1 mm.

der Gliedmaßen (Daten nicht gezeigt) sowie im Unterkiefer um den Meckel'schen Knorpel und im desmal ossifizierenden Gewebe des Frontalknochens. Erwartungsgemäß war die Expression des alkalischen Phosphatase-Gens ebenfalls mit Knochenneubildung assoziiert (Abb. 3 B). Signale für mRNA befanden sich in den Anlagen der dorsalen Rippen, Wirbelkörper, Röhrenknochen (Daten nicht gezeigt), um den Meckelschen Knorpel und sich im entwickelnden Frontalknochen. Osteocalcin Expression ist im Gegensatz zur Kollagenase-3- und Alkalische Phosphatase-Expression zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung nur im Frontalknochen sichtbar.

Innerhalb einer endochondral ossifizierenden Knochenanlage (Abb. 4) ließ sich eine serielle Abfolge der Expressionsmuster der Gene *Itm2a*, Alkalische Phosphatase und Kollagenase-3 ausmachen. *Itm2a*-Expression erstreckte sich weitgehend auf proliferierende Chondrozyten

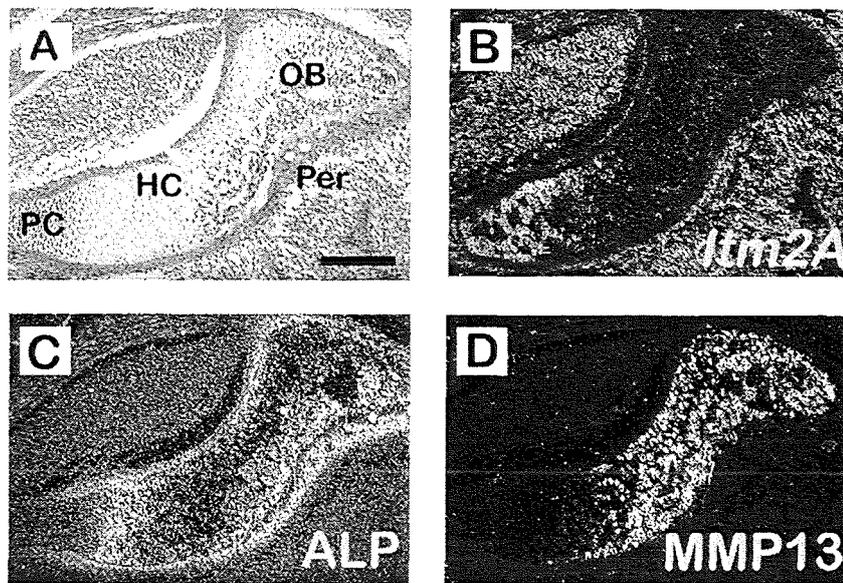


Abb. 4: Expression des *Itm2a*-Gens, der Alkalischen Phosphatase und der Kollagenase-3 während der endochondralen Ossifizierung am Beispiel des Atlasknochens. A: Hellfeldansicht des Atlasknochens (Detail aus Abb. 3, linker Kasten in Abb. 3 C). Die Differenzierungsstadien der Chondrozyten verliefen in einem Gradienten in rostraler Richtung (von links nach rechts). Den proliferierenden Chondrozyten (PC) folgte die Zone der reifen und hypertrophen Chondrozyten (HC). Im rechten Teil der Knochenanlage war der Knorpelanteil durch Knochensubstanz ersetzt worden. Der hier vorherrschende Zelltyp waren Osteoblasten (OB). Die Knochenanlage war von mesenchymalen Zellen des Perichondriums (Per) umgeben. **B:** Dunkelfeldansicht der ISH-Analyse der *Itm2a*-Expression auf einem Parallelschnittes zu (A). Die Signale für die *Itm2a*-Expression befanden sich in proliferierenden Chondrozyten der Knorpelanlage. **C:** Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP) im Atlasknochen. Signale für ALP-Transkripte waren in der früh differenzierten Zone der hypertrophen Chondrozyten, im Perichondrium und in einem Teil der osteoblastischen Zellen vorhanden. **D:** Kollagenase-3-Expression in einer Dunkelfeldansicht der ISH-Analyse auf einem Parallelschnittes zu (A). Die Signale für die Kollagenase-3-Expression befanden sich in der Zone der spät differenzierenden Chondrozyten und in osteoblastischen Zellen. Maßstab (A), (B), (C), (D) 200 µm.

(Abb. 4 B). ALP-Expression befand sich im Bereich der frühen hypertrophen Zone und im Perichondrium (Abb. 4 C). Kollagenase-3-mRNA blieb auf die spät differenzierten hypertrophen Chondrozyten und auf Osteoblasten beschränkt (Abb. 4 D). ALP- und Kollagenase-3-Expressionsmuster grenzten aneinander an, zeigten jedoch keine Überlappung.

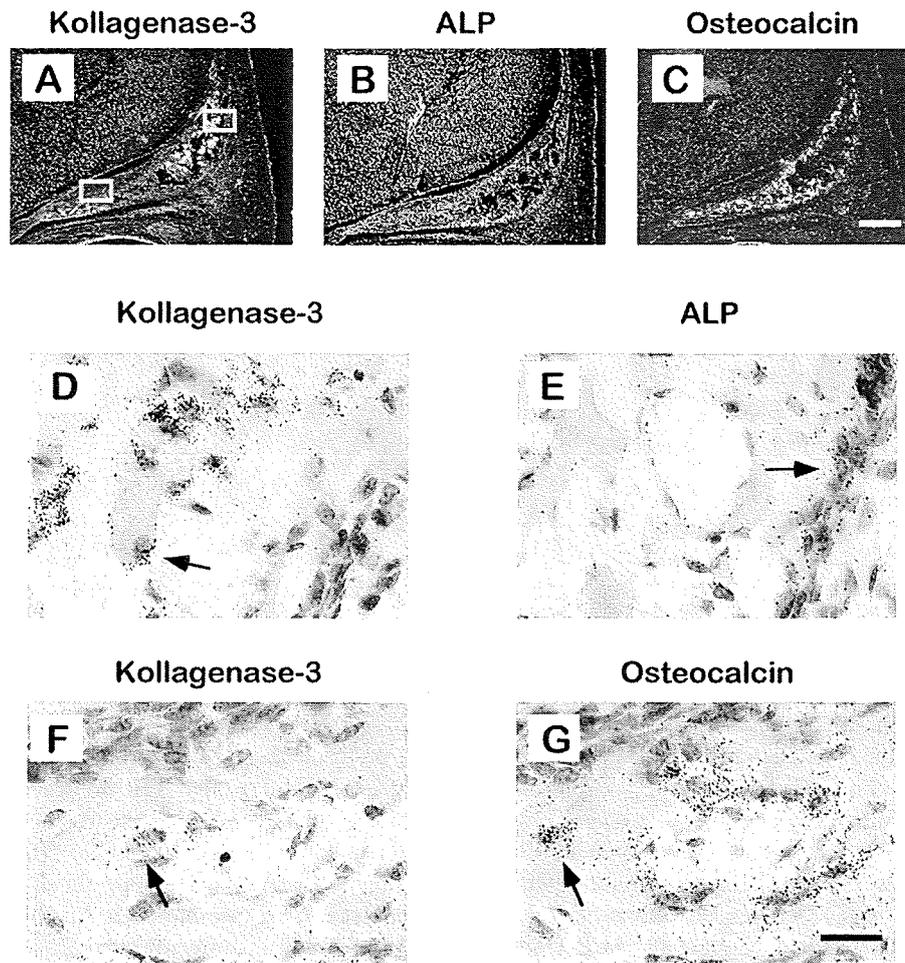


Abb. 5: Expression der Kollagenase-3, der Alkalischen Phosphatase und des Osteocalcins während der desmalen Ossifizierung am Beispiel des Frontalknochens. A, B, C: Vergleichende Dunkelfeldansichten von Gewebeschnitten des Frontalknochens eines 16.5 dpc Mausembryos (Detail aus Abb. 3, rechtes Kästchen in Abb. 3 C), welche die Expression der Kollagenase-3- (A), Alkalische Phosphatase- (B) und des Osteocalcin-mRNA (C) aufzeigen, die mittels ISH analysiert worden war. D, E: Vergleichende Hellfeld-Darstellung der Kollagenase-3-Expression (D) und der ALP-Expression (E) in einer Detailansicht (aus (A), oberes Kästchen). Kollagenase-3-positive Zellen befanden sich an den Rändern von Knochenmatrix (D, Pfeil), während ALP-Expression in mesenchymalen Zellen des Periosteums beschränkt war (E, Pfeil). F, G: Vergleichende Darstellung der Kollagenase-3- und Osteocalcin-Expression in einer Detailansicht von einem ossifizierten Bereich der Frontalknochenanlage (aus (A), unteres Kästchen). Kollagenase-3 positive Zellen befanden sich am Rande der Knochenmatrix (F, Pfeil), während Osteocalcin exprimierende Zellen von Knochenmatrix eingeschlossen waren (G, Pfeil). Maßstab (A), (B), (C) 200 μm ; (D), (E), (F), (G) 50 μm .

Im Frontalknochen (Abb. 5) konnten Kollagenase-3-Transkripte in Osteoblasten des Zentrums der Knochenanlage nachgewiesen werden (Abb. 5 A), die sich an Knochentrabekeln befanden (Abb. 5 D, F). ALP-Expression dagegen war auf das Periosteum beschränkt. Osteocalcin-mRNA war in weiter entwickelten Bereichen der Knochenanlage lokalisiert. Die

Osteocalcin-positiven Osteoblasten waren von Knochenmatrix eingeschlossen (Abb. 5G), während benachbarte Zellen, die sich an den Rändern auswachsender Knochen trabekeln befanden, Kollagenase-3 exprimierten (Abb. 5 F). Auch im Prozeß der desmalen Ossifikation findet keine Kollokalisierung der Kollagenase-Expression mit den Markergenen Alkalische Phosphatase oder Osteocalcin statt.

Die endochondrale Ossifizierung wird nach der Geburt in den Wachstumszonen während des Längenwachstums der Röhrenknochen fortgesetzt. Die vergleichende Analyse der Expressionsmuster des Kollagenase-3-Gens mit *Itm2a*, ALP und Osteocalcin in den Epiphysen von postnatalen wachsenden Röhrenknochen zeigte eine räumliche Expressionssequenz dieser Gene (Abb. 6). In Chondrozyten des Reserveknorpels, sowie der proliferierenden Zone wurden Signale für *Itm2a* mRNA gefunden. Daneben befand sich erhöhte *Itm2a* Expression im Periosteum, Perichondrium und im Muskel (Abb. 6 A). In dem Areal der früh differenzierten hypertrophen Chondrozyten, das sich der proliferierenden Zone anschließt, befand sich der Schwerpunkt der ALP-Expression (Abb. 6 B). Daneben wiesen das Perichondrium und das Periosteum sowie Zellen, die sich an Knochen trabekeln befanden, Signale auf. Kollagenase-3-mRNA wurde in der Wachstumszone ausschließlich in einer schmalen Zone des hypertrophen Knorpels nachgewiesen, an dem sich unmittelbar die Kalzifikation des neugebildeten Knochens anschloß (Abb. 6 C). Dieser Bereich war negativ für Signale der Alkalischen Phosphatase. Im diaphysären Knochen befand sich die Kollagenase-Expression in Osteoblasten, die an auswachsenden Knochen trabekeln lokalisiert waren und auch hier keine Überschneidungen mit der alkalischen Phosphatase aufwiesen. Osteocalcin mRNA war hauptsächlich auf Osteoblasten beschränkt, die am kortikalen Knochen assoziiert sind und nur sehr schwach im trabekulären Knochen repräsentiert (Abb. 6 D). Auch für die Osteocalcin-Genexpression wurde keine Überschneidung mit der Expression der Kollagenase-3-Gens gefunden.

Die vergleichenden Genexpressionsstudien der Kollagenase-3 und den anderen Differenzierungsmarkern der chondrogenen und osteogenen Linie demonstrieren dieses Gen als neuen Marker, der eine Subpopulation von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten definiert (Abb. 6 E). In der chondrozytären Linie ist Kollagenase-3 ein Markergen für Zellen, die am Ende der chondrozytischen Differenzierung Alkalische Phosphatase exprimierenden hypertrophen Chondrozyten folgen. In der Osteoblastischen Linie markiert Kollagenase-3 ein Differenzierungsstadium von Zellen, das zwischen dem der Alkalische Phosphatase

exprimierenden mesenchymalen Zellen und den in ausgebildeter Knochenmatrix befindlichen Osteocalcin exprimierenden Osteoblasten liegt.

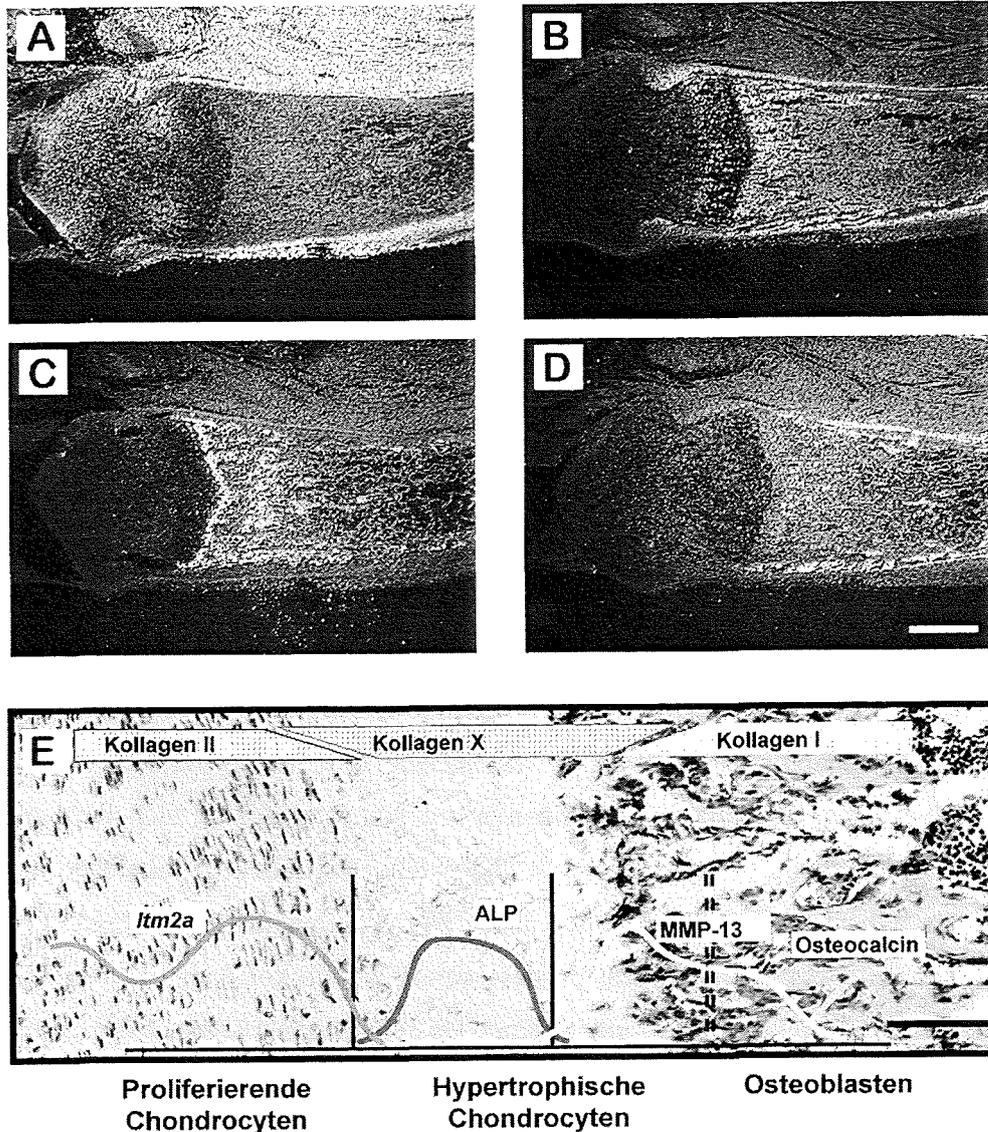


Abb. 6: Serielle Abfolge der Expressionsmuster des *Itm2a*-Gens, der Alkalischen Phosphatase der Kollagenase-3 und des Osteocalcin-Gens in den Wachstumszonen von Röhrenknochen. A-D: Dunkelfeldansichten von parallelen Sagittalschnitten durch die Tibia einer 5 Tage alten Maus (C57BL/6). Gezeigt werden *in situ* Hybridisierungen mit spezifischen „antisense“-Proben für *Itm2a* (A), Alkalische Phosphatase (B), Kollagenase-3 (C) und Osteocalcin (D). E: Zusammenfassung der Expression chondrozytärer und osteoblastärer Markergene in der Wachstumszone von Röhrenknochen: *Itm2a* mRNA befand sich in proliferierenden Chondrozyten, die das für den Knorpel typische Kollagen II produzieren. Alkalische Phosphatase hingegen war in der Zone der hypertrophen Chondrozyten exprimiert, die Kollagen Typ X synthetisieren. Die terminal differenzierten hypertrophen Chondrozyten an der Grenze der Mineralisierung exprimierten Kollagenase-3 (MMP-13) und waren negativ für Alkalische Phosphatase-mRNA. Im aufbauenden trabekulären Knochen, in dem Kollagen Typ I den Hauptbestandteil der ECM ausmacht, wurde Kollagenase-3, ALP und Osteocalcin jeweils ausschließlich in osteoblastischen Zellen exprimiert. Maßstab (A), (B), (C), (D) 1 mm; (E) 100 µm.

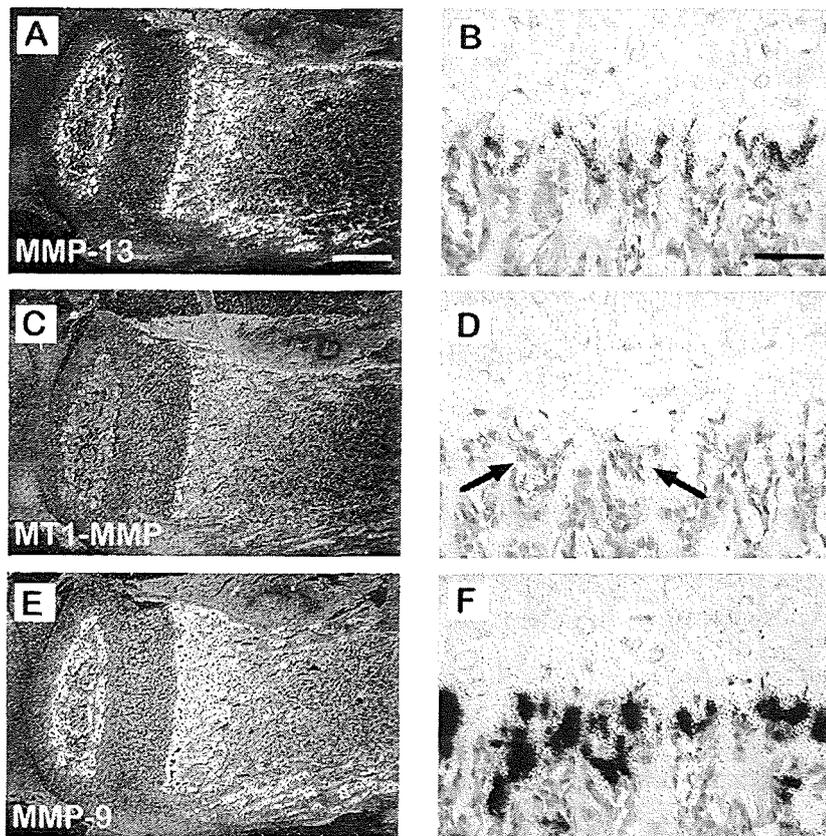


Abb. 7: Gemeinsame Expression der Kollagenase-3, MT1-MMP und MMP-9 an der Ossifizierungsfront der Wachstumszone von Röhrenknochen. Dunkelfeld- (A, C, E) und Hellfeldansichten (B, D, F) von ISH-Analysen der Kollagenase-3- (MMP-13, A, B), MT1-MMP- (C, D) und MMP-9- (E, F) Expression in parallelen Sagittalschnitten durch die Tibia einer 2 Wochen alten Maus (C57BL/6). A, B: Kollagenase-3-(MMP-13)-mRNA befand sich in hypertrophen Chondrozyten und in Osteoblasten des trabekulären Knochens der Diaphyse sowie im sekundären epiphysären Ossifizierungszentrum (vgl. Abb. 2). C, D: MT1-MMP-Expression war an der Ossifizierungsfront in osteoblastischen Zellen (Pfeile in D) lokalisiert. E, F: Signale für MMP-9-mRNA waren an der Ossifizierungsfront und im diaphysären sowie epiphysären Knochen sichtbar. Maßstab (A), (C), (E), 100 μ m; (B), (D), (F) 1 mm.

4.1.1.2 Kolokalisation der Expressionen der Kollagenase-3-, MT1-MMP- und MMP-9-Gene in der Wachstumszone

Die spezifische Expression des Kollagenase-3-Transkripts in hypertrophen Chondrozyten an der Übergangszone von hypertrophen Knorpel zu neugebildeten Knochen läßt auf eine bedeutende Rolle dieses Enzyms im Austausch von Knorpel- zu Knochenmatrix schließen. Da Matrixmetalloproteinasen (MMP) als Proenzyme sezerniert werden und als solche proteolytisch inaktiv sind (Birkedal-Hansen et al., 1993), wird die Gegenwart von Aktivatoren benötigt. *In vitro* Studien weisen darauf hin, daß pro-MMP durch andere MMP-Mitglieder

aktiviert werden können (Birkedal-Hansen et al., 1993). Eine Schlüsselrolle scheinen dabei die membranständigen MT-MMP zu spielen, die in der Lage sind, Pro-Kollagenase-3 unter Mithilfe des Gelatinase A-Enzyms (MMP-2) zu aktivieren (Knäuper et al., 1996b). Kollagenase-3 vermag wiederum zumindest *in vitro* MMP-9 (Gelatinase B) zu aktivieren (Knäuper et al., 1997). Ob diese Aktivierungskaskade (MT1-MMP \Rightarrow Kollagenase-3 \Rightarrow MMP-9) während der endochondralen Knochenbildung stattfindet, hängt vom gemeinsamen Wirkungsort dieser MMP ab. Um die Expression der Kollagenase-3, MT1-MMP und MMP-9 zu vergleichen, wurden parallele Paraffinschnitte von Röhrenknochen mit den jeweiligen „antisense“-RNA-Proben hybridisiert (Abb. 7). Die *in situ* Hybridisierung ergab, daß das MT1-MMP Gen im hypertrophen Knorpel der Wachstumszone in den gleichen Zellen transkribiert wurde wie das Kollagenase-3-Gen (Abb. 7 A-D). Signale für MMP-9 konnten ebenfalls in hoher Intensität an der Übergangszone zwischen hypertrophem Knorpel und Knochen nachgewiesen werden, reichten jedoch weiter in den trabekulären Knochen hinein (Abb. 7 F). Die Kolo-kalisation dieser drei MMP, läßt auf eine Aktivierungskaskade von MMP an der Übergangszone zwischen hypertrophen Knorpel und neugebildeten Knochen schließen. Die Kollagenase-3 scheint aufgrund der hohen Intensität ihrer Expression in den spät differenzierten hypertrophen Chondrozyten eine zentrale Rolle in dieser Kaskade bei der Osteogenese zu spielen.

4.1.1.3 Expression der Kollagenase-3 in experimentell induzierter Osteoarthritis

In der Knochenneubildung scheint die Kollagenase-3 maßgeblich als Effektor-Enzym bei den Gewebeumbauprozessen beteiligt zu sein. In ausgewachsenen Knochen nimmt die Expression der Kollagenase-3 sowohl in den Wachstumszonen als auch im trabekulären Knochen ab (Abb. 8 J-L, Daten nicht gezeigt). Knochenneubildungen kommen im ausgewachsenen Knochen in pathologischen Situationen vor. Ein weitverbreitetes Krankheitsbild der deregulierten Knochenneubildung ist die Osteoarthritis, die als Schlüsselsyndrom den Abbau von Knorpel mit nachfolgender Neuverknöcherung in Gelenken aufweist (Creamer und Hochberg, 1997). Unter den löslichen Faktoren, die diesen Prozeß steuern, spielt TGF β eine dominante Rolle (van den Berg et al., 1993).

Um der Frage nachzugehen, ob die Kollagenase-3 an pathologischer Knochenneubildung beteiligt ist, wurde die Expression in Mäusen mit experimentell induzierter Osteoarthritis untersucht. Dazu wurden adulten C57BL/10 Mäusen durch dreimalige Injektion von TGF β in

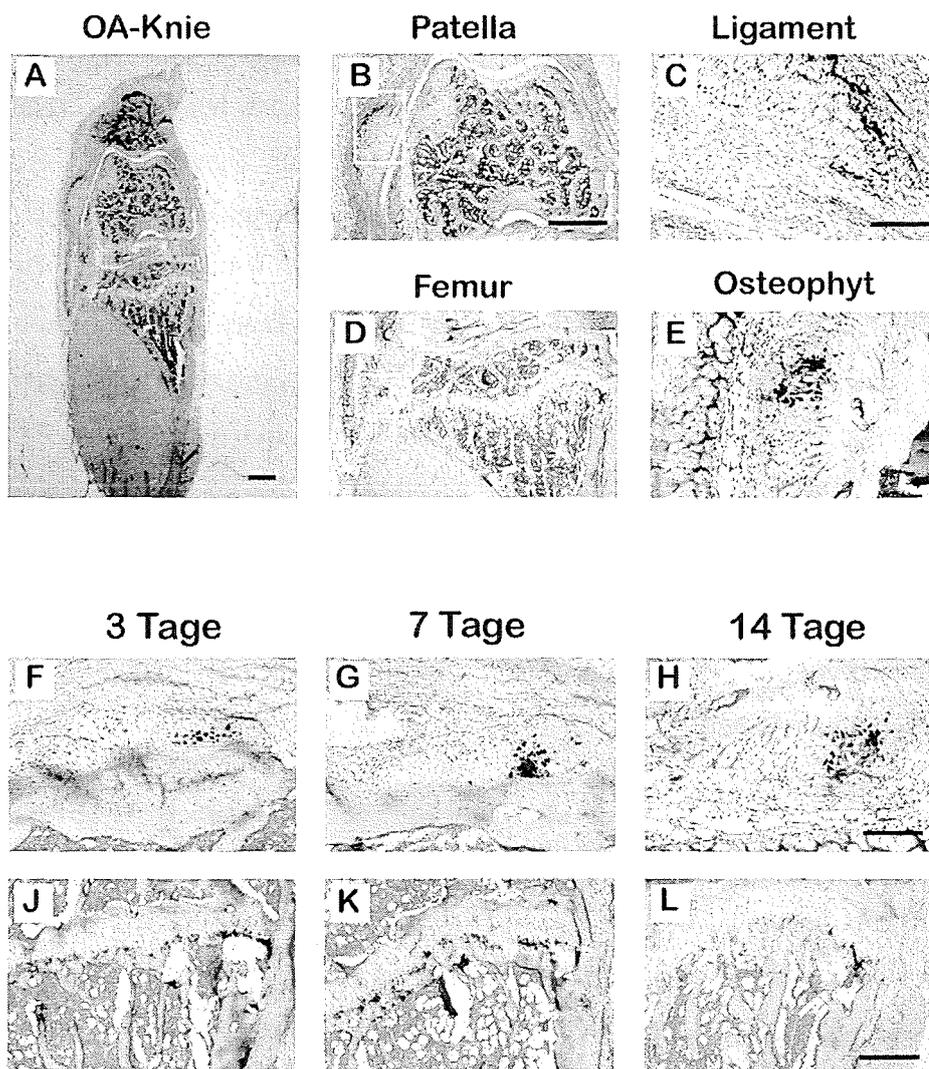


Abb. 8: Expression der Kollagenase-3 im Verlauf der experimentellen Osteoarthritis. Transverse Schnitte durch das Knie von adulten C57BL/10 Mäusen, denen an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0,1 µg TGFβ in 6 µl PBS (0,1% BSA) in die Synovialhöhle des Kniegelenks injiziert wurde, nach Hybridisierung mit einer Kollagenase-3-spezifischen „antisense“ Probe. **A:** Übersicht über das osteoarthritische Knie einer Maus, die 14 Tage nach der letzten Injektion getötet wurde. **B:** Übersicht über die Patella aus dem in (A) gezeigten Knie mit einem Osteophyt (Kasten). **C:** Sklerotisiertes Ligament mit Kollagenase-3-positiven Zellen (Detail aus (B), gelbes Kästchen). **D:** Übersicht über die distale Epiphyse des Femurs mit lateralem Osteophyt (gelbes Kästchen). **E:** Osteophyt mit Kollagenase-3-positiven Zellen (Detail aus (D), gelbes Kästchen). **F-H:** Kollagenase-3-Expression im Zeitverlauf der Entwicklung lateraler Osteophyten am Femur nach 3 (F), 7 (G), und 14 Tagen (H) nach der letzten TGFβ-Injektion. **J-L:** Kollagenase-3-Expression in den Wachstumszonen der Femur-Knochen derselben Schnitte, aus denen die Detailansichten der Osteophyten stammen (F-G), dienen als interner Vergleich für die Intensität des Hybridisierungssignals. Maßstab (A) 1 mm; (B), (D) 1 mm; (C), (E) 200 µm; (J), (F), (G), (H) 200 µm; (K), (L) 0,5 mm.

das Kniegelenk Osteoarthritis induziert, und die Kollagenase-Expression jeweils 3, 7 und 14 Tage nach der letzten Injektion auf Gewebeschnitten bestimmt.

Die histologische Analyse ergab, daß 14 Tage nach der letzten TGF β -Injektion das Krankheitsbild der Osteoarthritis komplett ausgebildet war (Abb. 8 A-E). Knochenneubildungsregionen, auch als Osteophyten bezeichnet, befanden sich an der Patella und der Epiphyse des Femurs (Abb. 8 B, D, E) und zeigten Signale für die Kollagenase-3-Expression. Auch in den Ligamenten fanden Verknochierungen statt, die Signale für Kollagenase-3 aufwiesen. Die Ausbildung der Osteophyten hatte bereits 3 Tage nach der letzten TGF β -Injektion begonnen und nahm nach 7 und 14 Tagen stetig zu (Abb. 8 F-H). In den Osteophyten wurde Kollagenase-3 in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb. 8 E-H). Die Intensität der Kollagenase-3-Signale in den Osteophyten nahm im Zeitverlauf zu, während in den Wachstumszonen der Tibia die Kollagenase-3-Expression auf einem niedrigen Niveau konstant blieb (Abb. 8 J-L).

Kollagenase-3-Expression ist mit der Osteoarthritis in Osteophyten und der Sehnenverknochierung assoziiert und ist vermutlich bei der pathologisch bedingten Knochenneubildung beteiligt.

4.1.1.4 AP-1 und Cbfa-1 sind unabdingbar für die Kollagenase-3-Expression bei der Knochenbildung

Die AP-1-Komponente c-Fos ist ein bedeutender Regulator im Knochenmetabolismus. Permanente Überexpression von c-Fos in transgenen Tieren sowie das Fehlen von c-Fos in c-*fos*-Knock-Out-Tieren bewirken starke pathologische Phänotypen im Knochen (Grigoriadis et al., 1995). Transgene Tiermodelle zeigten, daß die Kollagenase-3-Expression im Knochen durch die Präsenz von c-Fos positiv reguliert wird (Gack et al., 1994; Tuckermann und Angel, unveröffentlichte Daten).

Um den Einfluß von c-Fos auf die Markergene der Wachstumszone während der Osteogenese zu bestimmen und sie damit als Zielgen für AP-1/GR-Wechselwirkungen zu identifizieren, wurde die Expression von *Itm2a*, Alkalische Phosphatase, Kollagenase-3 und Osteocalcin während der frühen Stadien der Osteogenese in c-Fos-defizienten Embryonen und deren Wildtyp-Geschwistern untersucht. Anhand von Northern Blot-Analysen von RNA aus ganzen Embryonen während der frühen Stadien der Osteogenese (11.5 dpc bis 14.5 dpc) konnte gezeigt werden, daß die Expression aller Markergene im Verlauf der Embryogenese zunahm (Abb. 9). Osteocalcin wurde als spätes Markergen erst im Embryonalstadium 16.5 dpc im Northern Blot sichtbar (Daten nicht gezeigt). Von den untersuchten Markergenen der Osteogenese hing jedoch nur die Expression des Kollagenase-3-Gens von der Präsenz von c-

Fos ab. Im Stadium 14.5 dpc wurde es in Wildtyp-Embryonen exprimiert, fehlte jedoch in den Fos-defizienten Embryonen des gleichen Embryonalstadiums. In späteren Stadien der Embryonalentwicklung wurde die Expression in *c-fos*-Knock-Out-Tieren auch sichtbar, war jedoch immer noch deutlich reduziert (Daten nicht gezeigt; (Porte et al., 1999).

Das Kollagenase-3-Gen ist somit das erste AP-1-regulierte Gen, für das eine Abhängigkeit von *c-Fos* *in vivo* demonstriert werden konnte, da es nicht nur positiv bei *c-Fos*-Überexpression reguliert wird, sondern auch beim Fehlen von *c-Fos* erniedrigt exprimiert wird. Dadurch ist das Kollagenase-3-Gen derjenige Knochenmarker, der sich am besten für die Messung von AP-1-Aktivität im Knochenmetabolismus eignet.

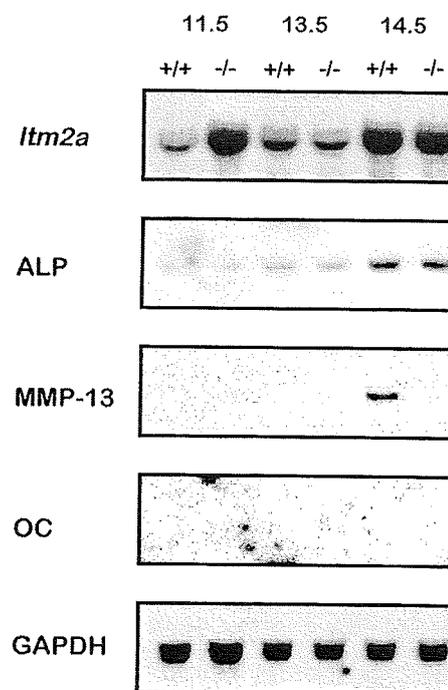


Abb. 9: Die Expression des Kollagenase-3-Gens ist während der Embryogenese in *c-Fos*-defizienten Embryonen stark reduziert. Aus Wildtyp- (+/+) und *c-Fos*-defizienten (-/-) Embryonen der Entwicklungsstadien 11.5 dpc, 13.5 dpc und 14.5 dpc wurde Gesamt-RNA isoliert. Die Mengen an *Itm2a*-, Alkalischer Phosphatase (ALP)-, Kollagenase-3 (MMP-13)-, Osteocalcin (OC)- und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot-Analyse ermittelt.

Von Kollagenase-Expressionsstudien in transgenen Mäusen ausgehend, die *c-Fos* ubiquitär überexprimieren, erwuchs die Frage, warum die erhöhte Kollagenase Expression in diesen Mäusen auf Knochengewebe beschränkt blieb (Gack et al., 1994). Es wurde postuliert, daß

zur AP-1-Aktivität ein weiterer Transkriptionsfaktor für die knochenspezifische Kollagenase-3-Expression notwendig ist.

1997 wurde ein Mitglied der Runt Protein Familie, Cbfa-1, als knochenspezifischer Faktor identifiziert, der essentiell für die Differenzierung von Osteoblasten und die Expression des Osteocalcin Gens ist (Ducy et al., 1997; Otto et al., 1997). In unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, daß sich in der Promotorregion des Kollagenase-3-Gens eine Bindestelle für Cbfa-1 befindet. Diese Bindestelle ist zusammen mit der AP-1-Bindestelle für die Induktion des Kollagenase-Gens durch das Parathormon (PTH) in Osteosarkomzellen

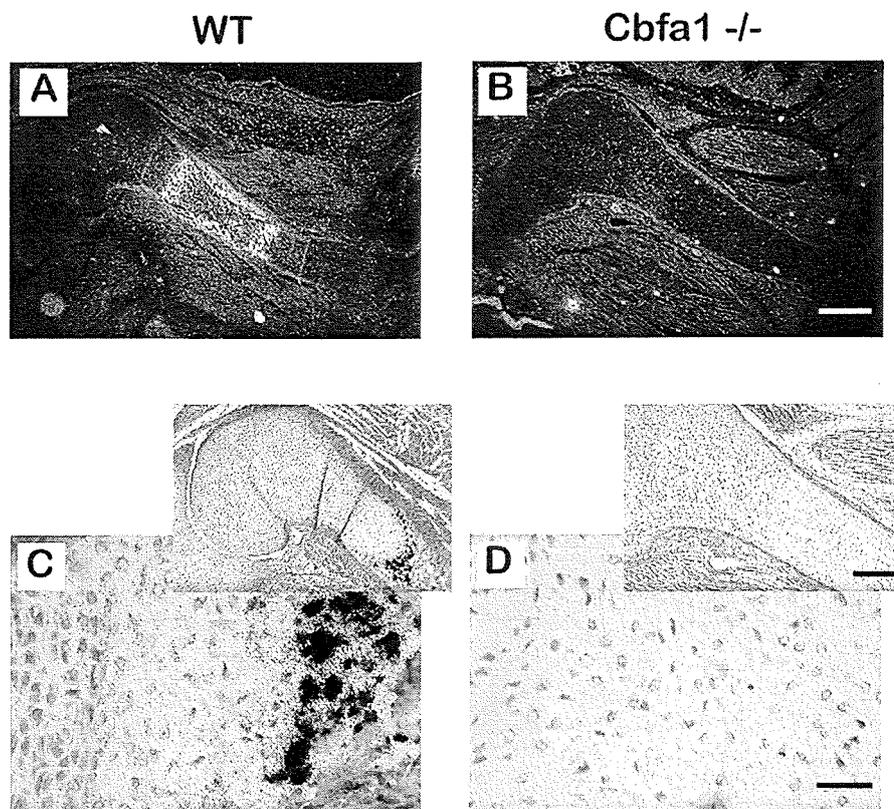


Abb. 10: Cbfa-1-defiziente Embryonen exprimieren keine Kollagenase-3 bei der Knochenneubildung. Kollagenase-3 Expression im Humerus von Wildtyp- (WT) und Cbfa-1-defizienten (Cbfa-1^{-/-}) Embryonen im Entwicklungsstadium 18.5 dpc. **A:** Dunkelfeldansicht eines Humerus von einem Wildtyp-Embryo. Kollagenase-3 spezifische Signale befanden sich jeweils in der Zone der hypertrophen Chondrozyten der Wachstumszonen und im verknöcherten Schaft. **B:** Dunkelfeldansicht eines Humerus von einem Cbfa-1-defizienten Embryo. Es waren keine Signale der Kollagenase-3 Expression zu erkennen. **C:** Die Detailansicht aus der proximalen Epiphyse des Humerus eines WT-Embryos zeigt hypertrophe Chondrozyten, die Kollagenase-3-Signal aufweisen. **D:** In der proximalen Epiphyse des Humerus von einem Cbfa-1-defizienten Embryo sind hypertrophe Chondrozyten negativ für Kollagenase-3 mRNA-Signale. Maßstab (A), (B) 1 mm; (C), (D) 0,5 mm bei kleinem Teilbild, 100 µm bei großem Teilbild.

verantwortlich (Porte et al., 1999; Selvamurugan et al., 1998). Um Hinweise für die mögliche knochenspezifische Regulation des Kollagenase-3-Gens durch Cbfa-1 zu erhalten, wurde die Kollagenase-3-Expression im Humerus von Cbfa-1 Knock-Out-Tieren zum Embryonalstadium 18.5 dpc untersucht. In den Wildtyp-Geschwistern wird Kollagenase-3 in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert (Abb. 10 A, C). In Cbfa-1-defizienten Tieren konnte kein Signal für Kollagenase-3-mRNA in der Humerus-Knochenanlage gefunden werden (Abb. 10 B). Obwohl Osteoblasten in dieser Mausmutante fehlen (Abb. 10 D,) befinden sich jedoch spät differenzierte hypertrophe Chondrozyten im Humerus Cbfa-1-defizienter Mäuse (Abb. 10 D), die kein Kollagenase-3-Signal aufweisen. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, daß Cbfa-1 neben c-Fos/AP-1 der zweite wesentliche Regulator der Kollagenase-3 im Knochengewebe ist.

4.1.1.5 Expression des GR im Knochen

Die vorangegangenen Resultate beweisen, daß Kollagenase-3 ein Zielgen von AP-1 (c-Fos) *in vivo* ist, und daß für die knochenspezifische Expression zusätzlich das Cbfa-1-Protein benötigt wird. Eine Modulation der knochenspezifischen Kollagenase-3-Expression durch den Glucocorticoidrezeptor (GR) im Knochen setzt die Präsenz des GR-Moleküls in osteogenen Geweben voraus. Obwohl eine Reihe von Hinweisen aus Knochenzellkultur-Experimenten darauf hin deuten, daß Glucocorticoide (GC) über den GR in der Osteogenese wirken (Lian et al., 1997; Shalhoub et al., 1992), ist *in vivo* bisher nur die Expression des GR im Palatium untersucht worden (Abbott et al., 1994). Daher wurde die GR-Expression in Gewebeschnitten der Wachstumszone der Tibia einer postnatalen Maus mit Immunohistochemie (IHC) unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen den GR untersucht (Abb. 11 C). Signale für das GR-Protein ließen sich innerhalb der gesamten Wachstumszone einschließlich der Zone für proliferierende Chondrozyten, früh- und spät differenzierter hypertropher Chondrozyten und im diaphysären Knochen nachweisen. Das GR-Protein war in osteogenen Geweben nahezu ubiquitär präsent. Kollagenase-3-exprimierende Zellen, die auf einem Parallelschnitt mittels *in situ* Hybridisierung mit einer Kollagenase-3 spezifischen RNA-Probe identifiziert wurden (Abb. 11 B), zeigten in der Immunohistochemie Signale für GR Protein. Die Präsenz des GR und die Abhängigkeit der Kollagenase-3-Genregulation von c-Fos/AP-1, prädestinieren die Kollagenase-3-Expression als Parameter zum Studium der AP-1/GR-Wechselwirkungen im Knochen.

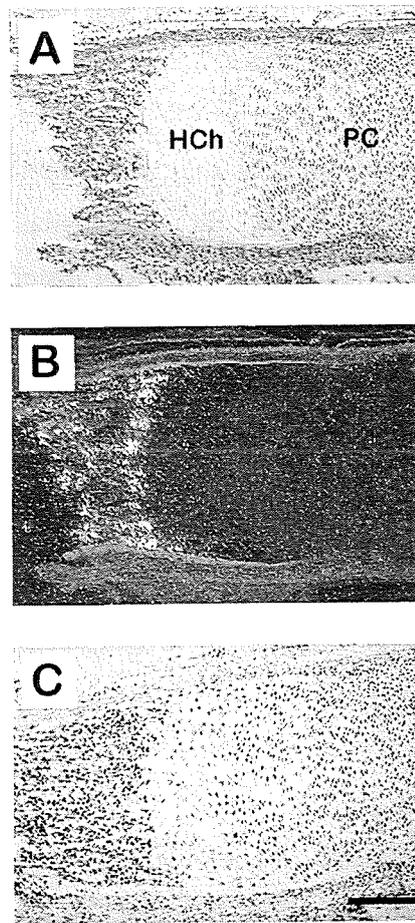


Abb. 11: Expression der Kollagenase-3 mRNA und GR-Protein in der Wachstumszone von Röhrenknochen. Parallele Längsschnitte durch die epiphysären Wachstumszone der Tibia einer 5 Tage alten Maus (C57BL/6) wurden jeweils mittels einer ISH unter Verwendung einer Kollagenase-3-spezifischen „antisense“-Probe und einer immunohistochemischen Behandlung mit einem α GR-Antikörper analysiert. **A:** Hellfeldübersicht über die Wachstumszone mit der Zone der proliferierenden Chondrozyten (PC) und hypertrophen Chondrozyten (HC). **B:** Dunkelfeldübersicht der ISH mit der Kollagenase-3-Probe. Signale befanden sich in der Zone der hypertrophen Chondrozyten und im trabekulären Knochen. **C:** Immunohistochemie mit dem α GR-Antikörper. Das Signal für das GR-Protein war nahezu ubiquitär in den Kernen sämtlicher Zellen des Knochengewebes vorhanden. Maßstab (A), (B), (C) 0,5 mm.

4.1.2 AP-1/GR-Aktivierung im Knochen mit pharmakologischen Methoden

Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit konnte durch Expressionsstudien gezeigt werden, daß die Kollagenase-3-Transkription, die in definierten Untergruppen von osteogenen Zellen verortet ist, von c-Fos/AP-1 abhängt und eine mögliche Schlüsselrolle im Knochenumbau besitzt. Da die Kollagenase-3-exprimierenden Zellen auch den GR exprimieren, bietet sich der wachsende und adulte Knochen als System an um GR/AP-1-Wechselwirkungen zu studieren.

Um den GR und AP-1 im Tier zu aktivieren, wurden Hormone und Substanzen appliziert, die diese Transkriptionsfaktoren stimulieren, wie in Gewebekultur-Experimenten nachgewiesen wurde. Zur Aktivierung des GR wurde in allen nachfolgenden Experimenten das synthetische Glucocorticoid Dexamethason verwendet, das sich durch eine hohe Bindungsaffinität an den GR sowie durch eine hohe metabolische Stabilität und daher durch eine hohe biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo* auszeichnet (King und Mainwaring, 1974).

4.1.2.1 Aktivierung des GR während der Embryonalentwicklung

Als erstes wurde untersucht, inwieweit der durch Glucocorticoide aktivierte GR die basale Kollagenase-3-Expression während der Embryonalentwicklung beeinflusst. Seit langem ist die teratogene Wirkung von Glucocorticoiden während der Embryogenese bekannt. In sensitiven Mausstämmen ruft die Applikation von Glucocorticoiden Mißbildungen hervor, die sich in Gaumen- und Lippenspalten ausprägen (Fraser und Fainstat, 1951; Kalter, 1965). Um die Glucocorticoid-Wirkung auf die Kollagenase-3-Expression in den Knochenanlagen zu gewährleisten, wurden trächtige Weibchen des A/J-Mausstammes mit derjenigen Dexamethason-Dosis behandelt (Pinsky und DiGeorge, 1965), die zu einer 100% Ausbildung von Gaumenspalten führte. Trächtige Tiere wurden zum Zeitpunkt 11.5 dpc beginnend an drei aufeinanderfolgenden Tagen (bis Stadium 14.5 dpc) 150 µg Dexamethason *i.m.* injiziert und die Embryonen zum Stadium 15.5 entnommen und für die *in situ* Hybridisierungsanalyse präpariert.

Aufgrund von ISH Analysen zeigte sich in den mit Dexamethason behandelten Embryonen die Kollagenase-3-Expression in den Knochenanlagen während den Embryonalstadien 15.5 und nicht signifikant verändert gegenüber Kontroll-behandelten Tieren (Abb. 12 A, B und Daten nicht gezeigt). Die verwendete Dosierung von Dexamethason war jedoch ausreichend um in parallel behandelten Würfen eine 100% Gaumenspalteninzidenz im Embryonalstadium 18.5 dpc zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Als weiteres Kriterium wurde die Expression des Pro-Opiomelanocortin (POMC)-Gens in dem Vorderlappen der Hypophyse von Embryonen im Stadium 15.5 dpc mit ISH bestimmt (Abb. 12 C, D). In Gewebekulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Expression des POMC-Gens durch Glucocorticoide negativ reguliert wird (Drouin et al., 1993). In den Dexamethason-behandelten Embryonen war die POMC mRNA deutlich reduziert (Abb. 12 D).

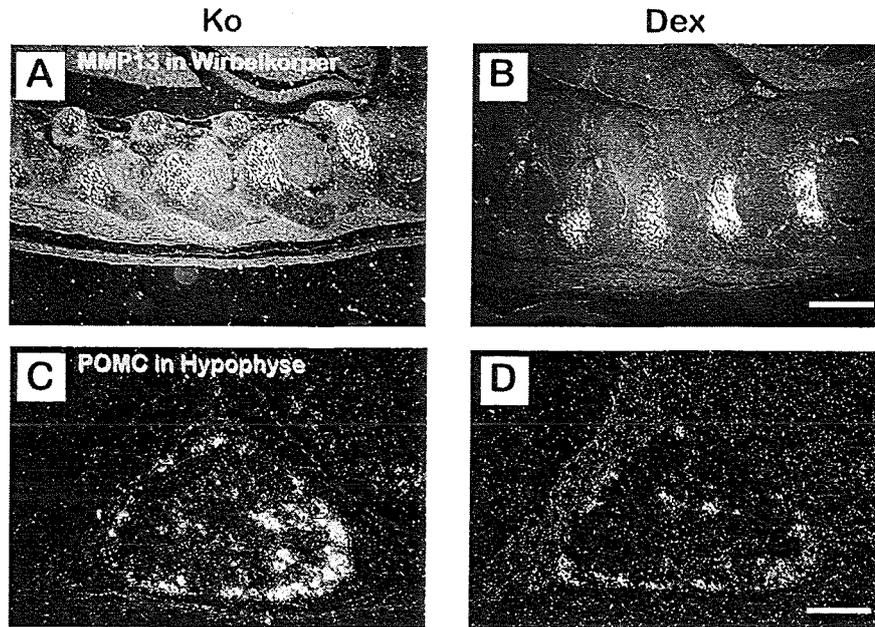


Abb. 12: Dexamethason-Behandlung von schwangeren Muttertieren beeinflusst nicht die Kollagenase-3 Expression in der Embryogenese, jedoch die POMC-Expression im Vorderlappen der Hypophyse. Schwangeren Mäusen des A/J-Stammes wurde an Tag 11,5 bis 14,5 *post coitum* jeweils 0,15 mg Dexamethason alternierend in die rechte oder linke Hüfte intramuskulär injiziert (Dex). Kontrolltieren erhielten ein gleiches Volumen 0,85% NaCl (Ko). Die Embryonen wurden zum Stadium 15.5 dpc isoliert, für die ISH-Analyse aufbereitet und Sagittalschnitte angefertigt. **A, B:** Dunkelfeldansichten von Sagittalschnitten eines Embryonen aus einem Kontroll-behandelten Muttertier (A, Ko) bzw. aus einem Dexamethason-behandelten Muttertier (B, Dex), die mit einer Kollagenase-3-spezifischen „antisense“ Probe hybridisiert worden waren. Der Ausschnitt zeigt jeweils die dorsalen Rippen mit Signalen für Kollagenase-3-mRNA in hypertrophen Chondrozyten. **C, D:** Gewebeschnitte durch den Vorderlappen der Hypophyse nach *in situ* Hybridisierung mit einer POMC-spezifischen „antisense“-Probe. **C:** Hybridisierung des Hypophysenvorderlappens des Kontroll-behandelten Embryos wie in (A, Ko). **D:** Nach der Dexamethason-Behandlung fällt das Signal für POMC-mRNA bedeutend schwächer aus. Maßstab (A), (B), 0,5 mm; (C), (D), 200 μ m.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, daß die basale Expression des Kollagenase-3-Gens während der Embryogenese durch die teratogene Dosis von Dexamethason nicht verändert wird, obwohl Glucocorticoid-induzierte morphogenetische Wirkungen, wie das Auftreten von Gaumenspalten sowie transkriptionellen Effekte wie die Repression des POMC-Gens stattfanden.

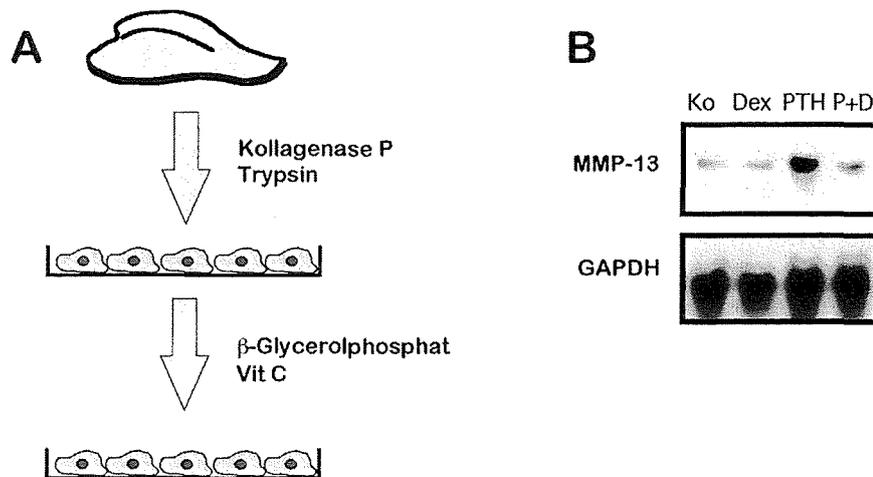


Abb. 13: Dexamethason reprimiert die PTH-induzierte Kollagenase-3-Expression in primären Osteoblasten. **A:** Aus den Calvariae von 10 Tage alten Mäusen (C57BL/6) wurde eine angereicherte primäre Osteoblastenkultur durch sequentielle enzymatische Proteolysen mittels Kollagenase P und Trypsin gewonnen. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Osteoblasten-Kultur im Verlauf von zwei Wochen durch die Anwesenheit von β -Glycerolphosphat und Vitamin C zur Differenzierung in mineralisierende Osteoblasten gebracht. **B:** Differenzierte Osteoblasten wurden mit Medium (Ko), 10^{-8} M PTH, 10^{-7} M Dexamethason (Dex) mit PTH und Dexamethason (P+D) simultan für 4 Stunden behandelt. Die Mengen an Kollagenase-3 (MMP-13)- und GAPDH wurden durch Northern Blot-Analyse bestimmt.

4.1.2.2 Dexamethason reprimiert die PTH-induzierte Kollagenase-3-Expression in primären Knochenzellen

Die Dexamethason-Applikation während der Embryogenese ergab, daß die basale Expression der Kollagenase-3 während der embryonalen Osteogenese nicht durch die exogene Applikation von Glucocorticoiden beeinflussbar ist. Unklar bleibt jedoch, ob die induzierte AP-1-vermittelte Kollagenase-3-Expression im Knochengewebe durch Dexamethason beeinträchtigt wird. Die Induktion der Kollagenase-3-Expression ist in Osteosarkomzelllinien durch Behandlung mit dem knochenresorbierenden Hormon Parathormon (PTH) erzielt worden (Quinn et al., 1990). Die Kollagenase-Induktion wird in diesen osteoblastischen Zellen durch die Aktivierung von AP-1 und Cbfa-1 vermittelt (Clohisy et al., 1992; Porte et al., 1999).

Ob die PTH-induzierte Kollagenase-3-Expression in Knochenzellen durch Dexamethason beeinflussbar ist, wurde zunächst an primären Knochenzellen *in vitro* untersucht. Dazu wurden Osteoblasten aus dem Schädeldach (Calvaria) 10 Tage alter Mäuse durch sequentielles Verdauen mit bakterieller Kollagenase herausgelöst (Abb. 13 A) und in Kultur genommen. Nach konfluentem Wachstum wurden sie unter Bedingungen kultiviert, die eine graduell

definierte Differenzierung zu kalzifizierenden Osteoblasten ermöglichen (Abb. 13 A) (Owen et al., 1990). Differenzierte Osteoblasten wurden jeweils mit PTH, Dexamethason und mit einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt. Nach vier Stunden wurde RNA aus den Zellen isoliert und die Kollagenase-3-Expression mittels einer Northern Blot-Analyse bestimmt (Abb. 13 B). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die Dexamethason-Behandlung allein keinen Einfluß auf die Kollagenase-3-Expression hatte. PTH dagegen führte in primären Osteoblasten zu einer starken Induktion des Kollagenase-3-mRNA Gehalts. In Gegenwart von Dexamethason wurde die PTH vermittelte Induktion nahezu auf den Basalwert reduziert, was auf eine Wechselwirkung zwischen AP-1-Aktivität und dem GR hinweist.

4.1.2.3 Induktion der Kollagenase-3-Expression in der Calvaria durch PTH

Wie die obigen Ergebnisse zeigen ist in primären Osteoblasten die PTH-vermittelte AP-1/Kollagenase-3 Induktion durch Glucocorticoide inhibierbar. Es stellte sich nun die Frage,

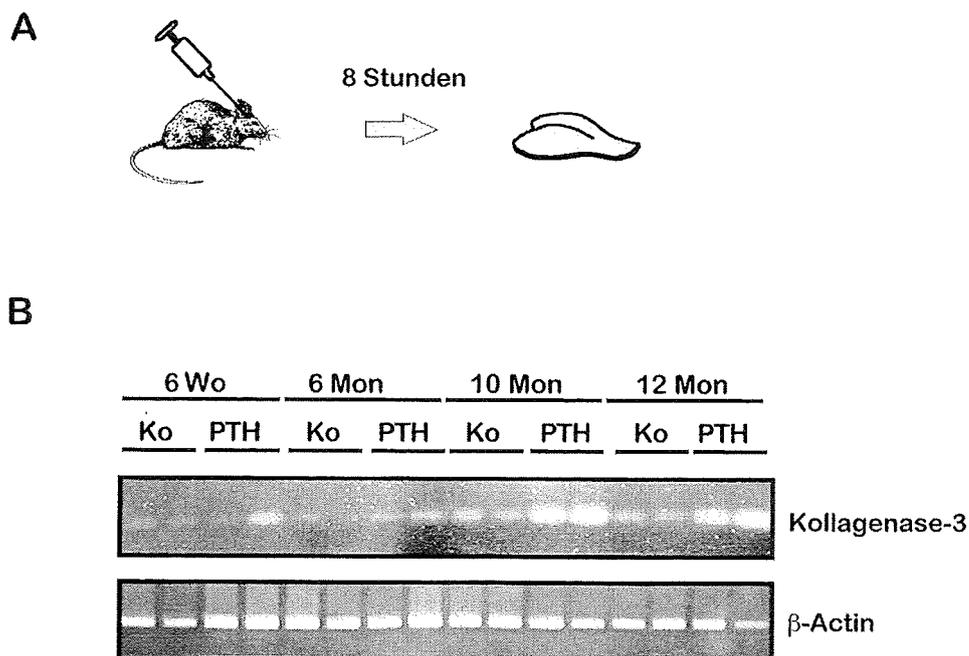


Abb. 14: Parathormon induziert die Expression der Kollagenase-3 in der Calvaria *in vivo*.
A: Adulten weiblichen Mäusen vom Stamm C57BL/6 im Alter von 6 Wochen (6 Wo), 6 Monaten (6 Mon), 10 Monaten (10 Mon) und 12 Monate (12 Mon) wurden nach Anästhesie 0,9% NaCl-Lösung (Ko) bzw. 20 μ g PTH subkutan über die Mittellinie der Calvaria injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden wurden die Tiere getötet, die Calvaria entnommen und daraus Gesamt-RNA präpariert. **B:** Aus 1 μ g Gesamt-RNA wurde mittels eines Oligo(dT)nukleotids cDNA synthetisiert, von welcher jeweils 1/10 zur Amplifikation eines Kollagenase-3- und eines β -Actin-cDNA-Fragmentes verwendet wurde (20 Zyklen). Die Fragmente wurden in einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt. Jede Spur entspricht der Präparation eines Tieres.

ob Glucocorticoide auch im komplexen System des Organismus die Parathormonwirkung beeinflussen. Daher sollte zunächst geklärt werden, ob die PTH-Applikation im Tier die Transkription des Kollagenase-3-Gens stimuliert. Um mögliche indirekte Seiteneffekte weitgehend auszuschließen, wie sie bei der Applikation von hormonellen Substanzen auftreten, wurde ein neues, auf das Zielorgan weitgehend begrenztes Applikationssystem gewählt, das kurze Einwirkzeiten zuläßt. Als Zielorgan wurde wiederum die Calvaria verwendet, da in isolierten Zellen aus diesem Gewebe, wie oben gezeigt, die PTH-Induzierbarkeit des Kollagenase-Gens nachgewiesen werden konnte (s. Kapitel 4.1.2.2).

Da der Knochenmetabolismus in der Maus während des Alterungsprozesses in seiner Intensität abnimmt und zumindest in Röhrenknochen eine altersbedingte Abnahme der basalen Kollagenase-3-Expression beobachtet worden ist (Daten nicht gezeigt und Abb. 8 J-L), wurde zunächst die Induzierbarkeit des Kollagenase-Gens durch PTH in Mäusen verschiedenen Alters bestimmt. Dazu wurde 20 µg PTH weiblichen C57BL/6 Mäusen im Alter von 6 Wochen, 6 Monaten und 12 Monaten in den subcutanen Raum über die Parietalknochen injiziert (Abb. 14 A). Für diese Injektionsmethode konnte eine lokale Ausbreitung von Substanzen über das Schädeldach nachgewiesen werden (Pollock et al., 1996). Nach 8 Stunden wurden die Tiere getötet und RNA aus den Calvariae isoliert. RT-PCR-Analysen unter Verwendung von Kollagenase-3-spezifischen Oligonukleotiden zeigten einen deutlichen Anstieg des Kollagenase-3-Transkripts in den Calvariae von PTH behandelten 10 Monate alten und 12 Monate alten Tieren gegenüber Kontroll-behandelten Tieren gleichen Alters (Abb. 14 B). Bei sechs Wochen und sechs Monate alten Tieren konnte keine Wirkung von PTH auf die Kollagenase-3-Expression unter diesen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden.

Aus diesen Experimenten ging hervor, daß Parathormon die Kollagenase-3 *in vivo* in der Calvaria induziert. Dabei hing das Ausmaß der Induktion jedoch vom Alter der Tiere ab. Aus diesem Grund wurden in den nachfolgenden Experimenten ein Jahr alte Tiere verwendet.

4.1.2.4 Repression der PTH induzierten Kollagenase-3 Transkription in der Calvaria durch Dexamethason

Die in Kapitel 4.1.2.3 beschriebene Methode zur PTH Induktion der Kollagenase-3-Expression in der Calvaria wurde dazu verwendet, um den Effekt von Dexamethason auf die PTH Wirkung zu untersuchen. Hierfür wurden ein Jahr alten weiblichen C57BL/6-Mäusen subcutan über die Parietalknochen jeweils 20 µg Parathormon, 15 µg Dexamethason, sowie eine Kombination aus beiden Substanzen appliziert. Nach 8 Stunden wurden die Tiere getötet

und die Calvariae präpariert. Zur Bestimmung des mRNA-Gehalts wurde die eine Hälfte der Calvaria für die RNA-Isolation verwendet (vgl. 4.1.2.3). Die andere Hälfte wurde für die ISH-Analyse präpariert.

Die Ermittlung des Gehalts von Kollagenase-3-mRNA wurde mittels RT-PCR durchgeführt (Abb. 15 A). Dabei konnte gezeigt werden, daß in Dexamethason-behandelten Tieren kein meßbarer Unterschied in der Kollagenase-Expression im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren bestand. Dagegen führte PTH zu einer starken Erhöhung des Kollagenase-3-mRNA-Gehalts in den Calvariae. Die gleichzeitige Applikation von PTH und Dexamethason reduzierte die PTH vermittelte Kollagenase-3 Induktion auf das Kontroll-Niveau.

Mittels ISH-Analyse mit „antisense“-RNA-Proben gegen Kollagenase-3 konnten nur in

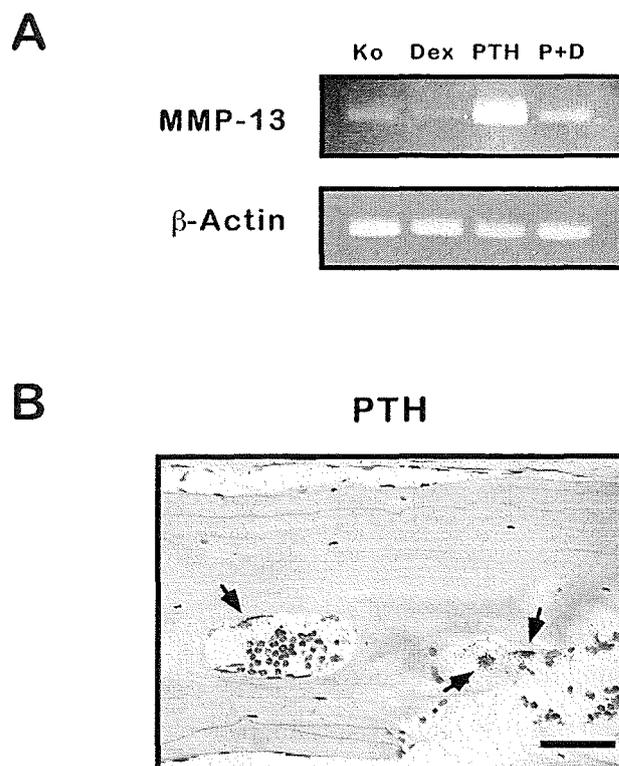


Abb. 15: Dexamethason reprimiert die PTH-induzierte Kollagenase-3-Expression in der Calvaria *in vivo*. A: Adulte Weibchen vom Stamm C57BL/6 im Alter von 12 Monaten (12 Mon) wurden wie in Abb. 14 (A) beschrieben mit 0,9% NaCl-Lösung (Ko), 50 μ g Dexamethason (Dex), 20 μ g PTH (PTH) oder simultan mit PTH und Dexamethason (P+D) behandelt. Nach 8 Stunden wurden die Tiere getötet, die Calvaria entnommen und die Expression der Kollagenase-3 und des β -Actins wie in Abb. 14 (B) beschrieben mittels RT-PCR bestimmt. B: ISH-Analyse eines transversen Gewebeschnittes durch die Calvaria einer PTH-behandelten Maus mit Kollagenase-3-spezifischer „antisense“-Probe. Signale für die Kollagenase-3-Expression befanden sich in Zellen, die an den Rändern der Knochenmatrix angesiedelt waren. Maßstab (B) 100 μ m

Calvariae von PTH behandelten Tieren Signale entdeckt werden (Abb. 15 B und Daten nicht gezeigt). Die Kollagenase-3-positiven Zellen waren mononukleär und befanden sich an der Oberfläche der Knochenmatrix. Sie stellten daher im Knochenumbauprozeß befindliche Osteoblasten dar.

Diese Befunde zeigen erstmalig, daß im Schädeldach das knochenresorbierende Hormon PTH das Kollagenase-3-Gen in Osteoblasten induziert. Dexamethason unterdrückt die PTH-induzierte osteoblastäre Kollagenase-3-Expression vollständig und weist damit auf die negative Interferenz von AP-1 durch den GR im Knochengewebe hin.

4.1.2.5 Expression der Kollagenase-3 im Femur bei systemischer Applikation von PTH und Dexamethason

Die Röhrenknochen bilden den Hauptanteil des Knochengewebes im Körper. Um zu untersuchen, ob auch in diesen Organen Kollagenase-3-Expression durch PTH und Glucocorticoide reguliert wird, wurde die Wirkung von PTH und Dexamethason auf den Femur untersucht. Da hier jedoch eine lokal wirkende Applikation nicht möglich war, wurde die Injektion der Substanzen subcutan unter die Rückenhaut von 8 Wochen alten A/J Mäuse durchgeführt. Als Inkubationszeit wurde ein Zeitraum von 16-24 Stunden gewählt, um die Wirkung der Substanzen im Zielorgan zu gewährleisten. Den Mäusen wurde dreimalig alle sechs Stunden 20 µg PTH (Methode nach Lee et al., 1994) oder einmalig 15 µg Dexamethason sowie beide Substanzen kombiniert injiziert. Die Tiere wurden nach 16 und 24 Stunden getötet und RNA aus den Oberschenkelknochen präpariert (Abb. 16 A).

Interessanterweise bewirkte die Dexamethason-Behandlung im Röhrenknochen sowohl nach 16, als auch nach 24 Stunden eine Zunahme der Kollagenase-3-mRNA (Abb. 16 B). PTH erwies sich auch in diesem System als starker Induktor des Kollagenase-3-Gens zu beiden Zeitpunkten. Die Kostimulation mit PTH und Dexamethason führte zu einer leichten Reduktion der PTH vermittelten Kollagenase-Induktion nach 16 Stunden. Die absolute mRNA-Menge war jedoch deutlich höher als der basale Kontrollwert. Nach 24 Stunden war kein repressiver Effekt der PTH-Induktion durch Dexamethason nachweisbar.

Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, daß nach systemischer Applikation im Röhrenknochen die Expression durch das knochenresorbierende Hormon PTH erhöht wird. Im Gegensatz zu dem Calvaria-Induktions-Experiment, bei dem die Substanzen lokal begrenzt und kurzzeitig einwirken, hatte die systemische Langzeitapplikation von Dexamethason eine leicht steigernde Wirkung auf die Kollagenase-Expression im Vergleich zum Basalwert,

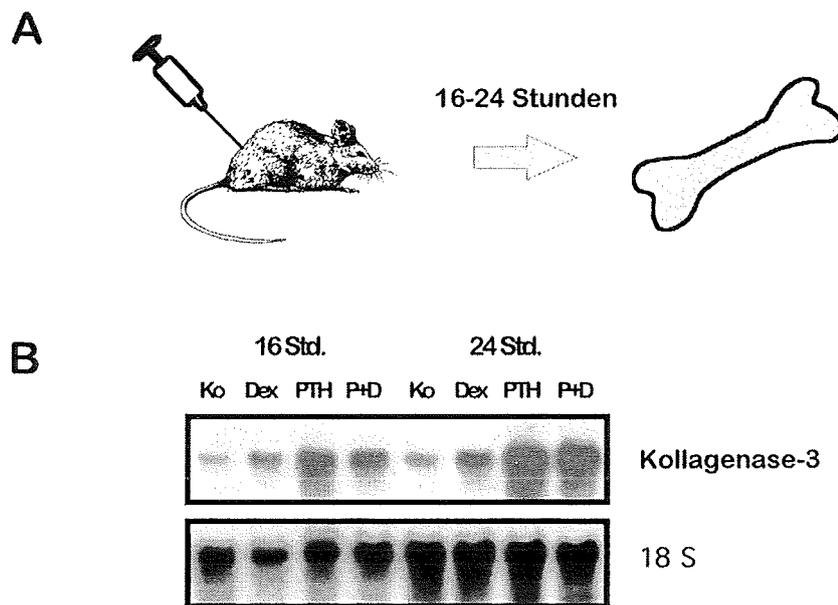


Abb. 16: Systemische Behandlung von Mäusen führt zu einer Induktion der Kollagenase-3 Expression in Röhrenknochen mit PTH und Dexamethason. **A:** 6 Wochen alten weiblichen Mäusen vom Stamm A/J wurde dreimalig im Abstand von 6 Stunden jeweils 200 μ l NaCl-Lösung (Ko), einmalig 50 μ g Dexamethason (Dex), dreimalig jeweils 20 μ g PTH (PTH) oder in Kombination einmalig Dexamethason und dreimalig PTH (P+D) subkutan unter die Nackenhaut injiziert. Nach 16 bis 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Tiere getötet und die Femuralknochen freipräpariert. **B:** Von Gesamt-RNA aus den Femuralknochen von Kontroll (Ko)-, Dexamethason (Dex)-, PTH- und PTH/Dexamethason (P+D)-behandelten Mäusen wurden die Transkriptmengen an Kollagenase-3 (MMP-13)- und 18 S-spezifischer RNA durch Northern Blot-Analyse ermittelt.

während die PTH-induzierte Kollagenase-3-Expression durch Dexamethason leicht oder gar nicht beeinflusst wurde.

Wie diese Untersuchungen gezeigt haben, können mit Hilfe des Calvaria-Systems AP-1/GR-Interaktionen auf der Transkriptionsebene im Knochen *in vivo* nachgewiesen werden. Dieses Verfahren ist der systemischen Applikation vorzuziehen, da die verwendeten Inkubationszeiten kurz sind und nur ein Zelltyp - die Osteoblasten - für die Kollagenase-Induktion ausschlaggebend sind.

4.2 AP-1/GR Wechselwirkung in der Haut

Glucocorticoide sind die wirksamsten Inhibitoren der Tumorpromotion in der Phorbol-ester vermittelten experimentellen Mehrstufenkarzinogenese (Slaga, 1984). Eine Vielzahl von Befunden aus Gewebekultur- und tierexperimentellen Studien belegen, daß die Aktivierung von AP-1 eine maßgebliche Rolle bei der 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) induzierten Tumorpromotion spielt. Die TPA-Behandlung von Zellen führt zur raschen transkriptionellen und posttranslationalen Aktivierung von AP-1 (Angel und Karin, 1991). Die Überexpression von AP-1-Komponenten führt zur Transformation in Zellen (Angel und Karin, 1991) und zum spontanen Auftreten von Tumoren in *c-fos*- und *c-jun*-transgenen Tieren (Wang et al., 1995). Umgekehrt unterbleibt in *c-Fos*-defizienten Mäusen die TPA-induzierte maligne Progression von Papillomen (Saez et al., 1995). Aufgrund der beschriebenen Funktionen von AP-1 bei der Tumorpromotion ist die AP-1/GR Wechselwirkung als molekulare Basis für die Hemmung der Tumorpromotion durch Glucocorticoide postuliert worden (Jonat et al., 1990). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst ein *in vivo*-Applikationssystem etabliert, welches es ermöglicht, AP-1-aktivierte Transkription in der Haut nachzuweisen. Anhand dieses Systems wurde anschließend die Wechselwirkungen zwischen AP-1 und dem GR untersucht.

4.2.1 AP-1-Aktivität in der Haut

4.2.1.1 Der PKC Aktivator TPA induziert die Expression von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in der Haut

Phorbol-ester werden während der Mehrstufenkarzinogenese in der Maushaut als Tumorpromotoren eingesetzt. Als effizienter Aktivator des PKC-Signaltransduktionswegs führt insbesondere die Verwendung von 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) in immortalen dermalen Fibroblasten und Hautkeratinozyten zur transkriptionellen Aktivierung der AP-1-Zielgene Kollagenase und Stromelysin (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b; Clark et al., 1985; Petersen et al., 1987; Windsor et al., 1993).

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von AP-1 durch Tumorpromotoren anhand der Transkription der Kollagenase-3 und Stromelysin-1 *in vivo* meßbar ist, wurde TPA topisch auf die Maushaut appliziert (Abb. 17). Um ein Eindringen des in acetonischer Lösung befindlichen Agens zu gewährleisten, wurden 8 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse, die sich in der Ruhephase des Haarzyklus befanden, auf dem Rücken rasiert. Die Rasur fand mindestens 72 Stunden vor der Behandlung statt, um eventuelle Reizungen der Maushaut

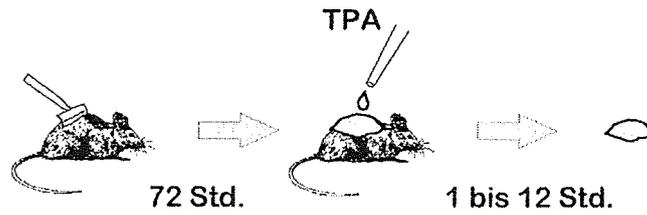


Abb. 17: Applikationsschema der topischen Behandlung der Mause Rückenhaut. Der Rücken von 8 Wochen alten Mäusen (C57BL/6) wurde drei Tage vor der Behandlung rasiert (ca. 9 cm² rasierte Rückenfläche). Die Behandlung erfolgte durch Aufbringen von 100 µl acetonischer Lösungen, die TPA Bryostat-1 oder Dexamethason enthielten, auf die Rückenfläche. 1 bis 12 Stunden später wurden die Tiere getötet, eine kleine Biopsie der Rückenfläche für die ISH-Analyse aufbereitet und der Rest für die RNA-Isolation verwendet.

abklingen zu lassen. Auf die rasierte Fläche wurde TPA in den Dosen von 0,1 nmol, 1 nmol 10 nmol oder 50 nmol pro Rückenfläche (ca. 9 cm²) aufgetragen.

Als Inkubationszeit wurde ein Zeitraum gewählt, der für die Expression von AP-1-Zielgenen in Gewebekultur ausreichend ist. Nach sechs Stunden wurden die Tiere getötet und die Haut, bestehend aus Epidermis, Dermis, subdermalen Fettgewebe und Panniculus carnosus präpariert und RNA isoliert (Abb. 18). Mittels Northern Blot-Analyse konnte gezeigt

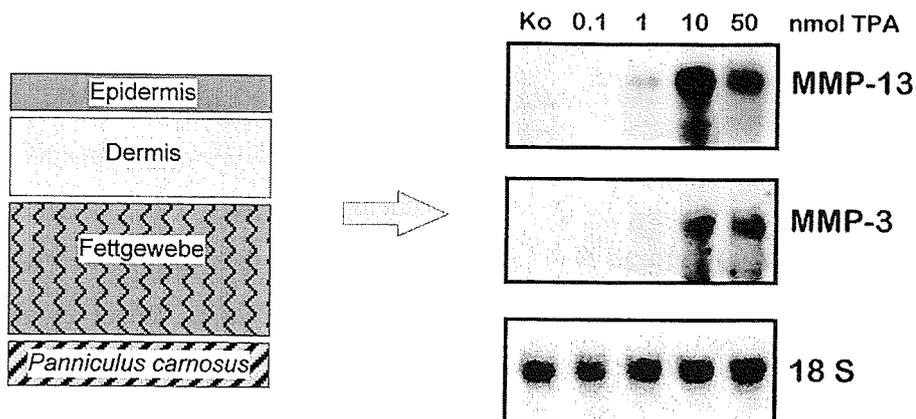


Abb. 18: Der PKC-Aktivator TPA induziert die AP-1-abhängigen Gene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in der Mause Haut. 8 Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6, die topisch mit Aceton (Ko), 0,1 nmol, 1 nmol, 10 nmol oder 50 nmol TPA auf der rasierten Rückenfläche behandelt worden waren (vgl. Abb. 17), wurden nach 6 Stunden getötet. Aus der gesamten Haut einschließlich Epidermis, Dermis, Fettgewebe und dem Panniculus carnosus wurde Gesamt-RNA isoliert und für die Bestimmung der RNA-Mengen der Kollagenase-3 (MMP-13), Stromelysin-1 (MMP-3) und 18 S RNA durch Northern Blot-Analyse verwendet.

werden, daß in der Haut von Kontroll-behandelten Tieren Kollagenase-3- und Stromelysin-1-mRNA nahezu nicht nachweisbar war. Die Behandlung mit 1 nmol TPA hingegen führte zu einer leichten, mit 10 und 50 nmol zu einer drastischen Induktion der Kollagenase-3 und Stromelysin-1 Transkription. Die Dosis von 10 nmol, die Kollagenase-3-mRNA am stärksten induzierte, führt bei wiederholter Auftragung zur Bildung von Papillomen im Mehrstufenkarzinogenese-Experiment (Fürstenberger und Kopp-Schneider, 1995). Diese tumorpromovierende Dosis wurde daher für die nachfolgenden Experimente verwendet.

In Gewebekulturzellen konnte nachgewiesen werden, daß die Induktion des Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Gens durch TPA neben posttranslationeller Modifikation bereits bestehender AP-1-Komponenten auch die transkriptionelle Aktivierung der *c-jun* und *c-fos*-Gene benötigt (Angel und Karin, 1991). Um zu überprüfen, ob in der Haut ebenfalls eine *de novo*-Synthese dieser AP-1-Untereinheiten der TPA-induzierten MMP-Expression vorangeht, wurde TPA-behandelte Maushaut nach einer, vier und sechs Stunden auf die Expression von *c-jun*, *c-fos*, Kollagenase-3 und Stromelysin-1 untersucht (Abb. 19). Die *c-jun*-Induktion erreichte ihr Maximum nach einer Stunde und sank auf basale Werte nach vier

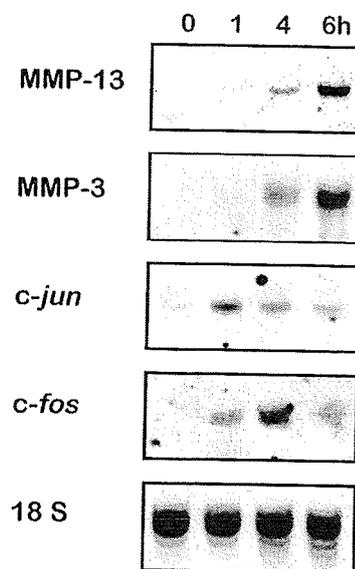


Abb. 19: *C-jun*- und *c-fos*-mRNA werden *in vivo* als „immediate early genes“ vor der Expression von AP-1 Zielgenen durch TPA induziert. Nach der Behandlung mit 10 nmol TPA auf der rasierten Rückenhaul wurden die 8 Wochen alten Mäuse (C57BL/6) sofort (0), nach einer (1), vier (4) oder sechs Stunden (6h) Stunden getötet. Die Mengen an *c-jun*-, *c-fos*-, Kollagenase-3 (MMP-13)-, Stromelysin-1 (MMP-3) und 18 S-spezifischer RNA wurden durch Northern Blot-Analysen aus jeweils 15 µg Gesamt-RNA der Rückenhaul ermittelt.

Stunden. Der *c-fos* mRNA-Gehalt war nach einer Stunde im Vergleich zum Anfangszeitpunkt deutlich induziert und nahm bis zur vierten Stunde zu. Nach sechs Stunden war die Transkriptmenge gegenüber dem Basalwert nur noch schwach erhöht. Die MMP-Gene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 waren nach vier Stunden induziert und steigerten die Expression nach sechs Stunden.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß *c-jun* und *c-fos* *in vivo* als „immediate early genes“ transkribiert werden und wahrscheinlich als Voraussetzung für die Induktion der Zielgene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 Gene dienen.

4.2.1.2 Bryostatin-1 aktiviert AP-1 Zielgene *in vivo*

Bryostatin-1 ist ein makrozyklisches Lacton, das ebenso wie TPA an PKC bindet, und dadurch eine Reihe von zellulären Antworten auslöst, wie sie auch durch TPA hervorgerufen werden (Smith et al., 1985). Das Wirkungsspektrum von Bryostatin-1 umfaßt jedoch nur einen Teil desjenigen von TPA. TPA-induzierte Wirkungen, die durch Bryostatin-1-Behandlung nicht hervorgerufen werden, werden bei simultaner Behandlung von TPA und Bryostatin-1 sogar gehemmt. Insbesondere entzündliche und tumorigene Prozesse, die durch TPA bewirkt werden, werden durch Bryostatin-1 inhibiert (Gschwendt et al., 1988; Hennings et al., 1987). Dafür ist vermutlich die effektivere Inaktivierung von PKC-Isoformen durch

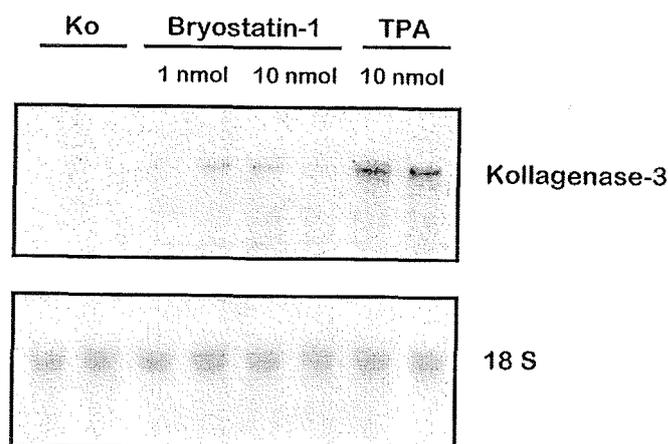


Abb. 20: Bryostatin-1 induziert AP-1-Zielgene in der Haut. Aus der Rückenhaut von 8 Wochen alten Mäusen (C57BL/6), die topisch mit Aceton (Ko), 1 nmol oder 10 nmol Bryostatin-1 oder 10 nmol TPA behandelt worden waren (vgl. Abb. 17), wurden nach sechs Stunden Einwirkzeit Gesamt-RNA isoliert. Die Expression von Kollagenase-3 (MMP-13)-, Stromelysin-1 (MMP-3)- und 18 S-spezifischer RNA wurde durch Northern Blot-Analysen aus jeweils 15 µg Gesamt-RNA bestimmt.

Bryostatin-1 gegenüber TPA verantwortlich, indem eine Ubiquitinylierung mit nachfolgender Degradation von PKC-Isoformen induziert wird (Szallasi et al., 1994). Daher ist das Zeitfenster des Aktivitätszustandes der PKC kleiner bei der Bryostatin-1-Behandlung gegenüber der TPA-Applikation. Um die Frage zu beantworten, ob die Aktivierung der PKC durch Bryostatin-1 ausreichend ist, AP-1-abhängige Gene *in vivo* zu aktivieren, wurden Mäuse auf der Rückenhaut mit Bryostatin-1 behandelt und die Kollagenase-3-Expression mit derjenigen in TPA-behandelten Mäusen verglichen.

Dosen von 1 nmol und 10 nmol Bryostatin-1 führten nach sechs Stunden zur Induktion von Kollagenase-3- und Stromelysin-1-mRNA (Abb. 20). Die Bryostatin-1-vermittelte Steigerung der Transkription erreichte jedoch bei weitem nicht die durch TPA vermittelte Wirkung.

Diese Resultate zeigen, daß der PKC-Aktivator Bryostatin-1 wie Phorbol ester in der Lage ist, AP-1 abhängige Gene *in vivo* zu induzieren. Die Potenz zur Steigerung der Kollagenase-3-Induktion liegt jedoch weit hinter derjenigen von TPA.

4.2.1.3 TPA induziert die Gene für Kollagenase-3 und Stromelysin-1 Zelltyp-spezifisch

In den Northern Blot-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß TPA in der Haut die Gene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 stark induziert (vgl. 4.2.1.1.). Zur Bestimmung der Hautkompartimente (vgl. Abb. 18) und der Zelltypen, die Kollagenase-3- und Stromelysin-1-mRNA nach TPA-Behandlung synthetisieren, wurden auf parallelen transversen Gewebeschnitten von sechs Stunden TPA-behandelter Haut ISH mit RNA-Proben gegen Kollagenase-3 und Stromelysin-1 durchgeführt.

Die Hybridisierung mit der „antisense“ Kollagenase-3 RNA-Probe in Gewebeschnitten ergab Signale in der Basalschicht der Epidermis (Abb. 21 A). Innerhalb der Basalschicht wiesen einzelne Keratinozyten ein starkes Signal auf, während zwischen diesen Zellen Kollagenase-3 Signal-negative Zellen eingestreut waren (Abb. 21 B). In den anderen Hautkompartimenten, wie der Dermis oder dem subdermalen Fettgewebe wurde keine Kollagenase-3-Expression gefunden (Abb. 21 A).

Im Gegensatz zur Kollagenase-3-Expression ergab die ISH mit der Stromelysin-1-spezifischen Sonde den Hauptanteil der Signale in der Dermis (Abb. 21 C). Innerhalb der Dermis war das Stromelysin-1-Signal weitgehend auf monozytische Zellen beschränkt (Abb. 21 D). Die Epidermis war weitgehend negativ für Stromelysin-1 Signale, mit Ausnahme einiger

Keratinocyten an der Basis von Haarwurzeln. In weiteren Kompartimenten der Haut wurde keine Expression nachgewiesen (Abb. 21 C).

Erstaunlicherweise waren Fibroblasten in der Dermis weder für das Kollagenase-3-, noch für das Stromelysin-1-Signal positiv (Pfeile in Abb. 21 B, D). Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen von primären und immortalen Fibroblasten in Gewebekultur, die nach TPA-Stimulation sowohl interstitielle Kollagenase, als auch Stromelysin-1 exprimieren (Clark et al., 1985; Wilhelm et al., 1987).

Die ISH-Analyse belegt, daß TPA AP-1-abhängige Gene in der Haut Zelltyp-spezifisch induziert: Eine Untergruppe von basalen Keratinocyten ist induzierbar für Kollagenase-3-

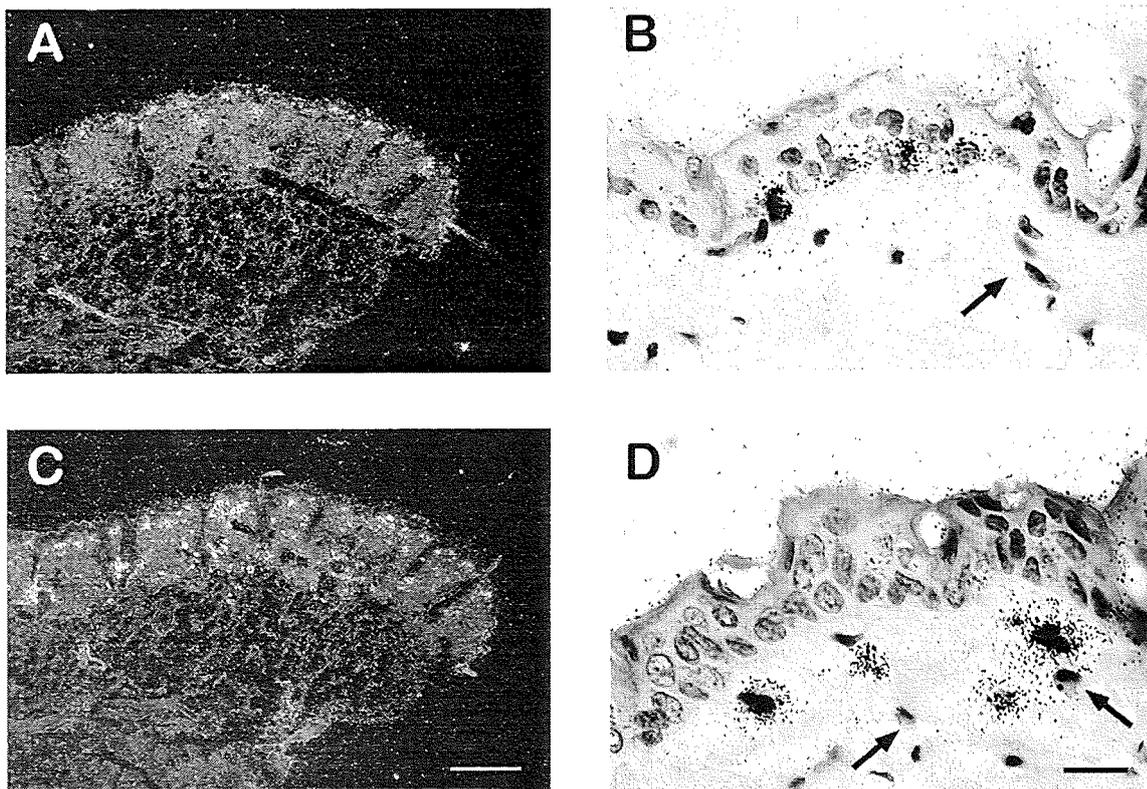


Abb. 21: Die TPA induzierte Kollagenase-3 und Stromelysin-1-Expression in der Haut ist Zelltyp-spezifisch. ISH-Analysen der Kollagenase-3- (A, B) und der Stromelysin-1-Expression (C, D) von parallelen transversen Gewebeschnitten der Rückenhaut einer 8 Wochen alten C57BL/6 Maus, die mit 10 nmol TPA für 6 Stunden behandelt worden war. **A:** Dunkelfeldansicht, welche die Beschränkung der Kollagenase-3-spezifischen Signale auf die Epidermis zeigt. (vgl. schematischen Aufbau der Haut in Abb. 18). **B:** In der Epidermis exprimierten ausschließlich einzelne Keratinocyten Kollagenase-3 **C:** Die Hybridisierung eines Parallelschnittes zu (A) mit einer Stromelysin-1 spezifischen Probe zeigte Signale für die Stromelysin-1 Expression hauptsächlich in der Dermis. **D:** Stromelysin-1-Expression in monozytischen Zellen. Pfeile in (B) und (C) kennzeichnen die Zellkerne von Fibroblasten. Maßstab (A), (C) 100 μ m; (B), (D) 20 μ m.

Expression; monozytische Zellen exprimieren Stromelysin-1. Dermale Hautfibroblasten erweisen sich *in vivo* als nicht permissiv für TPA vermittelte MMP-Expression.

4.2.1.4 Expression von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in TPA-induzierten Tumoren

Bisher konnte *in vivo* demonstriert werden, daß eine Einzeldosis TPA die Transkription der AP-1-Komponenten *c-jun* und *c-fos*, sowie deren Zielgene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in

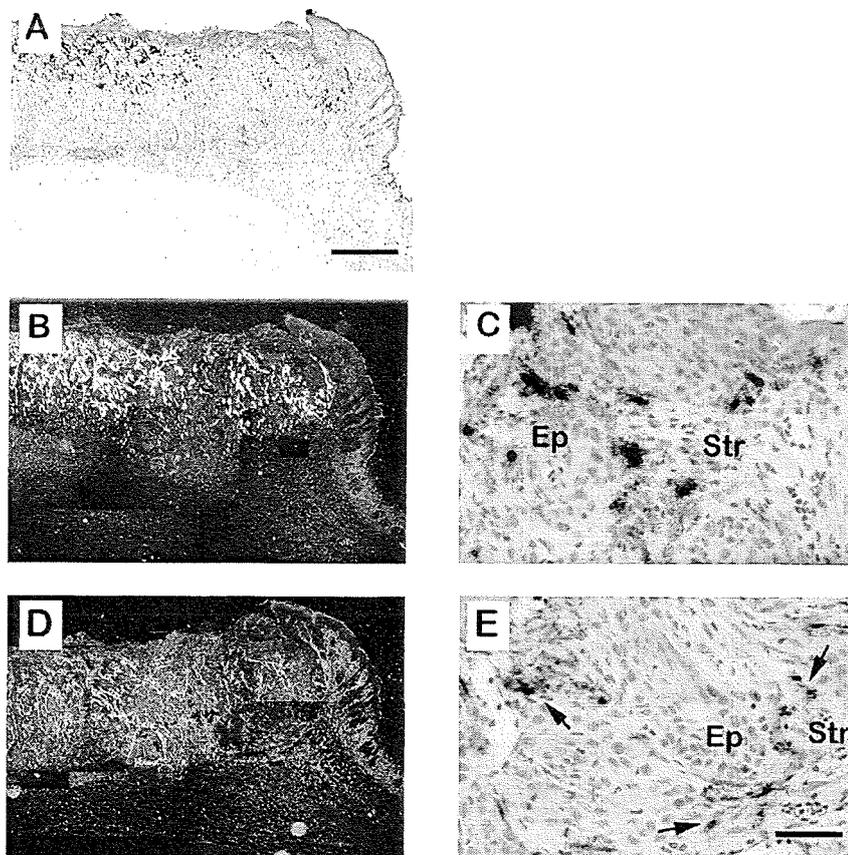


Abb. 22: Kollagenase-3 und Stromelysin-1 sind in TPA-promovierten Plattenepithelkarzinomen konstant überexprimiert. ISH-Analysen von transversen Gewebeschnitten eines Plattenepithelkarzinoms, das durch eine einmaligen Behandlung mit dem Tumorigen DMBA und darauffolgende zweimal wöchentliche Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA auf der Rückenhaut einer NMRI-Maus nach 50 Wochen entstanden war. **A:** Hellfeldübersicht eines Transversalschnitts durch ein Plattenepithelkarzinom mit normalen Hautgewebe (am rechten Rand). **B:** Kollagenase-3-Expression in der Dunkelfeldansicht (vgl. A). **C:** Detailansicht aus (B) (vgl. Kasten in A), die transformierte Epithelzellbereiche (Ep) und Stromazellbereiche (Str) aufzeigt. Kollagenase-3-positive Zellen waren in beiden Bereichen zu finden. **D:** Stromelysin-1-Expression im Plattenepithelkarzinom. **E:** Detailansicht aus (D), der Stromelysin-positive Zellen (Pfeile) ausschließlich im Stroma (Str) aufzeigt. Maßstab (A), (B), (D) 1 mm; (C), (E) 50 µm.

der Haut induziert. Eine Reihe von Tumor-assoziierten Genen, die in Papillomen und Karzinomen konstant überexprimiert sind, werden durch TPA in der Haut transient als „secondary response genes“ induziert (Hashimoto et al., 1990). Um zu überprüfen, ob die durch TPA vorübergehend induzierten Gene der Kollagenase-3 und Stromelysin in Tumoren, die durch TPA promoviert worden sind, exprimiert sind, wurde die Expression von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 mittels ISH in Plattenepithelkarzinomen untersucht. Die ISH-Analyse ergab, daß sich Signale für Kollagenase-3- und Stromelysin-1-mRNA in Plattenepithelkarzinomen in starker Intensität im gesamten Tumorbereich befinden (Abb. 22 B, D) Sowohl transformierte Epithelzellen als auch benachbarte Stromazellen zeigten Signale für Kollagenase-3 mRNA (Abb. 22 C). Stromelysin-1 blieb dagegen weitgehend auf die Stromazellen beschränkt (Abb. 22 E).

Die ISH-Analysen in den Plattenepithelkarzinomen belegen, daß in TPA-promovierten Tumoren die Gene für Kollagenase-3 und Stromelysin-1 konstant überexprimiert sind.

4.2.2 Interferenz von AP-1-vermittelter Transkription durch den GR

In den vorangegangenen Experimenten konnte demonstriert werden, daß Tumorpromotoren und PKC-Aktivatoren wie TPA und Bryostatin AP-1 aktivieren und die Expression der AP-1 Zielgene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 *in vivo* induzieren. Die transiente Expression der AP-1 Zielgene spiegelt sich in der dauerhaften Expression dieser Gene in Tumoren wider, die im Prozeß der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese erzeugt worden sind.

Um nun zu untersuchen, ob der GR die AP-1-Aktivität in der Haut beeinflusst, wurden 7 Wochen alte C57BL/6 Mäuse simultan mit TPA und dem GR-Agonisten Dexamethason behandelt. Für die Dexamethason-Behandlung wurde eine Dosis verwendet, die bei wiederholter Anwendung ausreichend ist, die TPA-induzierte Papillombildung in Mäusen zu inhibieren (Nguyen-Ba und Chouroulinkov, 1989). Dexamethason-Behandlung alleine zeigte keine Veränderung in der Expression von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 (Abb. 23). Dagegen führte die Verwendung von 10 nmol TPA, wie schon in früheren Experimenten gezeigt wurde (s. 4.2.1.1), zu einer starken Induktion der Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Gene. In Gegenwart von Dexamethason wurde die TPA-Induktion beider Gene auf nicht detektierbare Basalwerte reprimiert.

Die Repression der TPA-induzierten Gene durch Dexamethason konnte auch anhand der ISH-Analyse von Hautbiopsien TPA und Dexamethason behandelte Tiere nachgewiesen werden. Nur in der Haut von TPA-behandelten Tieren waren deutliche Signale für Kollagenase-3-

mRNA in Basalzellen der Epidermis und für Stromelysin-1-mRNA in monozytischen Zellen in der Dermis sichtbar (Abb. 24). In simultan mit TPA und Dexamethason behandelter Haut wurden keine Signale für die Expression beider Gene gefunden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Dexamethason die TPA-induzierte Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Expression in der Haut vollständig reprimiert. Damit konnte erstmalig *in vivo* demonstriert werden, daß der GR negativ mit der PKC-Aktivierung von AP-1-vermittelter Transkription interferiert.

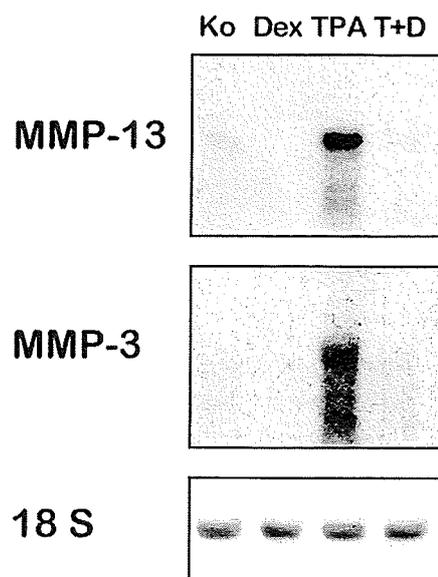


Abb. 23: In Gegenwart von Dexamethason wird die TPA-Induktion der Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Gene gehemmt. 8 Wochen alte Mäusen des Stammes C57BL/6, die topisch mit Aceton (Ko) 50 µg Dexamethason, 10 nmol TPA oder gleichzeitig mit TPA und Dexamethason (T+D) auf der rasierten Rückenhaut wie in Abb. 17 beschrieben behandelt worden waren, wurden nach sechs Stunden getötet. Aus der Haut wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels Northern Blot die RNA-Mengen von Kollagenase-3 (MMP-13), Stromelysin-1 (MMP-3) und 18 S-spezifischer RNA analysiert.

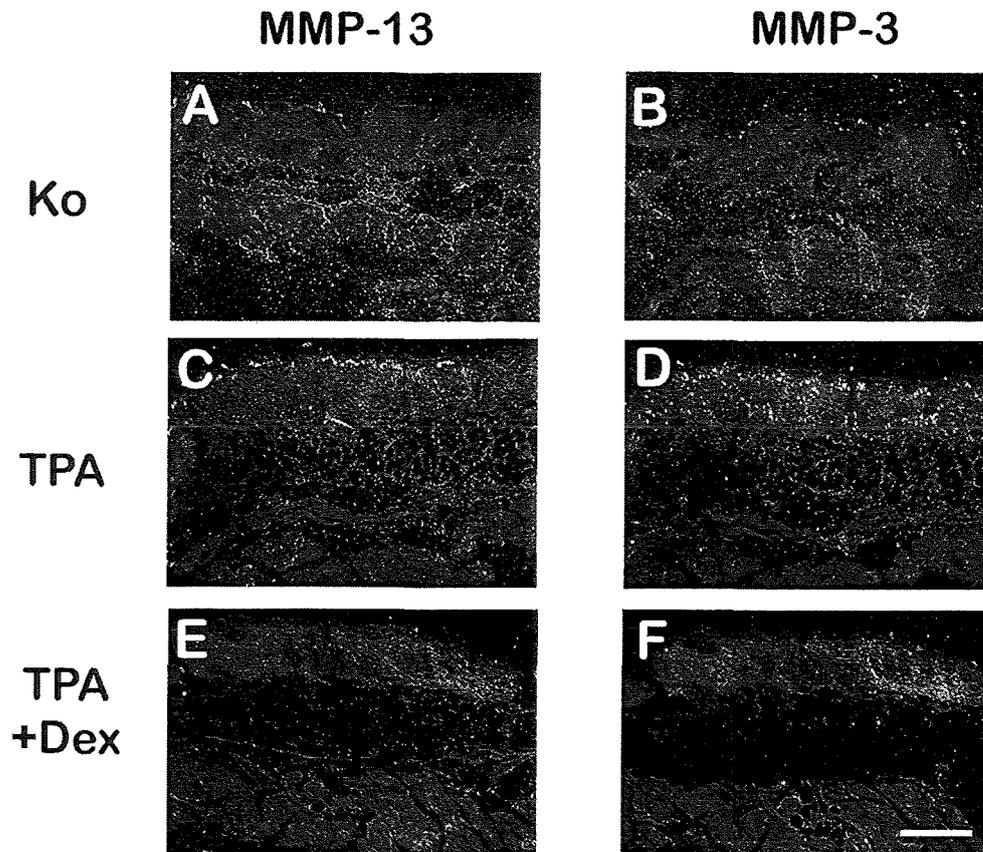


Abb. 24: Die Zelltyp-spezifische Induktion der Gene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 wird durch Dexamethason gehemmt. 8 Wochen alte Mäusen des Stammes C57BL/6, die topisch mit Aceton (Ko: A, B), 10 nmol TPA (TPA: C, D) oder gleichzeitig mit TPA und 50 µg Dexamethason (TPA+Dex: E, F) auf der rasierten Rückenhaut behandelt worden waren, wurden nach sechs Stunden getötet. Gewebeschnitte der behandelten Haut wurden mittels ISH analysiert. A, C, E: Dunkelfeldansichten von Gewebeschnitten nach der Hybridisierung mit einer Kollagenase-3-spezifischen „antisense“ Probe. Signale waren nur in der Epidermis der TPA-behandelten Haut zu finden (C). B, D, F: Dunkelfeldansichten von Gewebeschnitten, die mit einer Stromelysin-1-spezifischen „antisense“ Probe hybridisiert worden waren. Signale für Stromelysin-1 Transkripte waren nur in der Dermis der TPA-behandelten Haut zu finden (D). Maßstab (A), (B), (C), (D), (E), (F) 200 µm.

4.3 AP-1/GR-Wechselwirkungen in Abwesenheit der DNA-Bindungsfunktion des GR

Bei der Repression von AP-1-vermittelter Transkription durch Dexamethason in der Haut kann die Aktivierung von GR-abhängigen Genen, deren Produkte mit der AP-1-Aktivität interferieren könnten, nicht ausgeschlossen werden. Um die Protein-Protein-Interaktion des GR mit AP-1 im Tier mechanistisch nachzuweisen, wurden im dritten Teil dieser Arbeit AP-1/GR Wechselwirkungen in GR^{dim}-Mäusen charakterisiert. Diese mutante Mauslinie trägt eine Punktmutation (A458T) in der D-Box-kodierenden Region des GR-Gens, die durch homologe Rekombination in den genomischen GR-Locus eingeführt worden war (Reichardt et al., 1998). Für diese Mutation wurde in transienten Transfektionsexperimenten nachgewiesen, daß die Eigenschaft der DNA-Bindung des GR^{dim}-Moleküls und damit die transkriptionelle Aktivierung von GRE-enthaltenen Promotoren abwesend ist, während die Transrepression von AP-1 ähnlich effizient wie beim Wildtyp GR abläuft (Heck et al., 1994). Mäuse, die homozygot das GR^{dim}-Allel tragen, besitzen im Gegensatz zu GR-Knock-Out-Mäusen einen nicht-lethalen milden Phänotyp (Reichardt et al., 1998): GR^{dim}-Mäuse wiesen nicht die bei

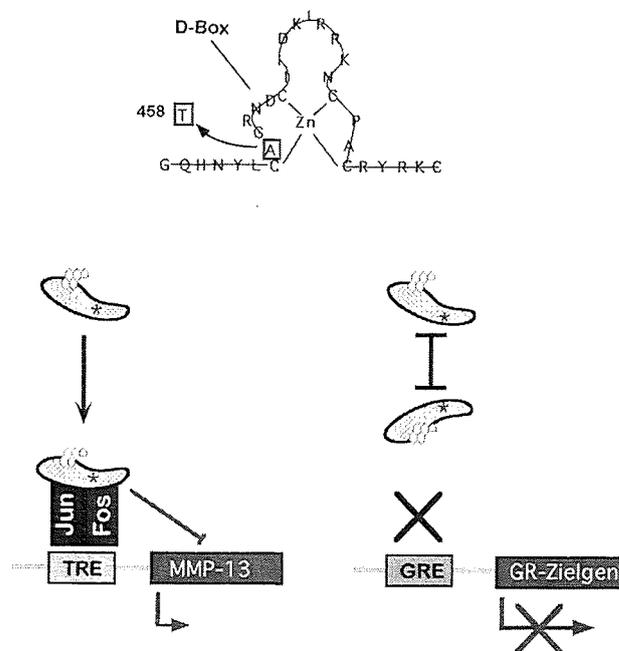


Abb. 25: Der Aminosäureaustausch A458T in der D-Box der DNA-Bindungsdomäne des GR führt zum Verlust der DNA-Bindungsfunktion, ermöglicht aber noch Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Komplett-Knock-Out Tieren vorhandene Atelektasie der Lungen auf. Auch das Nebennierenmark, das bei GR-Null-Tieren im Aufbau gestört war (Cole et al., 1995), war im Kontext der GR^{dim}-Mutante nicht beeinträchtigt. Mild ausgeprägte Phänotypen der GR^{dim}-Mäuse zeigten sich im blutbildenden System, in dem die Proliferation von Erythrozyten-Vorläuferzellen verzögert war, und in der Glucocorticoid-vermittelten Apoptose von T-Zellen, welche jedoch nicht zu einem abnormen Profil der CD4/CD8-Verteilung führten.

Ob in der GR^{dim}-mutanten Maus die transaktivierenden Eigenschaften des GR tatsächlich ausgeschaltet worden sind und die reprimierenden Eigenschaften des GR noch funktionell vorhanden sind, wurde zunächst an anerkannten Paradigmen überprüft. Die Hemmung der TPA-induzierten transkriptionellen Aktivierung der interstitiellen Kollagenase durch Dexamethason in Fibroblasten ist eines der am besten charakterisierten Systeme zum Studium der wechselseitigen Beeinflussung von AP-1 und dem GR. Daher wurde mit der Isolation und Immortalisierung von embryonalen Fibroblasten (MEF) aus GR^{dim}-Mäusen begonnen, um die GR/AP-1-Wechselwirkungen zu untersuchen.

4.3.1 In embryonalen Fibroblasten aus GR^{dim}-Mäusen wird AP-1 in Abwesenheit von GRE-gesteuerter Genexpression durch Dexamethason reprimiert

Aus einer Kreuzung GR^{dim/+}-heterozygoter Elterntiere wurden Embryonen im Stadium 14.5 dpc präpariert und zur Isolierung von embryonalen Fibroblasten (MEF) verwendet. Es wurden sechs Isolate aus drei Wildtyp (GR^{+/+}) und drei mutanten Geschwistern (GR^{dim}) gewonnen. Die Zellen wurden gemäß dem 3T3-Protokoll weiterkultiviert (s. Material und Methoden; Brüsselbach et al., 1995; Todaro und Green, 1963). Der Genotyp der Zellen hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Wachstumsraten (Daten nicht gezeigt). Nach sieben bis zehn Passagen begann die Wachstumskrise, die nach der 15. bis 17. Passage zur spontanen Immortalisierung führte und ein konstantes Wachstum der Zelllinien nach sich zog.

Primäre MEF wurden für sechs Stunden mit jeweils 10^{-7} M TPA oder 10^{-7} M Dexamethason, sowie mit einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt. Die Expression der AP-1-Zielgene Kollagenase-3 und Gelatinase B (MMP-9, Gum et al., 1996) wurden durch Northern Blot-Analyse ermittelt (Abb. 26 A-C). In beiden Genotypen war der Kollagenase-3-mRNA-Spiegel nach der TPA Behandlung stark erhöht. Bei simultaner Applikation von Dexamethason wurde die Wirkung der TPA-Induktion in Wildtyp-Zellen auf etwa die Hälfte reduziert (Abb. 26 A, B). In MEF von GR^{dim}-Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der TPA-vermittelten Kollagenase-3-Induktion auf 65% (Abb. 26 A, B). Die Dexamethason

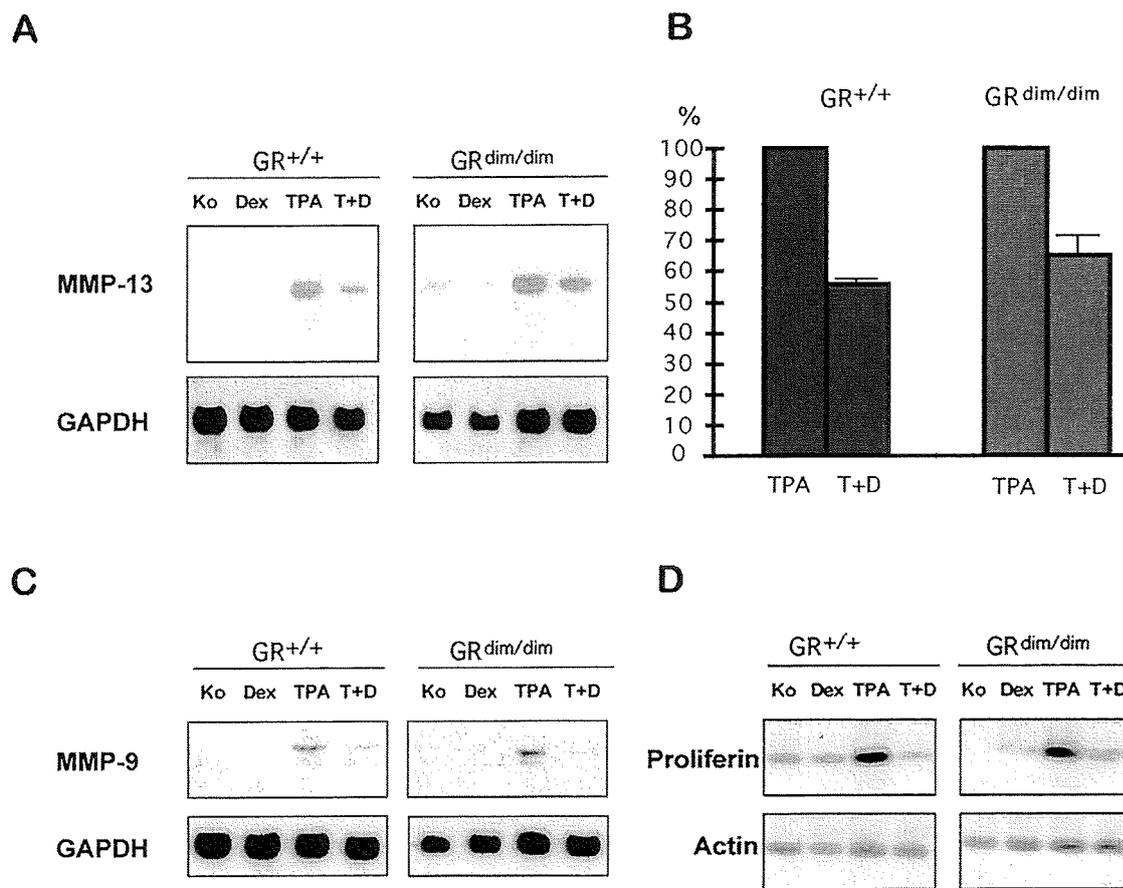


Abb. 26: In GR^{dim}-Fibroblasten wird die Induktion von AP-1-regulierten Genen in Gegenwart von Dexamethason gehemmt. **A:** Primäre WT- (GR^{+/+}) und GR^{dim} (GR^{dim/dim})-Fibroblasten wurden nicht (Ko), mit 10⁻⁷ M Dexamethason (Dex), 10⁻⁷ M TPA (TPA) oder beiden Substanzen simultan (T+D) behandelt. Nach 6 Stunden wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und die Mengen an Kollagenase-3 (MMP-13)- und GAPDH spezifischer mRNA durch Northern Blot-Analyse bestimmt. **B:** Quantifizierung der Repression der TPA-induzierten Kollagenase-3 Expression in Gegenwart von Dexamethason aus drei unabhängigen Experimenten, die wie in (A) durchgeführt wurden. Die relativen Expressionsniveaus nach TPA- bzw. TPA/Dex (T+D) Behandlung wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers ermittelt. **C:** WT- und GR^{dim}-Fibroblasten wurden wie in (A) beschrieben behandelt und Gesamt-RNA isoliert. Die MMP-9- und GAPDH- Expression wurde mittels Northern Blot-Analyse untersucht. **D:** Spontan immortalisierte WT- und GR^{dim}-Fibroblasten wurden mit TPA und Dexamethason 6 Stunden inkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und die Expression von Proliferin und β -Actin durch RT-PCR-Analyse bestimmt. Die amplifizierten Fragmente wurden nach Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nylonmembran mit spezifischen ³²P-markierten cDNA-Proben hybridisiert.

Behandlung alleine hatte keinen starken Einfluß auf die Kollagenase-Transkription. Die Transkription des Gelatinase B-Gens wurde ebenfalls durch TPA in MEF transkriptionell aktiviert (Abb. 26 C). Die Kostimulation mit TPA und Dexamethason führte bei diesem Gen zu einer vollständigen Repression der TPA-Induktion in Wildtyp- und in GR^{dim}-MEF.

Durch die Analyse der Kollagenase-3- und Gelatinase B-Expression von MEF konnte ich nachweisen, daß die induzierte Transkription von AP-1 Zielgenen durch den endogenen DNA-bindungsdefizienten GR (A458T) reprimiert wird.

Für einige Gene, die durch AP-1 reguliert werden, ist eine negative Interferenz durch den GR beschrieben worden, welche von der DNA-Bindung des Rezeptors abhängt. Ein Beispiel dafür ist das Proliferin-Gen, in dessen Promotorregion sich eine 25 bp Sequenz (plfG) befindet, die als kompositorisches Element bezeichnet wird, da diese AP-1 und den GR binden kann (Diamond et al., 1990; Mordacq und Linzer, 1989). Es wird angenommen, daß die gemeinsame Bindung beider Transkriptionsfaktoren für eine Hemmung der TPA vermittelten Expression in Fibroblasten in Gegenwart von Dexamethason verantwortlich ist (Miner und Yamamoto, 1992).

Um den Einfluß von Dexamethason auf die Stimulation des Proliferin-Gens durch TPA bei einem DNA-bindungsdefizienten GR zu untersuchen, wurden die Expression von Proliferin in MEF von GR^{dim}-Mäusen bestimmt. Da primäre Fibroblasten kein Proliferin exprimieren (Malyankar et al., 1994) wurden zur Aktivierung von AP-1 und des GR immortalisierte Wildtyp- und GR^{dim}-MEF mit TPA und Dexamethason behandelt. Die RT-PCR-Analyse zeigte in den TPA-behandelten Zellen eine Erhöhung der Proliferin-mRNA-Menge in Wildtyp- und GR^{dim}-Zellen (Abb. 26 D). Eine gleichzeitige Behandlung mit Dexamethason und TPA führte zu einer Repression der TPA-induzierten mRNA-Menge auf basale Werte sowohl in den Wildtyp- als auch in den GR^{dim}-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Experimente weisen darauf hin, daß die DNA-Bindungsfunktion des GR für die Repression des kompositorischen plfG-Elementes der Promotorregion des Proliferin-Gens nicht notwendig zu sein scheint.

Die obigen Resultate zeigen, daß die transreprimierende Funktion des GR in Bezug auf AP-1-abhängige Gene in der endogenen A458T-Mutation erhalten geblieben ist. Um nachzuweisen, ob die transaktivierende Eigenschaft des DNA-bindungsdefizienten GR-Moleküls in GR^{dim}-Zellen beeinträchtigt ist, wurden immortalisierte Wildtyp- und GR^{dim}-MEF mit Reporterplasmiden transfiziert und ihre transkriptionelle Aktivität im Chloramphenicoltransferase (CAT)-Assay nach Dexamethason Behandlung analysiert (vgl. Material und Methoden).

Die verwendeten Reporterplasmide enthielten jeweils verschiedene, Glucocorticoid-stimulierbare Promotorregionen, welche stromaufwärts des bakteriellen CAT-Reporter-Gens

eingefügt worden waren: zum einen das LTR des „mouse mammary tumor virus“ (MMTV) und zum anderen eine Fusion von zwei GRE mit dem 5'-Ende des minimalen Thymidin-Kinase-Promotors. Zur Kontrolle der unspezifischen, nicht GRE-abhängigen Dexamethason-Wirkung auf die Expression der transfizierten DNA in den Fibroblasten wurde ein Plasmid verwendet, welches unter der Kontrolle des RSV-Promotors steht (RSV-CAT). Die „CAT-Assays“ ergaben, daß die Behandlung von Wildtyp-Zellen mit Dexamethason eine Transaktivierung des MMTV-CAT-Reporterkonstruktes um das 71-fache und des 2xGRE-tk-CAT-Reporters um das 20-fache bewirkte. Dagegen wurden diese Konstrukte in den GR^{dim}-Zellen nur minimal aktiviert. Die Unterschiede in der Transaktivierung beruhten nicht auf unterschiedlichen GR-Molekül-Konzentrationen, da die Bestimmung des GR-Proteingehaltes mittels Westernblot-Analyse vergleichbare Mengen in Wildtyp- und in GR^{dim}-Zellen ergab (Daten nicht gezeigt).

Diese Resultate lassen darauf schließen, daß in MEF aus GR^{dim}-Mäusen Dexamethason nicht

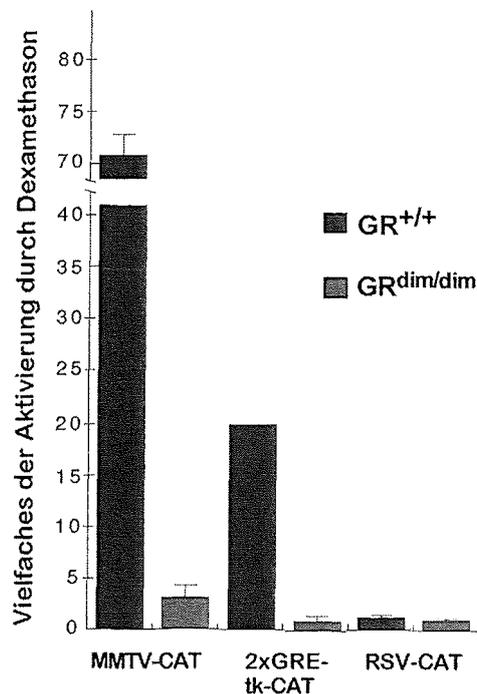


Abb. 27: GR^{dim}-Zellen sind nicht in der Lage GRE-regulierte Promotoren in Gegenwart von Dexamethason zu aktivieren. Je zwei Kulturschalen mit immortalisierten Wildtyp- (GR^{+/+}) und GR^{dim}- (GR^{dim/dim}) Fibroblasten wurden mit den Reporterplasmide MMTV-CAT, 2xGRE-tk-CAT oder RSV-CAT transient transfiziert. Zwölf Stunden nach der Transfektion wurde jeweils einer der beiden Kulturschalen Dexamethason in einer Endkonzentration von 10⁻⁷ M gegeben. Nach weiteren zwölf Stunden wurden Zellextrakte präpariert und die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt. Die Vielfache der Werte der CAT-Aktivität der Dexamethason- gegenüber den Kontroll-behandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten sind in der Graphik zusammengefaßt.

in der Lage ist, die Transaktivierung GRE regulierter Promotoren zu induzieren.

In Untersuchungen von MEF aus GR^{dim} -Mäusen konnte nachgewiesen werden, daß die Fähigkeit des GR, AP-1-vermittelte Transkription zu reprimieren, erhalten geblieben ist, wohingegen die Transaktivierungseigenschaften des GR bei diesen Mäusen nicht mehr nachzuweisen sind. Aufgrund dieser Gewebekulturdaten ist die GR^{dim} -Maus ein geeignetes Modell AP-1/GR Wechselwirkungen in Abwesenheit der Transaktivierung GRE regulierter Gene *in vivo* zu untersuchen.

4.3.2 Dexamethason reprimiert die MMP-Expression in der Haut von GR^{dim} -Mäusen

Für MEF, die von GR^{dim} -Mäusen etabliert worden waren, konnte nachgewiesen werden, daß die Repression von AP-1-vermittelter Transaktivierung durch Dexamethason unabhängig von

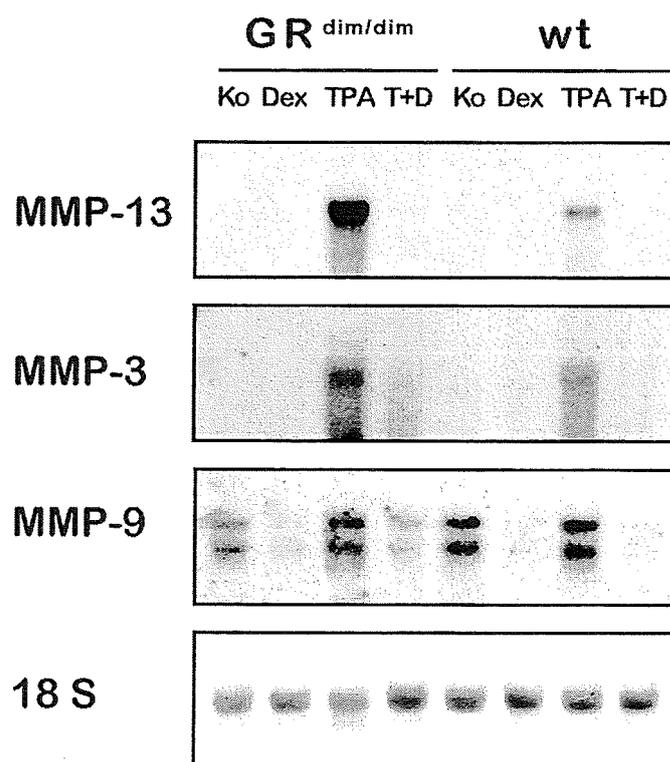


Abb. 28: In der Haut von GR^{dim} -Mäusen werden AP-1 regulierte Gene durch Dexamethason mit gleicher Effizienz wie in Wildtyp-Mäusen gehemmt. 5 Monate alte GR^{dim} ($GR^{dim/dim}$)- und Wildtyp (WT)-Mäuse wurden auf der rasierten Rückenhaut mit Aceton (Ko), 50 μ g Dexamethason (Dex), 10 nmol TPA oder mit beiden Substanzen kombiniert (T+D) behandelt (vgl. Abb. 23). Nach 6 Stunden wurden die Tiere getötet und Gesamt-RNA aus der Rückenhaut isoliert. Die Transkriptmengen für die Kollagenase-3 (MMP-13), Stromelysin-1 (MMP-3) und Gelatinase B (MMP-9) wurden mittels Northern Blot-Analyse bestimmt.

der fehlenden Transaktivierung GRE-gesteuerter Gene war (s. 4.3.1). Nun ließ sich in GR^{dim}-Mäusen die Frage klären, ob die Repression von AP-1-regulierten Genen auch im Organismus ohne die DNA-Bindungseigenschaft des GR stattfindet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß induzierte AP-1-abhängige Gene durch Dexamethason sowohl in der Calvaria als auch in der Haut vollständig gehemmt werden (s. Kap. 4.1.2.4 und 4.2.2). Da die Haut im Gegensatz zum Knochen größere Gewebemengen für die Expressionsanalysen bereitstellt und die Tiere ohne Anästhesie behandelt werden können, wurde die Transrepression von AP-1-abhängigen MMP durch Glucocorticoide in diesem Gewebe von GR^{dim}-Mäusen bestimmt (Abb. 28). Erwartungsgemäß zeigten die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen, die mit RNA aus der Haut von GR^{dim}-Mäusen und deren Wildtyp-Geschwistern durchgeführt wurden, eine starke Zunahme des Kollagenase-3- und Stromelysin-1-mRNA-Spiegels in TPA-behandelten Tieren nach sechs Stunden. Die simultane Applikation von TPA und Dexamethason führte zu einer Repression der TPA-induzierten mRNA-Mengen in beiden Genotypen. Die Transkriptionsrate des Gelatinase B-Gens wurde in der Haut im Gegensatz zu kultivierten Fibroblasten nicht wesentlich durch TPA beeinflusst. Jedoch wurde die basale Expression des Gelatinase B-Gens in Kontroll-behandelten Tieren durch Dexamethason alleine oder durch die simultane Applikation mit TPA auf ein nicht meßbares Niveau gesenkt. Diese Dexamethason-vermittelte Repression konnte sowohl in Wildtyp-Mäusen als auch in GR^{dim}-Mäusen nachgewiesen werden.

Diese Experimente deuten erstmalig darauf hin, daß *in vivo* die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsfunktion des GR für die Hemmung der Expression AP-1 regulierter Gene nicht benötigt wird.

4.3.3 Die positive Regulation von Glucocorticoid-abhängigen Genen ist in der Haut von GR^{dim}-Mäusen gestört

Die im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigten, daß *in vitro* und *in vivo* der endogen exprimierte DNA-bindungsdefiziente GR (A458T) in der Lage ist, AP-1-abhängige Gene zu reprimieren. Ferner konnte in GR^{dim}-Fibroblasten nachgewiesen werden, daß die transaktivierende Aktivität des mutierten GR-Moleküls fehlt. Um die Haut von GR^{dim}-Mäusen als Modell zu etablieren, welches es ermöglicht, zwischen Transkription-aktivierenden und Transkription-reprimierenden Eigenschaften von Glucocorticoiden zu unterscheiden, wurde die Expression von Glucocorticoid-positiv-regulierten Genen in der Haut von GR^{dim}-Mäusen untersucht.

4.3.3.1 Identifikation von GR-positiv-regulierten Genen in der Maushaut: „Screen“ von „Atlas cDNA Expression Arrays“

Um die Regulation von GR-DNA-bindungsabhängiger Genexpression zu untersuchen, mußten zunächst Glucocorticoid-induzierte Gene in der Haut identifiziert werden.

Zur Ermittlung solcher Gene wurde ein Expressionsprofil von Dexamethason-regulierten Genen in der Maushaut erstellt. Dazu wurde PolyA⁺-RNA aus Dexamethason- und Kontroll-behandelten Wildtyptieren isoliert und unter Anwesenheit von radioaktiv markierten

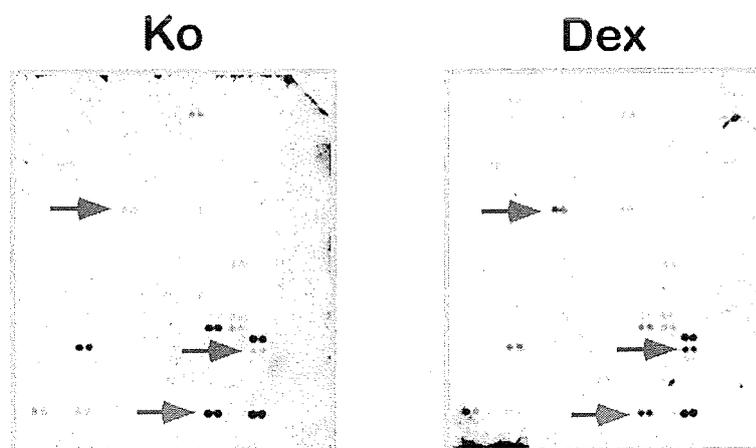


Abb. 29: Die Identifikation von Glucocorticoid-regulierten Genen in der Haut mit Hilfe der Hybridisierung von „Mouse Atlas™ cDNA Expression Array“-Filtern. Polyadenylierte [(poly(A⁺)]-RNA wurde aus der Haut von 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen isoliert, die mit Aceton (Ko) oder 50 µg Dexamethason (Dex) behandelt worden waren. Die poly(A⁺)-RNA-Präparationen dienten als Matritze für die Synthese von ³³P-radioaktiv markierten cDNAs, welche jeweils mit einem „Moose Atlas™ cDNA Expression Array“-Filter hybridisiert wurden. Dexamethason-induzierte Genexpressionen ergaben auf dem Filter mit der Probe aus Dexamethason-behandelter Haut intensivere Signale als auf dem Kontrollfilter (rote Pfeile). Die Verwendung gleicher cDNA-Mengen wurde durch die Hybridisierung mit DNA-Proben von Haushaltsgenen kontrolliert, die auf den Membranen aufgetragen waren (z.B. β-Actin, blauer Pfeil).

Nukleotiden revers transkribiert.

Diese cDNA-Sonden wurden jeweils mit einem „Atlas Mouse cDNA Expression Array™“ (Clontech, Palo Alto, USA) hybridisiert. Dabei handelt es sich um Membranen, auf denen cDNA-Fragmente von 588 Genen der Maus aufgetragen sind (s. Material und Methoden).

Die in der Autoradiographie erhaltenen Signale der mit Kontroll-cDNA hybridisierten Membran wurde mit denjenigen verglichen, die mit der Hybridisierung mit cDNA von Dexamethason behandelten Tieren gewonnen wurden (Abb. 29). Signalintensitäten, die bei der

Hybridisierung von Dexamethason behandelter Haut stärker auftraten, wurden als Dexamethason-induzierte Zunahme des mRNA Spiegels gewertet. (rote Pfeile in Abb. 29). Als Abgleich für die jeweiligen als Sonden eingesetzten cDNA-Mengen wurden die entsprechenden Signale der auf den Membranen aufgetragenen Haushaltsgene verwendet (blauer Pfeil zeigt in Abb. 29 auf Signale für β -Actin). Mit Hilfe dieser Analyse konnten in der Maushaut 29 Gene identifiziert werden, die nach sechs Stunden Dexamethason-Behandlung in der Maushaut signifikant erhöht waren (Abb. 29 und Daten nicht gezeigt).

4.3.3.2 Dexamethason induzierte Gene in der Haut werden unterschiedlich in GR^{dim} - und Wildtyp-Mäusen reguliert

Um die Abwesenheit der positiv-transkriptionellen Aktivität des GR in GR^{dim} -Mäusen zu überprüfen, wurde die Expression der Gene für HSP-27 und die Plasmaglutathionperoxidase-3 (PGX-3), die als Glucocorticoid-positiv-regulierte Gene im „Atlas-Array“ identifiziert werden konnten, in der Haut von Wildtyp- und GR^{dim} -Mäusen analysiert.

Die Northern Blot-Analyse ergab in der Haut von Wildtyp-Mäusen eine Stimulation des PGX-3-Gens um das ca. 2,5-fache und des HSP-27-Gens um das 1,5-fache durch die Behandlung von Dexamethason nach sechs Stunden. Dies bestätigte damit die in den „Atlas-

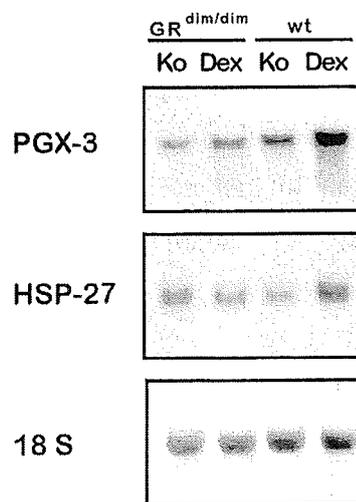


Abb. 30: Glucocorticoid abhängige Gene werden in der Haut von GR^{dim} -Mäusen nicht mehr durch Dexamethason induziert. Die Expression der Gene für die Plasmaglutathionperoxidase-3 (PGX-3) und HSP-27, die als Dexamethason-positiv regulierte Gene mit „cDNA Expression Array“-Filtern identifiziert worden waren (vgl. Abb. 29), wurden in der Haut von Wildtyp (wt)- und GR^{dim} ($GR^{dim/dim}$)-Mäusen untersucht. Nach der Behandlung mit Aceton oder mit 50 μ g Dexamethason wurde Gesamt-RNA aus der Haut beider Genotypen isoliert und die Mengen an spezifischer PGX-3-, HSP-27, und 18 S-RNA mittels Northern Blot-Analyse bestimmt.

Arrays“ nachgewiesene Induzierbarkeit dieser Gene durch Dexamethason (Abb. 30). Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen war in der Haut von GR^{dim}-Tieren keine Dexamethason-induzierte Stimulation von PGX-3 und HSP-27 nachweisbar (Abb. 30).

Durch die Expressionsanalysen in der Haut von GR^{dim}-Mäusen konnte erstmals beispielhaft belegt werden, daß AP-1 abhängige Gene durch Glucocorticoide reprimiert werden, während Glucocorticoid-positiv-regulierte Gene in GR^{dim}-Mäusen nicht aktiviert werden.

Mit dem Auftragen von Dexamethason und TPA auf die Rückenhaut von GR^{dim}-Mäusen lassen sich mechanistisch transaktivierende und transrepressive Effekten von Glucocorticoiden in komplexen Prozessen unterscheiden. Aufgrund dieser Analysen eignen sich die GR^{dim}-Mäuse zur Untersuchung der Bedeutung der DNA-bindungsunabhängigen, transrepressiven Eigenschaften des GR in der Glucocorticoid-vermittelten Hemmung von Entzündungsreaktionen und der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese in der Haut.

4.4 Antiinflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden in GR^{dim}-Mäusen

In der in Kap. 0 beschriebenen Charakterisierung der GR^{dim}-Mäuse konnte nachgewiesen werden, daß in diesen Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine transaktivierende Funktion des GR vorhanden ist. Jedoch ist in diesen Tieren die Repression der transkriptionellen Aktivität von AP-1 vollständig erhalten geblieben. Da Repression von AP-1-Aktivität durch den GR als ein möglicher Mechanismus der Glucocorticoid-vermittelten Hemmung der Entzündungsreaktion diskutiert wird, wurden GR^{dim}-Mäuse zur Untersuchung der Frage verwendet, ob die antiinflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden die Transaktivierung von Genen durch den GR benötigt, oder ob repressive Eigenschaften des GR Moleküls dafür ausreichend sind.

4.4.1 Subdermale Entzündung in der Haut wird durch Dexamethason inhibiert

Tumorpromotoren wirken als Entzündungs-induzierende Agenzien in der Haut (Scribner und Boutwell, 1972). Die Behandlung der Maushaut mit TPA führte zur Bildung von Gewebeödemen. In der histologischen Analyse von H.E.-gefärbten Gewebeschnitten ist die Infiltration von monozytären Zellen in das subdermale Fettgewebe zu erkennen, die einer Panniculitis ähnelt (Abb. 31 C, D). Die im histologischen Bild erkennbare Entzündungsreaktion war durch die gleichzeitige Applikation von Dexamethason umkehrbar (Abb. 31 E, F). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß in der Haut von GR^{dim}-Mäusen die

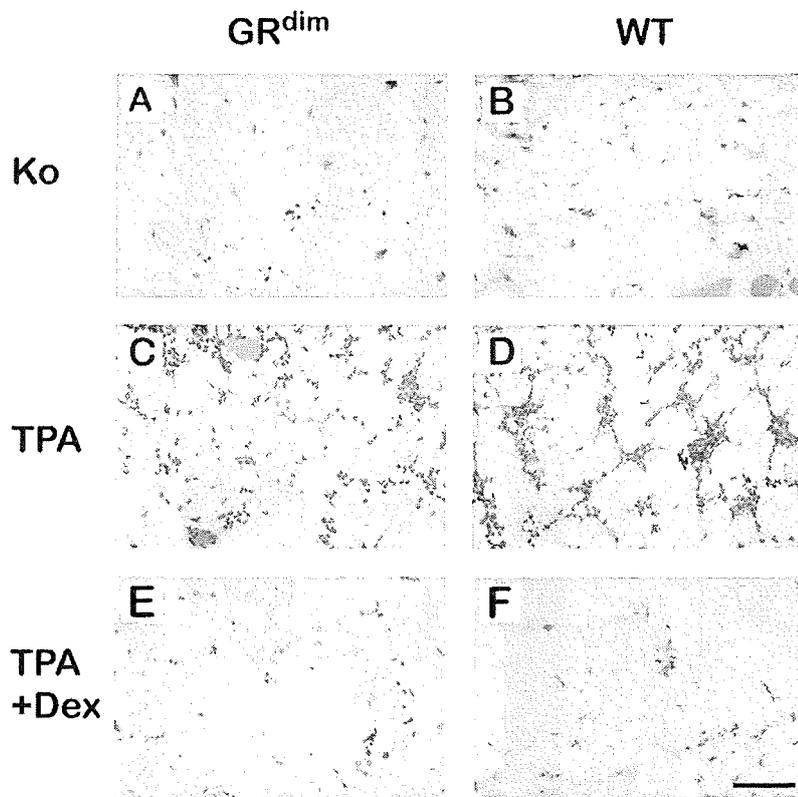


Abb. 31: Die TPA-induzierte subdermale Entzündung in der Haut (Panniculitis) ist durch Dexamethason in GR^{dim}-Mäusen hemmbar. Subdermales Fettgewebe (vgl. Aufbau der Haut in Abb. 18) in H.E.-gefärbten transversen Gewebeschnitten durch die Haut von Aceton- (Ko, A, B), 10 nmol TPA- (C, D) und simultan mit TPA und 50 µg Dexamethason (TPA+Dex, E, F) behandelten Mäusen nach 6 stündlicher Einwirkzeit. Maßstab 100 µm.

TPA-induzierte Panniculitis in Gegenwart von Dexamethason gehemmt werden konnte (Abb. 31 E).

Die Hemmung der subdermalen Entzündungsreaktion durch Dexamethason in GR^{dim}-Mäusen weist auf eine DNA-bindungsunabhängige Funktion des GR in diesem Prozeß hin.

4.4.2 Hemmung der Ohrödem Bildung in GR^{dim}-Mäusen durch Dexamethason

Um die Inhibierung der Entzündungsreaktion der Haut quantitativ zu erfassen und das antiinflammatorische Potential von Dexamethason in Wildtyp- und in GR^{dim}-Mäusen zu

untersuchen, wurde ein Ohrödem-Bildungstest durchgeführt (Abb. 32). Die Behandlung von Mausohren mit TPA führt zu einer Gewichtszunahme, die durch die Ödembildung verursacht wird (Gschwendt et al., 1984) und eignet sich dadurch als quantifizierendes Maß für die Summe der komplexen Vorgänge, die bei einer Entzündung stattfinden.

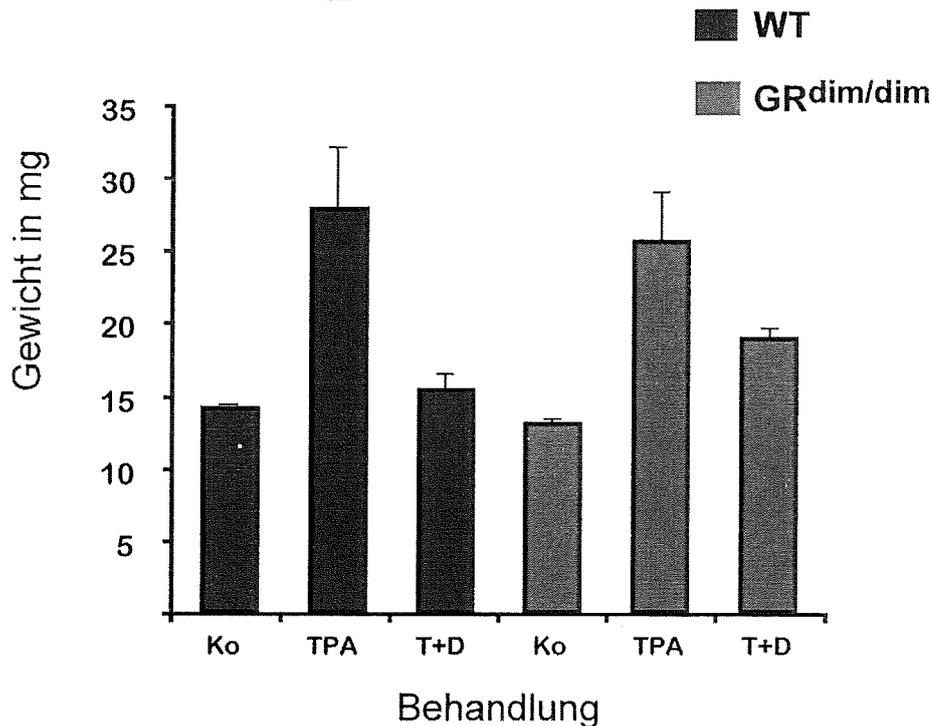


Abb. 32: In GR^{dim}-Mäusen wird die lokale Entzündungsreaktion der Haut in Form der Ödembildung durch die Gegenwart von Dexamethason inhibiert. Auf das Außenohr von Wildtyp- (WT) und GR^{dim} (GR^{dim/dim})-Mäusen wurde Aceton (Ko), 1 nmol TPA oder 1 nmol TPA in Kombination mit 5 µg Dexamethason (T+D) topisch auf das Außenohr aufgetragen. Nach 6 Stunden wurden die Mäuse getötet und das Gewicht von 50 mm² Außenohrfläche als Maß für die Ödembildung bestimmt. In der Graphik sind jeweils die Werte von drei Tieren pro Behandlungsgruppe zusammengefaßt.

In Wildtyp- und GR^{dim}-Mäusen bewirkte die Behandlung mit TPA eine Erhöhung des Gewichts eines genau definierten Areals des Ohres etwa um das Zweifache. Die simultane Behandlung mit Dexamethason reduzierte die TPA-bedingte Ödembildung um 44% bei Wildtyp-Mäusen und um 26% bei GR^{dim}-Mäusen (Abb. 32).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine Hemmung der lokalen Entzündungsreaktion durch Dexamethason unabhängig von der DNA-Bindungsfunktion des GR stattfindet.

4.4.3 Die systemische Entzündungsreaktion von topischer TPA-Behandlung wird durch Dexamethason in GR^{dim}-Mäusen unterdrückt

Die oberflächliche TPA-Behandlung auf der Haut ruft außer lokalen auch systemische Entzündungsreaktionen in der Maus hervor (Puignero et al., 1998). Die systemische Entzündungsreaktion wird durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren in das Kreislaufsystem definiert. Von den Entzündungsmediatoren ist IL-6 besonders gut charakterisiert. Entzündungsinduzierende Wirkstoffe, wie LPS oder das Freund'sche Adjuvans bewirken einen starken Anstieg von IL-6 im Plasma (Geisterfer et al., 1993).

Um die systemische antiinflammatorische Wirkung von Dexamethason in GR^{dim}-Mäusen zu untersuchen, wurde der IL-6-Protein-Gehalt im Plasma von topisch mit TPA und TPA/Dexamethason behandelten Mäusen gemessen (Abb. 33). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die topische Behandlung von TPA auf der Rückenhaut eine starke Erhöhung des IL-6-Niveaus in beiden Genotypen bewirkte. Die gleichzeitige topische Behandlung mit TPA und Dexamethason führte zu einer Repression des TPA-induzierten IL-6 Spiegels auf nicht

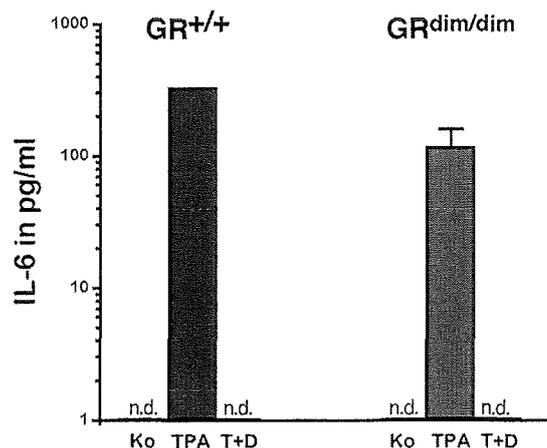


Abb. 33: IL-6-Titer im Plasma als systemische Reaktion auf die TPA-induzierte Entzündung in der Haut unterbleibt bei der Anwesenheit von Dexamethason. Von 6 Monate alten Wildtyp- (WT) und GR^{dim} (GR^{dim/dim})-Mäusen, deren Rückenhaut mit Aceton (Ko), TPA bzw. mit TPA und Dexamethason (T+D) behandelt worden war, wurde nach 6 stündlicher Einwirkzeit der IL-6-Gehalt im Plasma bestimmt. Die Graphik faßt die Werte von jeweils zwei Wildtyp-Tieren pro Behandlung und drei GR^{dim}-Tieren pro Behandlung zusammen.

nachweisbare Werte in Wildtyp- und GR^{dim}-Mäusen.

Mit diesen Untersuchungen konnte belegt werden, daß für die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden im Ohrödem-Modell und in der systemischen Entzündungsreaktion die Aktivierung von GRE regulierten Genen nicht notwendig ist. GR^{dim}-Mäuse wiesen sowohl in der lokalen, als auch in der systemischen Entzündungsreaktion ähnliche Glucocorticoid-vermittelte Wirkungen auf wie Wildtypmäuse. Damit konnte zum ersten Mal belegt werden, daß Protein-Protein-Wechselwirkungen des GR mit Transkriptionsfaktoren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, für die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden ausreichend sind.

5 Diskussion

Glucocorticoide (GC) üben ihre vielfältige Wirkung im Organismus auf molekularer Ebene durch die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors (GR) aus. Dabei führt die Bindung von Glucocorticoiden an den GR zur Veränderung von genetischen Programmen, die sich in physiologischen Reaktionen im Körper auswirken. Zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen sind für die Regulation der Genexpression durch den Ligand-aktivierten GR beschrieben worden. Zum einen führt die Bindung des dimeren GR-Moleküls an sequenzspezifische DNA-Elemente (GRE, nGRE), welche die Hormonantwort zur transkriptionellen Aktivierung oder Repression dieser Gene vermitteln. Der zweite Mechanismus beruht auf der DNA-bindungsunabhängigen Funktion des GR-Moleküls, der es dem monomeren GR-Molekül erlaubt, die transkriptionelle Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren und deren Zielgen-Aktivität zu beeinflussen. Der GR ist dabei in der Lage, die Funktion von Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (Heck et al., 1994; Jonat et al., 1990), NF κ B (Heck et al., 1997), CREB (Imai et al., 1993), GATA-1 (Chang et al., 1993) und STATs (Stocklin et al., 1996) zu modulieren.

Die bisher am besten charakterisierten Protein-Protein-Wechselwirkungen des GR sind die Interaktionen mit AP-1. Dabei hemmen sich AP-1 und der GR wechselseitig in ihrem Potential, Gene zu aktivieren (Reik et al., 1994; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese transreprimierende Funktion des GR auf die Transkription von AP-1 Zielgenen im Gesamtorganismus nachzuweisen.

Es ist mir gelungen erstmals die negative Interferenz der AP-1-vermittelten Transkription durch den GR im Knochenmetabolismus, in Mechanismen der Tumorpromotorwirkung in der Haut und in Entzündungsprozessen im Gesamtorganismus zu beweisen. Die AP-1/GR-Wechselwirkung ließ sich anhand der Transkriptmengen von AP-1 Zielgenen messen und war unabhängig von der DNA-Bindung des GR, bzw. der Expression GRE gesteuerter Gene.

5.1 Kollagenase-3, Stromelysin-1 und Gelatinase B benötigen AP-1 zur transkriptionellen Aktivierung

Als Monitor für die AP-1-Aktivität und für die AP-1/GR Wechselwirkungen wurde die Bestimmung der mRNA-Spiegel der Gene für Kollagenase-3 (MMP-13), Stromelysin-1 (MMP-3) und Gelatinase B (MMP-9) verwendet. Die Regulation der Transkription dieser Gene durch AP-1 ist in Gewebekultur intensiv untersucht worden (Angel und Karin, 1991).

Ihre transkriptionelle Aktivierung hängt sowohl von einer intakten AP-1-Bindestelle in den Promotoren ab (Angel et al., 1987b; Pendas et al., 1997; Porte et al., 1999; Sato et al., 1993; Uria et al., 1998), als auch von der Gegenwart einer ausreichenden Menge von AP-1-Proteinen.

So ist beispielsweise in *in vitro* kultivierten Zellen, die eine geringe Expression der AP-1 Untereinheiten c-Jun und c-Fos aufweisen – durch transiente Transfektionen von „antisense“-Konstrukten oder in *c-jun*- und *c-fos*-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEF) – die TPA-induzierte Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Transkription stark vermindert (Hu et al., 1994; Kerr et al., 1988; Kolbus et al., 1999; Schönthal et al., 1988; Schreiber et al., 1995).

In vivo spielt die AP-1-Komponente c-Fos eine entscheidende Rolle bei der Expression der interstitiellen Kollagenase. Konditionale Überexpression von *c-fos* in transgenen Tieren führt zu einer starken Induktion des Kollagenase-3 Gens in Knochengeweben (Gack et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, daß in *c-fos*-defizienten Mäusen die Kollagenase-3-Expression am Beginn der Osteogenese in der Embryonalentwicklung fehlt und in späteren Stadien stark reduziert ist. Die nicht vollkommen aufgehobene Expression der Kollagenase-3 in älteren c-Fos-defizienten Tieren weist auf eine mögliche Regulation dieses Gens durch andere Mitglieder der Fos-Familie hin, die partiell für die fehlende c-Fos Aktivität kompensieren könnten. Dagegen tritt keine Kompensation für c-Fos in chemisch induzierten Papillomen von c-Fos-Knock-Out-Mäusen auf, in denen die konstante Kollagenase-3-Expression stark vermindert gegenüber Papillomen von Wildtyp-Mäusen ist (Saez et al., 1995).

Diese Hinweise für die AP-1-abhängigen Transkription von MMP *in vitro* und *in vivo* aus der Literatur und aus vorliegenden Arbeit legitimieren die Bestimmung der Aktivität von AP-1 durch die Messung von Transkripten AP-1-abhängiger MMP.

5.2 Gewebespezifische AP-1 gesteuerte Expression der Kollagenase-3 im Knochenmetabolismus

Um die Wirkungsorte von AP-1/GR-Wechselwirkungen für die funktionelle Untersuchung im Organismus zu identifizieren, wurden die Zelltypen bestimmt, die das Kollagenase-3-Gen während der Embryogenese und im adulten Tier exprimieren. Übereinstimmend mit früheren Arbeiten von unserer und anderen Arbeitsgruppen konnte die Beschränkung der basalen Expression der Kollagenase-3 auf osteogene Gewebe nachgewiesen werden (Gack et al., 1995; Johansson et al., 1997b; Mattot et al., 1995; Stahle-Backdahl et al., 1997). Kollagenase-3-

mRNA befand sich dabei ausschließlich in Osteoblasten der flachen Schädelknochen und der Röhrenknochen sowie in terminal differenzierte hypertrophe Chondrozyten der epiphysären Wachstumszonen. Dabei wurde keine Überschneidung der Kollagenase-3-Expression mit den Expressionsmustern von Markergenen der osteoblastären und chondrozytären Differenzierung, wie dem *Itm2a*-Gen, dem Alkalischen Phosphatase-Gen (ALP) und des Osteocalcin Gens gefunden.

Vielmehr konnte im Rahmen dieser Arbeit eine serielle Abfolge von Differenzierungsstadien für die chondrozytäre Zelllinie ($Itm2a \Rightarrow ALP \Rightarrow Kollagenase-3$) und für die osteoblastäre Zelllinie ($ALP \Rightarrow Kollagenase-3 \Rightarrow Osteocalcin$) definiert werden, die sich jeweils durch die ausschließliche Expression dieser Markergene auszeichnen. Mit dieser neuen Identifikation von Subtypen hypertropher Chondrozyten und Osteoblasten wird die Analyse von pathologischen Defekten im Knochenwachstum erleichtert, die auf abnormaler osteoblastärer oder chondrozytischer Differenzierung beruhen wie beispielsweise die Chondrodysplasie (Nissenson, 1998). Interessanterweise repräsentieren die Kollagenase-exprimierenden Zelltypen in der Osteogenese auch die Zielzellen der Transformation durch c-Fos-Überexpression in transgenen Mäusen. Abhängig von der prä- oder postnatalen c-Fos-Überexpression entstehen Chondrosarkome bzw. Osteosarkome (Grigoriadis et al., 1993; Wang et al., 1991), die auf die Transformation von Chondrozyten oder Osteoblasten durch AP-1/c-Fos zurückgehen (Grigoriadis et al., 1995).

Die Kolokalisierung der Kollagenase-3-Expression mit derjenigen von anderen MMP (MT-1-MMP und Gelatinase B, s. Kap. 4.1.1.2) an der Übergangszone zwischen Knorpel und Knochen und die Präferenz dieses Enzyms, den Knorpel-spezifischen Kollagen Typ II zu degradieren (Knäuper et al., 1996a), läßt auf eine wesentliche Rolle dieses Enzyms in der Knorpeldegradation schließen, die eine Voraussetzung der Knochenneubildung ist. In der pathologischen Situation von Knochenneubildungen konnte die Kollagenase-3 Expression im Mausmodell der TGF β -induzierten Osteoarthritis (OA) assoziiert werden (s. Kap. 4.1.1.3). Dieses Modell spiegelt im Ausmaß der Knorpeldegradation und der Ausbildung von Osteophyten den Verlauf der humanen Osteoarthritis wider (van Beuningen et al., 1994). Die Kollagenase-3-Expression befand sich bei diesen Mäusen an Stellen der Knorpeldegradation wie den Ligamenten und korrelierte mit dem Fortschritt der Osteophytenentwicklung durch die vermehrte Anzahl Kollagenase-3 positiver hypertropher Chondrozyten. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen im humanen osteoarthritischen Knorpel und kultivierten humanen Chondrozyten überein (Mitchell et al., 1996; Reboul et al., 1996). Die einzelnen Faktoren, die

für die Überexpression der Kollagenase-3 und möglicher anderer MMP in der Osteoarthritis verantwortlich sind, sind noch weitgehend ungeklärt. Im gesunden Organismus könnten zirkulierende Glucocorticoide die Expression der interstitiellen Kollagenasen kontrollieren, zumal in Chondrozyten von osteoarthritischem Knorpel die Expression des GR gegenüber dem gesunden Knorpel vermindert ist (DiBattista et al., 1993). Dies könnte zu einer fehlenden Modulation der Kollagenase Expression durch den GR führen und so eine erhöhte Expression AP-1 abhängiger Gene bewirken.

5.3 Repression der PTH induzierten Kollagenase-3 Expression durch Glucocorticoide

Die Lokalisation der Kollagenase-3-mRNA läßt auf eine bedeutende Rolle dieses AP-1 Zielgens im Knochenmetabolismus sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im postnatalen Tier schließen. Weiterhin konnte in diesen Geweben hohe Mengen an GR-Protein nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde wurde der Einfluß von Glucocorticoiden auf die Kollagenase-3-Gen Expression als mögliche Konsequenz von AP-1/GR Wechselwirkungen im Knochengewebe untersucht.

Während der Embryonalentwicklung konnte kein Einfluß von Dexamethason auf die basale Expression des Kollagenase-3-Gens nachgewiesen werden (s. Kap. 4.1.2.1). Diese Befunde lassen gemeinsam mit den Ergebnissen aus Analysen der Kollagenase-3-mRNA-Expression in GR-defizienten Embryonen, in denen kein Unterschied im Vergleich zu WT-Geschwistern gemessen wurde (Tuckermann, 1995), auf eine fehlende gegenseitige Beeinflussung von AP-1 und dem GR während der frühen Osteogenese schließen. Ein ungleiches stöchiometrisches Verhältnis von AP-1 Untereinheiten und der GR-Molekül-Menge könnte dafür die Ursache sein.

Hohe Konzentrationen von c-Jun-Molekülen im Retina-Gewebe des Huhns hemmen in frühen Stadien der Embryogenese die transkriptionelle Aktivität des GR, der dort nur gering exprimiert ist. Im Verlauf der Embryogenese nimmt die c-Jun-Konzentration bei gleichbleibender GR Menge ab und erlaubt schließlich die Expression von GR-Zielgenen (Berko-Flint et al., 1994). Ob in der Maus ein Überangebot von AP-1 Molekülen gegenüber GR-Protein während der von mir untersuchten Stadien der Mausembryogenese vorherrscht und damit keine Interferenz von AP-1 durch den GR zuläßt, ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchung.

Im adulten Organismus konnte jedoch erstmalig demonstriert werden, daß die Kollagenase-3-Transkription durch das knochenresorbierende Hormon PTH im Gesamtorganismus aktiviert wird und Dexamethason mit diesem Prozeß negativ interferiert.

Die Applikation mit PTH induzierte die Transkription des Kollagenase-Gens sowohl in kultivierten Osteoblasten als auch im Tier, in Osteoblasten der Schädeldecke und im Röhrenknochen. In der Calvaria wurde in älteren Tieren eine stärkere Induktion gemessen als in jüngeren Tieren. Möglicherweise ist in wachsenden Knochen jüngerer Tiere die Kollagenase-mRNA in einem Höchstmaß durch endogene Faktoren z.B. PTH induziert, so daß exogen appliziertes PTH keine meßbare Erhöhung der Kollagenase-3-mRNA-Menge mehr hervorrufen kann. Die PTH-induzierte Kollagenase-Expression in der Calvaria fand ausschließlich in Osteoblasten und nicht in Osteocyten oder Osteoclasten statt. Für die Induzierbarkeit der Transkription des Kollagenase-3-Gens durch PTH ist die Aktivität der Transkriptionsfaktoren c-Fos und Cbfa-1 unabdingbar, wie Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen (Porte et al., 1999) und aus der vorliegenden Arbeit belegen. Erstens ist in Embryonen von Knock-Out-Tieren, denen entweder c-Fos oder Cbfa-1 fehlt, die Kollagenase-Expression reduziert bzw. vollkommen eliminiert. In den Wachstumszonen der Röhrenknochen von Cbfa-1^{-/-}-Embryonen des Stadiums 18.5 dpc konnte keine Kollagenase-3 Expression nachgewiesen werden (Abb. 10). Obwohl Cbfa-1 defiziente Mäuse keine Osteoblasten besitzen (Ducy et al., 1997; Otto et al., 1997), die permissiv für die Kollagenase Expression sind, waren in den Wachstumszonen hypertrophe Chondrozyten differenziert, die in der Lage sind, den Mineralisationsprozeß einzuleiten und daher Kollagenase-3-exprimierenden Zellen in Wildtyp-Mäusen entsprechen (Komori et al., 1997). Zweitens werden c-Fos und Cbfa-1 in Wildtyp-Embryonen in osteogenen Geweben exprimiert: In den Wachstumszonen konnte mRNA von Cbfa-1 (Daten nicht gezeigt) und von c-Fos mittels ISH lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt und Dony und Gruss, 1987). Zum dritten konnte in Gewebekultur von Osteosarkomzellen gezeigt werden, daß nach PTH Behandlung AP-1/c-Fos und Cbfa-1 synergistisch das Kollagenase-Gen durch kooperative Besetzung ihrer jeweiligen Bindestellen im Promotor aktivieren (Porte et al., 1999; Selvamurugan et al., 1998).

Die negative Interferenz der PTH/AP-1-vermittelten transkriptionellen Aktivierung des Kollagenase-3-Gens durch Dexamethason konnte in Osteoblasten in Kultur, sowie *in vivo*, in Osteoblasten der Calvaria demonstriert werden. Die angewandten kurzen Inkubationszeiten, die bei dem Calvaria-Experiment verwendeten wurden, waren mit denen der Zellkultur-Experimente vergleichbar und lassen daher auf direkte transkriptionelle Effekte schließen.

Interessanterweise führte eine systemische länger andauernde Applikation über 20 Stunden zu einer kaum meßbaren Reduktion der PTH-Induktion in Gegenwart von Dexamethason. Vielmehr wurde hier – im Gegensatz zu den vorher verwendeten Applikationssystemen – durch die Behandlung von Dexamethason alleine ein positiver Effekt auf die Kollagenase-3 Expression erzielt. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Problematik der Analyse von Genexpressionen, die durch die Wirkung von zwei hormonelle Substanzen reguliert werden, die sich selbst gegenseitig auch in übergeordneten regulatorischen Einheiten des Gesamtorganismus wechselseitig beeinflussen wie im Fall der Glucocorticoide und des PTH. Ein Überangebot von Glucocorticoiden bewirkt einen starken Anstieg des endogenen PTH-Spiegels. Dieser sekundäre Hyperparathyroidismus wird als eine der wichtigsten Ursachen für die verstärkte Knochenresorption in der Glucocorticoid-induzierten Osteoporose (GIO) angesehen. Denn in Tieren, denen die Nebenschilddrüse (Parathyroidea) operativ entfernt wurde, konnte die verstärkte durch Glucocorticoid-induzierte Resorption verhindert werden (Lukert, 1996). Die endogene PTH-Freisetzung könnte den induktiven Effekt von Dexamethason nach 16 bis 24 Stunden auf den Kollagenase-3-mRNA-Konzentration im Röhrenknochen bewirken. In Osteoblasten-Gewebekultursystemen der Ratte wird nach Zeiträumen von mehr als 24 Stunden eine Steigerung der Kollagenase-3 Expression beschrieben, die auf posttranskriptionelle Mechanismen zurückzuführen ist (Delany et al., 1995). Allerdings ist eine erhöhte Kollagenase-3-Expression im Knochen für eine Steigerung der Resorption vermutlich nicht ausreichend, da die hohen Kollagenase-3-mRNA-Spiegel in *c-src*-defizienten Mäusen nicht genügen, um die Ausbildung von osteopetrotischen Knochen zu verhindern (Tuckermann, 1995). Zu der verstärkten Netto-Knochenresorption in der GIO tragen eine Vielzahl von Glucocorticoid-induzierten Effekten bei. Dazu gehört sowohl die Hemmung des Knochenaufbaus durch Inhibition der osteoblastären Proliferation und der Kollagen I Expression als auch die Sensibilisierung dieser Zellen gegenüber PTH, sowie einer effizienten Rekrutierung von Osteoclasten, die sich in einer vergrößerten Zahl an Resorptionsstellen, sogenannten „resorption-pits“, bemerkbar macht (Lukert, 1996).

Die PTH-induzierte Expression des Kollagenase-3-Gens wird in Osteoblasten durch Glucocorticoide innerhalb kurzer Zeiträume (bis ca. 8 Stunden) gehemmt. Dies läßt auf AP-1/GR-Wechselwirkungen in Osteoblasten im Knochenmetabolismus schließen. Die lang andauernde Einwirkung von Glucocorticoiden bewirkte eine positive Regulation des Kollagenase-3-Gens in Röhrenknochen. Inwieweit die PTH und Glucocorticoid-regulierte Kollagenase-3-Expression zu den Effekten der GIO beiträgt, bedarf weiterer Untersuchung an osteoporotische Tiermodellen, die in den letzten Jahren in genetisch veränderten Mäusen

etabliert werden konnten (Erlebacher und Derynck, 1996; Kuro-o et al., 1997; Lewis et al., 1993; Takahashi et al., 1996).

5.4 In der Haut aktiviert der PKC-Aktivator TPA AP-1-Zielgene Zelltyp-spezifisch

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten Wechselwirkungen zwischen AP-1 und dem GR in der Haut dem Zielgewebe der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese erstmalig nachgewiesen werden. Dabei wurde durch die Applikation des Tumorpromotors TPA die Induktion der Expression der AP-1-Zielgene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 erzielt. Die mRNA-Menge stieg bei beiden Genen von nicht meßbaren Transkriptmengen in den unbehandelten Tieren zu einem hohen Niveau bei Phorbol ester behandelten Tieren. Dies geschah innerhalb eines Zeitraumes, der mit der Induktion der interstitiellen Kollagenase in Gewebekultur vergleichbar ist (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b). Die TPA-induzierte Expression der *c-jun*- und *c-fos*-Gene fand zeitlich vor der Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Expression statt und bestätigt die bedeutende Funktion der *de novo* Synthese von c-Jun und c-Fos, die für die vollständige Aktivierung von AP-1-abhängigen Genen benötigt wird. Dieser Befund stimmt mit früheren Untersuchungen von Phorbol ester behandelte Haut überein (Angel und Karin, 1991; Kennard et al., 1995).

Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und die daran anschließende transkriptionelle Induktion von AP-1-abhängigen Genen ist nicht auf Phorbol ester beschränkt, sondern konnte auch durch das makrozyklische Lacton Bryostatin-1 erfolgen. Obwohl Bryostatin-1 PKC ähnlich effizient wie TPA aktiviert, induziert es rascher die Ubiquitinylierung von PKC-Isoformen und damit deren Deaktivierung (Szallasi et al., 1994). Aufgrund dessen zeigt Bryostatin-1 ein eingeschränkteres Wirkungsspektrum als Phorbol ester. Unterschiedliche Prozesse, die durch TPA hervorgerufen werden, wie die Differenzierung von HL-60 Zellen (Kraft et al., 1986) die Induktion von Entzündungsreaktionen (Gschwendt et al., 1988), die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten (Sako et al., 1987) sowie die Tumorpromotion (Gschwendt et al., 1988; Hennings et al., 1987; Kraft et al., 1986; Sako et al., 1987), können durch die schnelle Inaktivierung der PKC durch Bryostatin sogar gehemmt werden. Dennoch ist selbst die kurzzeitige Aktivierung von PKC-Isoformen durch Bryostatin ausreichend, um in kleinen Dosen die Erhöhung von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in der Haut zu ermöglichen, die jedoch nicht das Ausmaß der TPA-Induktion erreicht.

Unabhängig von der Aktivierungskinetik führt eine generelle Aktivierung der PKC in der Haut zur Induktion AP-1 abhängiger Gene. Welche der 12 PKC-Isoformen für die Aktivierung von AP-1 und anschließender Zielgenexpression *in vivo* verantwortlich sind, ist noch ungeklärt. Ergebnisse aus Experimenten mit immortalisierten Keratinozyten, die mit TPA und spezifischen PKC-Inhibitoren behandelt worden sind, weisen darauf hin, daß die klassische PKC α nicht an der TPA vermittelten Induktion der Transkription des Kollagenase-Gens beteiligt ist. Dagegen scheinen die nPKC-Isoformen δ , ϵ und η eine entscheidende Rolle zu spielen (K. H. Richter und J. Tuckermann, unveröffentlichte Daten). Diese Analysen stimmen mit Ergebnissen aus Experimenten überein, in denen transiente Überexpression von PKC-Isoformen nur im Falle der PKC δ , PKC ϵ und η zu einer Aktivierung des menschlichen Kollagenase-Promotors führten (Reifel-Miller et al., 1996). Inwiefern diese Isoformen *in vivo* zur Aktivierung von AP-1-vermittelter Transkription führen bzw. für die Expression von MMP verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt.

Im Gegensatz zu der gemeinsamen Induktion von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in kultivierten Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und anderen Zelllinien durch TPA (Chin et al., 1985; Herron et al., 1986; Moscatelli et al., 1980; Petersen et al., 1987; Wilhelm et al., 1987), waren die Expressionsmuster beider Gene in TPA-behandelter Haut nicht überlappend und jeweils auf bestimmte Zelltypen beschränkt.

Die Expression der Kollagenase-3 in basalen Keratinozyten (s. Kap. 4.2.1.3) ähnelt dem Expressionsmuster, das in Wundheilungsprozessen beschrieben ist. In Wundheilungsmodellen der Ratte (Okada et al., 1997) und der Maus (Madlener et al., 1998) wurde die Kollagenase-3 in basalen Keratinozyten an der Spitze des wandernden Epithels exprimiert, welches das Wundbett schließt. Im Gegensatz zur Kollagenase-3-Expression wurde die Transkription des Stromelysin-1-Gens durch TPA nach 6 Stunden hauptsächlich in monozytischen Zellen der Dermis induziert. Obwohl andere Autoren Stromelysin-1-mRNA in fraktionierten Keratinozyten von TPA-behandelter Mausepidermis beschrieben haben (Krieg et al., 1988), konnte mittels *in situ* Hybridisierung keine Stromelysin-1-Expression in der Epidermis nachgewiesen werden. In Untersuchungen der Wundheilung wurden in einigen Zellen der Dermis Stromelysin-1 Transkripte gefunden. Der Hauptanteil der Stromelysin-1 Expression in diesem System befand sich jedoch nach 24 Stunden in proliferierenden basalen Keratinozyten (Okada et al., 1997). Möglicherweise wird die Stromelysin-1-mRNA in Keratinozyten verzögert induziert, so daß sie in den ersten sechs Stunden in der ISH-Analyse TPA-behandelter Haut nicht sichtbar wird, jedoch nach 24 Stunden in diesen Zellen akkumuliert.

Erstaunlicherweise wurde *in vivo* weder Kollagenase-3, noch Stromelysin-1 in dermalen Fibroblasten durch TPA stimuliert. In Gewebekultur sind dermale Fibroblasten in vielen experimentellen Ansätzen dazu verwendet worden, die TPA-induzierte AP-1-Aktivierung und die daraus resultierende transkriptionelle Aktivierung der interstitiellen Kollagenase und des Stromelysin-1 Gens zu demonstrieren (Clark et al., 1985; Wilhelm et al., 1987).

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß sich dermale Fibroblasten in der Gewebekultur in einem Zustand befinden, der die TPA-Induktion der Stromelysin-1 und Kollagenase-3 Gene zuläßt, während in der Dermis eine andere Mikroumgebung, bestehend aus Wachstumsfaktoren und Komponenten der ECM, die die Induktion dieser Gene durch TPA verhindert. Bisher ist unklar, welche molekularen Mechanismen die Zelltyp-spezifische Restriktion der TPA-Induktion des Kollagenase-3 und des Stromelysin-1-Gens in der Haut beeinflussen. Die mRNA-Expression von Cbfa-1, dem Transkriptionsfaktor, der für die Gewebe- und Zelltyp-spezifische transkriptionelle Aktivierung des Kollagenase-3-Gens im Knochen verantwortlich ist, konnte durch ISH-Analysen in der Haut nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Für eine Reihe von Genen wie das Osteopontin-, Metallothionein- und Urokinase-Gen, deren Transkription nach einer singulären TPA-Behandlung in der Maushaut zeitlich nach der Induktion der sogenannten „early response genes“, wie *c-jun* und *c-fos*, stimuliert wird, konnte eine konstante Überexpression in TPA-promovierten Papillomen und Karzinomen nachgewiesen werden (Hashimoto et al., 1990). Aufgrund dieses Expressionsverhaltens, wurde für diese Gene eine direkte oder indirekte Beteiligung an der Promotion und Progression von Tumoren vermutet. Es zeigte sich, daß die TPA-stimulierten Gene Kollagenase-3 und Stromelysin-1 ebenfalls in Karzinomen, die im chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese-Prozeß durch TPA-vermittelte Tumorpromotion erzeugt worden waren, stark exprimiert wurden (s. Kap. 4.2.1.4). Dabei wurde die zelluläre Expression des Kollagenase-3-Gens zum ersten Mal in Plattenepithelkarzinomen demonstriert. Die Stromelysin-1 Expression konnte übereinstimmend mit der Arbeit anderer Autoren in diesem Gewebe nachgewiesen werden (Matrisian et al., 1986; Ostrowski et al., 1988). In humanen Plattenepithelkarzinomen der Haut wurden ebenfalls hohe Werte von Kollagenase-3- und Stromelysin-1-mRNA nachgewiesen, wobei die Kollagenase-3-Expression weitgehend in Epithelzellen maligner Tumore präsent war (Airola et al., 1997). Ob die hohe Expression individueller MMP für die Tumordinvasion und anschließende Metastasierung ausreichend ist und diese als Markergene für aggressive Stadien der Kanzerogenese gelten können, ist nicht

eindeutig beantwortet. In verschiedenen Systemen zur Analyse metastatischer Phänotypen von Zellen und Tumoren wurde in Plattenepithelkarzinomen die Überexpression von Kollagenase-3 und Stromelysin-1 mit der Invasivität assoziiert (Cazorla et al., 1998; Johansson et al., 1997a; Matrisian et al., 1986), während in Brustkrebszelllinien nur das AP-1-unabhängig regulierte Gelatinase A-Gen an dem metastatischen Potential beteiligt war (Cockett et al., 1998). Dagegen konnte die Analyse der Kollagenase-3-Expression in Osteosarkomen von Mäusen nicht mit dem Potential zur Metastasierung korreliert werden (Tuckermann, 1995). Dennoch hat die postulierte generelle Beteiligung von MMP an metastatischen Eigenschaften von Tumorzellen zur Einführung synthetischer Hemmer der enzymatischen Aktivität für die Behandlung von Krebserkrankungen geführt, die zur Zeit in der klinischen Erprobung sind (Yu et al., 1997).

5.5 Die Transrepression von AP-1 durch Glucocorticoide benötigt keine DNA-Bindung des GR

Die Aktivierung AP-1-abhängiger Gene durch TPA in der Maushaut stellt ein elegantes System zur Untersuchung von AP-1/GR-Wechselwirkungen *in vivo* dar. Denn sowohl die Aktivierung von AP-1 durch Phorbol ester, als auch diejenige des GR durch Dexamethason läuft in kurzen Zeiträumen ab und läßt daher die Erfassung von direkten transkriptionellen Effekten zu, die keinen sekundären Einflüssen unterliegen. Im Gegensatz zur PTH/Dexamethason-Behandlung in den Calvaria von Mäusen kann in der mit TPA/Dexamethason behandelten Haut neben der Expression des Kollagenase-3-Gens die Transkription weiterer AP-1-abhängiger Gene wie Stromelysin-1 und Gelatinase B untersucht werden. Die Applikation von Dexamethason auf die Maushaut führte zu einer vollständigen Repression der TPA-induzierten Expression der Gene für Kollagenase-3 und Stromelysin-1. Mit der TPA- und Dexamethason-Behandlung von GR^{dim}-Mäusen, die aufgrund einer Punktmutation in der Dimerisierungsdomäne (A458T) einen dimerisierungsdefekten GR besitzen, konnten Prozesse ausgeschlossen werden, die auf der DNA Bindungsfunktion des GR beruhen. *In vitro* Protein/DNA-Bindungsstudien mit Leberextrakten von GR^{dim}-Mäusen zeigten, daß der mutante Rezeptor nicht mehr in der Lage war, GRE-Sequenzen zu binden (Reichardt et al., 1998). Die Wildtyp-ähnlichen transrepressiven Eigenschaften des GR in GR^{dim}-Mäusen und das Fehlen der Fähigkeit, GRE-enthaltende Promotoren zu aktivieren, wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* und *in vivo* demonstriert.

Die Analyse von GR^{dim}- und Wildtyp-MEF ergab, daß die TPA-induzierte Kollagenase-3 und Gelatinase B-Transkription in Gegenwart von Dexamethason in beiden Genotypen nahezu

gleich gehemmt wurde (s. Kap. 4.3.1). Im Gegensatz dazu war die Eigenschaft des GR zur Transaktivierung GRE gesteuerter Promotoren, z.B. das LTR des MMTV in den GR^{dim}-Zellen, bis auf eine kleine Restaktivität vermindert. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Resultaten aus transienten Transfektionsexperimenten, in denen die Überexpression des dimerisierungsdefekten GR (A458T) zur Repression der menschlichen Kollagenase-Promotoraktivität führt und keine Transaktivierung von GRE Promotoren aufweist (Heck et al., 1994). Unerwartet war jedoch die Genotyp-unabhängige Repression der TPA-Induzierbarkeit des Proliferin-Gens durch Glucocorticoide. Denn für die hemmende Wirkung ist die Bindung des GR an das kompositorische Element (pflG) im Proliferinpromotor als Voraussetzung beschrieben worden (Diamond et al., 1990; Mordacq und Linzer, 1989). Die Reduktion der Proliferin-Gen-Transkription bei gleichzeitiger Behandlung mit TPA und Glucocorticoiden in GR^{dim}-MEF weist jedoch darauf hin, daß Protein-Protein-Wechselwirkungen für die Repression dieses Gens ausreichend sind. Ob die Bindung des GR an den Promotor die Erniedrigung der Proliferin-Expression verstärkt, könnte mit Promotorstudien, z.B. mittels transients Transfektion von Proliferin Promotor-Reporter-Genkonstrukten in GR^{dim}-Zellen geklärt werden.

Wie in den isolierten Fibroblasten ist auch im GR^{dim}-Tier die Transaktivierung von Glucocorticoid-stimulierten Genen gestört. Die Induktion des Tyrosinaminotransferase (TAT) Gens in der Leber durch systemische Applikation von Dexamethason findet in GR^{dim}-Mäusen nicht statt (Reichardt et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Glucocorticoid-abhängige Gene in der Haut identifiziert werden. Dies geschah durch Hybridisierung von „Atlas-Micro-ArrayTM“-cDNA-Membranen mit radioaktivmarkierter cDNA, die aus der RNA von Glucocorticoid-behandelter Haut synthetisiert wurde. Zwei bisher getestete Beispiele, die Gene für die Plasmaglutathionperoxidase-3 (PGX-3) und HSP-27, wurden in Wildtyp-Mäusen durch Dexamethason in ähnlichem Ausmaß wie das TAT Gen induziert, während in GR^{dim}-Mäusen keine Erhöhung der entsprechenden mRNAs stattfand. Die PGX-3-Expression wurde hauptsächlich in der Niere und im Blutplasma nachgewiesen (Maser et al., 1994; Takahashi und Cohen, 1986), während in der Haut bisher keine Expression dieses Gens beschrieben worden war. Dagegen ergaben immunhistochemische Untersuchungen, daß das HSP-27-Protein in der Basal- und Suprabasalschicht der Haut vorhanden ist (Laplante et al., 1998). Beide Gene werden in der vorliegenden Arbeit zum erstenmal als Glucocorticoid-abhängige Gene beschrieben. Mit der Identifikation von Glucocorticoid-abhängigen Genen in der Haut werden Möglichkeiten eröffnet, den molekularen Ursachen der Nebenwirkungen von Glucocorticoiden auf den Grund zu gehen. Diese Nebenwirkungen äußern sich unter anderem

in der Atrophie der Haut, wie sie bei der langfristigen Glucocorticoid-Behandlung von chronischen Entzündungen wie Psoriasis auftreten (Neumann et al., 1996).

In Abwesenheit der DNA-Bindung des GR in der Haut von GR^{dim}-Mäusen wird die durch Phorbolster bewirkte Induktion der MMP Kollagenase-3 und Stromelysin-1 und die basale Expression der Gelatinase B durch Dexamethason effizient inhibiert (s. Kap. 4.3.2). Alle drei Gene zeichnen sich durch AP-1- und PEA3/ets-Bindestellen in ihren Promotoren aus, die in Zelllinien für die koordinierte Induktion durch Phorbolster verantwortlich gemacht werden (Gum et al., 1996; Pendas et al., 1997; White et al., 1997). Im Gegensatz zu TPA-behandelten MEF fehlte die Induktion des Gelatinase-B Gens in der TPA-behandelten Haut. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, daß im dieses Gen normalen physiologischen Zustand bereits maximal induziert ist. Die Behandlung mit Dexamethason vermag jedoch die basale Transkriptionsrate des Gelatinase B-Gens negativ zu beeinflussen. In der Haut von GR^{dim}-Mäusen läuft die Repression dieser MMP genauso effizient ab wie in Wildtyp-Tieren. Daraus folgt, daß *in vivo* die DNA-bindende Eigenschaft des GR und die anschließende Aktivierung GRE-regulierter Gene nicht notwendig ist für die Transrepression AP-1-gesteuerter Gene.

5.6 Glucocorticoide entfalten ihre entzündungshemmende Wirkung ohne DNA-Bindung des GR

Seit die Transrepression von AP-1 durch den GR in Gewebekultur nachgewiesen werden konnte (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990), wurde vermutet, daß dieser Mechanismus eine der Grundlagen für die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden darstellen könnte (Jonat et al., 1990). Die bisher offene Frage, ob die Beteiligung von GRE-regulierten Genen an dem entzündungshemmenden Prozeß durch Glucocorticoide essentiell ist, konnte in dieser Arbeit beantwortet werden. In der Haut von GR^{dim}-Mäusen, in der keine Glucocorticoid-positiv regulierte Gene exprimiert werden, wirkte die Applikation von Glucocorticoiden hemmend auf Entzündungsreaktionen, die durch Phorbolster ausgelöst wurden. Die Entwicklung der Panniculitis durch topische Behandlung von TPA wurde in sowohl in Wildtyp- als auch GR^{dim}-Mäusen nachhaltig unterdrückt. Quantitativ konnte dies mit der Ohrödembildung nachgewiesen werden, in dem GR^{dim}-Mäuse eine signifikante Erniedrigung der Ödembildung in Anwesenheit von Dexamethason aufwiesen. Die Hemmung der TPA-induzierten Entzündungsreaktion bedarf demnach nicht der DNA-Bindung des GR.

Die leicht verringerte Effizienz der Hemmung von Ohrödemen in GR^{dim}-Mäusen, könnte Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Glucocorticoid-positiv regulierten Genprodukten an der entzündungshemmenden Wirkung von Glucocorticoiden geben. So könnte beispielsweise das Glucocorticoid-regulierte Gen PGX-3 zu einer Verminderung von radikalen Sauerstoffintermediaten führen, die an Entzündungsprozessen assoziiert sind und damit zur Unterdrückung der Entzündungsreaktion beitragen (Chapple, 1997). Dennoch wird auch in Abwesenheit der Expression solcher GRE-regulierter Gene die lokale Entzündungsreaktion in der Haut stark gehemmt. Auch die systemische Reaktion auf Entzündungsprozesse in der Haut, gemessen an dem Spiegel des Zytokins IL-6 im Plasma, wurde in Wildtyp- und in GR^{dim}-Mäusen gleichermaßen effizient durch Glucocorticoide gehemmt. Die Inhibierung der Sekretion zumindest dieses Zytokins durch Glucocorticoide benötigt keine Transaktivierung GRE-gesteuerter Gene. Ob die anderen an der Entzündungsreaktion beteiligten Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und proteolytischen Enzyme in der GR^{dim}-Maus durch Glucocorticoid-Applikation gehemmt werden und somit zum Gesamtbild der DNA-bindungsunabhängigen Entzündungshemmung beitragen, muß noch in den einzelnen Fällen untersucht werden. Die Klärung dieses Wirkungszusammenhangs ist von größtem klinischen Interesse (Karin, 1998). Für die Unterdrückung der Expression von Entzündungsmediatoren auf der transkriptionellen Ebene sind neben der Transrepression des Transkriptionsfaktors AP-1 auch die Wechselwirkungen des GR mit anderen an der Entzündungsreaktion beteiligten Transkriptionsfaktoren notwendig. Unklar ist bisher noch, inwieweit das GR (A458T) Molekül mit NFκB und anderen Transkriptionsfaktoren wie Mitgliedern der STAT-Familie und NFATs zu interagieren und deren Funktion zu modulieren vermag. Erste Aufschlüsse darüber könnten durch transiente Transfektionsexperimente in GR^{dim}-MEF gewonnen werden.

Insbesondere der Nukleäre Faktor κB (NFκB) ist ein bedeutender Regulator der Expression von entzündungsassoziierten Genen und wird in seiner Aktivität durch Glucocorticoide gehemmt (Baldwin, 1996). Für die Hemmung werden zwei Mechanismen postuliert (Göttlicher et al., 1998): Der erste umfaßt die Inaktivierung der transkriptionellen Aktivität durch Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen NFκB und dem GR an Promotoren NFκB-regulierter Gene (Ray und Prefontaine, 1994). Der zweite Mechanismus beinhaltet die transkriptionelle Aktivierung von IκB-Genen durch Glucocorticoide (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995), deren vermehrte Expression zu einer Akkumulation von inaktiven NFκB-IκB-Komplexen im Cytosol führt (Baeuerle und Baltimore, 1988; Baldwin, 1996). Nach neueren Untersuchungen scheint die Protein-Protein-Interaktion von NFκB und GR für

die Repression von NF κ B gesteuerten Promotoren eine wesentlichere Rolle als die transkriptionelle Aktivierung von I κ B-Genen zu spielen. Überexpressionen von cDNA, in der dimerisierungsdefekte GR-Moleküle kodiert sind, ergaben in Gewebekultur, daß diese GR-Moleküle immer noch in der Lage sind NF κ B-Aktivierung zu hemmen, obwohl die Fähigkeit, I κ B durch Glucocorticoide zu aktivieren fehlte (Heck et al., 1997). In GR^{dim}-Mäusen scheint ebenfalls die Induktion des I κ B α -Gens durch Glucocorticoide nicht mehr vorhanden zu sein. In aktivierten primären Thymozyten von GR^{dim}-Mäusen sind Glucocorticoide nicht in der Lage, I κ B α mRNA Konzentrationen zu erhöhen (Reichardt, persönliche Mitteilung). Vorläufige Untersuchungen der I κ B α -Expression in der Haut lassen darauf schließen, daß während der Glucocorticoid-vermittelten Entzündungshemmung die Transkription des I κ B α -Gens durch Glucocorticoide in GR^{dim}- und in Wildtyp-Mäusen unterschiedlich reguliert wird. Während in Wildtyp-Mäusen Dexamethason und TPA zu einer Stimulation des I κ B α -Gens führen, wird in GR^{dim} Mäusen die TPA-vermittelte Induktion durch die Anwesenheit von Dexamethason gehemmt (Daten nicht gezeigt). Die Glucocorticoid-induzierte I κ B α -Expression scheint daher für die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden vermutlich eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

5.7 Antitumorogene Wirkungen von Glucocorticoiden

Die Tumorpromotion im Modell der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese gleicht in vielen physiologischen Erscheinungsbildern den Entzündungsprozessen, die bei der Wundheilung ablaufen. (Fürstenberger et al., 1993). Daher ist postuliert worden, daß ein Großteil der antitumorogenen Wirkungen der Glucocorticoide auf Mechanismen beruhen, die der Entzündungshemmung zu Grunde liegen (Viaje et al., 1977) wie die Hemmung der Ausschüttung von Zytokinen und der Rekrutierung inflammatorischer Zellen. Aufgrund der Untersuchungen der Glucocorticoid-vermittelten Entzündungshemmung in den GR^{dim}-Mäusen ist die DNA-Bindung des GR für diese Wirkung entbehrlich.

Neben der antiinflammatorischen Wirkung und der Hemmung der Proliferation (Florin-Christensen et al., 1992; Marcelo und Tomich, 1983) als Komponenten antitumorogener Eigenschaften von Glucocorticoiden, ist die Unterdrückung der AP-1-vermittelten Transformation von Zellen durch den GR beschrieben worden. Die Infektion von embryonalen Hühner-Fibroblasten mit Retroviren, in denen Wildtyp- und mutante GR-Moleküle kodiert sind, die keine GRE gesteuerten Promotoren transaktivieren können, führte in allen Fällen zu

einer starken Hemmung der Transformation. Die Transformation wurde dabei durch die Überexpression von *v-src*, *c-Ha-ras*, *c-fos* und *c-jun* induziert (Kameda und Iba, 1998).

Wie zahlreiche Experimente zeigen, besteht Grund zur Annahme, daß bei der Transformation von Zellen durch die Überexpression bestimmter Onkogene (*v-src*, *ras*, *v-rel*, Polyoma middle T) die Aktivität von zellulären AP-1 Untereinheiten benötigt wird, während dagegen die gleichzeitige Überexpression dieser Onkogene mit dominant negativ wirkendem *fos* und *jun* diesen Prozeß hemmt (Brown et al., 1993; Dong et al., 1994; Johnson et al., 1996; Kralova et al., 1998; Lloyd et al., 1991; Suzuki et al., 1994). Da die AP-1-abhängige Genexpression auch in GR^{dim}-Mäusen durch Glucocorticoide gehemmt wird, könnte die transformationshemmende Wirkung des GR *in vivo* ohne die DNA-Bindung auskommen.

Zusätzlich zu den entzündungshemmenden Wirkungen und der generellen Repression AP-1-vermittelter Transkription könnte auch die Hemmung der Expression von MMP zur antitumorigenen Wirkung von Glucocorticoiden beitragen. Es gibt mehrere Hinweise, daß in der Frühphase der Tumorentstehung die Expression von AP-1-abhängigen MMP benötigt wird. So führt die Überexpression der menschlichen Kollagenase (MMP-1) in der Suprabasalschicht der Epidermis in transgenen Mäusen zu einer Verkürzung der Latenzzeit bis zum ersten Auftreten von Papillomen sowie zur Erhöhung der Frequenz der Tumorbildungshäufigkeit während der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese (D'Armiento et al., 1995). Die gezielte Überexpression des Stromelysin-1-Gens im Mammagewebe von Mäusen bewirkt eine lokale Hyperplasie und Dysplasie, die zur Entwicklung von duktalem Karzinomen und invasiven und metastatischen Adenokarzinomen führt (Lochter et al., 1998). Die Funktion der MMP in der frühen Phase der Tumorentstehung ist noch weitgehend ungeklärt. Eventuell unterstützen MMP die neoplastische Konversion von Zellen durch die proteolytische Modifikation von latenten Wachstumsfaktoren und Zellkontaktmolekülen, die jeweils das Wachstum und die Zellmobilität erhöhen (Lochter et al., 1997). Die mögliche direkte Beteiligung der MMP an der Tumorentstehung läßt darauf schließen, daß die durch TPA bewirkte transiente Expression der MMP Stromelysin-1 und Kollagenase-3 zu frühen Ereignissen in der chemisch induzierten Mehrstufen-Karzinogenese führt. In der Tat war die für die Tumorpromotion verwendete Dosis von TPA diejenige, die am besten Kollagenase-3 und Stromelysin-1 in der Epidermis transkriptionell induziert. Die Hemmung der Kollagenase-3- und Stromelysin-1-Expression durch Glucocorticoide könnte daher als direkter antitumorigener Effekt von Glucocorticoide postuliert werden.

Glucocorticoide hemmen die Tumorentstehung vermutlich auf drei Ebenen. Die erste Ebene umfaßt die Hemmung entzündungsähnlicher Reaktionen, die zweite die Unterdrückung der transformatorischen Aktivität von AP-1 und die dritte - mit der zweiten Ebene vermutlich unmittelbar im Zusammenhang stehend - beinhaltet die direkte Repression AP-1-abhängiger MMP. Für jeden dieser Prozesse konnten Protein-Protein-Wechselwirkungen des GR mit AP-1 oder anderen Transkriptionsfaktoren in Gewebekultur und im Rahmen dieser Promotionsarbeit erstmals *in vivo* nachgewiesen werden. Um die Frage zu beantworten, ob DNA-Bindung des GR für die Hemmung der Tumorigenese durch Glucocorticoide überhaupt benötigt wird, sind chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese-Experimenten mit GR^{dim}-Mäusen durchzuführen.

5.8 Die Dissoziation der transaktivierenden und trans-repressiven Funktion des GR: Neue Möglichkeiten zur Reduktion von Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Glucocorticoid-Analoga

Bei der Behandlung von chronischen Entzündungskrankheiten, Asthma oder septischem Schock mit Glucocorticoid-Präparaten treten im Allgemeinen starke Nebenwirkungen auf. So kommt es besonders bei Langzeit-Anwendungen zur Insuffizienz der „HPA“-Achse, zu Glucocorticoid induzierter Osteoporose (GIO), Diabetis und steroider Myopathie sowie zu neuropsychiatrischen Komplikationen.

Ohne ausreichende Kenntnis des Wirkungsmechanismus des GR können diese Nebenwirkungen nicht auf ein erträgliches Maß reduziert werden. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die einzelnen Nebenwirkungen auf der DNA-Bindung oder auf Proteinwechselwirkungen des GR beruhen. Die in der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführten Charakterisierung von GR-DNA-bindungsunabhängigen Eigenschaften des GR bezüglich Glucocorticoid-vermittelter Hemmung von Entzündungsreaktionen und der Tumorigenese in den GR^{dim}-Mäusen, liefert einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung selektiver GR-Agonisten in der therapeutischen Anwendung. Erste synthetische GR-Agonisten sind in Zellkulturexperimenten als dissoziierende GR-Liganden identifiziert worden, die in Gewebekultur die Transrepression von AP-1-abhängiger Expression induzieren, ohne die Transaktivierung von GRE-gesteuerten Genen zu ermöglichen (Vayssiere et al., 1997). Ob der Einsatz solcher Agonisten die Nebenwirkungen reduziert, hängt von der Beteiligung der Expression von Genen ab, die durch GR-DNA-Bindung reguliert werden. Mit

Hilfe der Analyse der Nebenwirkungen von Glucocorticoiden in GR^{dim}-Mäusen kann der Anteil von GR-DNA-bindungsunabhängigen Prozessen analysiert werden.

5.9 Ausblick: Negative Regulation durch Glucocorticoide und c-Fos als Partner in der GR vermittelten Transrepression *in vivo*

Die Analyse von GR^{dim}-Mäusen beweist, daß die Transrepression von Genen eine biologisch wesentliche Funktion des GR ist. Fehlt die Transrepressionsfunktion zusammen mit der DNA-Bindungsfunktion wie bei den völlig GR-defizienten (GR^{null})-Mäusen werden Phänotypen hervorgebracht, die in diesen Mäusen unter anderem zur perinatalen Lethalität führen (Cole et al., 1995). In GR^{dim}-Mäusen jedoch erscheinen diese Prozesse „normal“ wie in Wildtyptieren abzulaufen (Tab. 2). Daraus läßt sich schließen, daß solche Prozesse allein von der transrepressiven Eigenschaft des GR abhängen, die in GR^{null}-Mäusen gestört, in GR^{dim}-Mäusen jedoch noch vorhanden sind. Einige wenige Prozesse wie die Expression von Leberenzymen und von Komponenten der „HPA“-Achse sind in GR^{null}-Mäusen und in GR^{dim}-Mäusen beeinträchtigt. Diese Defekte lassen sich auf die fehlende transaktivierende Funktion des GR zurückführen, die in beiden Genotypen fehlt.

Da c-Fos von den AP-1-Mitgliedern als der am besten geeignete Partner des GR in der Transrepression von AP-1-gesteuerter Expression angesehen wurde (Kerppola et al., 1993), lag am Ende dieser Dissertation mein besonderes Interesse darin zu ergründen, in welchem Ausmaß c-Fos an der Gesamtheit von GR modulierter Genexpression beteiligt ist. Dieses Ziel sollte mit der Kreuzung von der GR^{dim}-Maus-Linie mit c-Fos-defizienten Mäusen erreicht werden. In allen Prozessen, in denen c-Fos ein wesentlicher Bestandteil der GR-Transrepression ist und die in GR^{dim}-Mäusen wie in Wildtyp Mäusen erscheinen, sollte sich beim Fehlen dieses Transkriptionsfaktors in der Doppelmutante GR^{dim}/Fos^{-/-} ein Phänotyp entwickeln, der dem der GR^{null}-Mäuse ähnlich ist (vgl. Tab. 2). Die vorläufige Analyse der Genotypen von erhaltenen Nachkommen der GR^{dim}/Fos^{-/-}-Kreuzung (Tab. 3 A) ergab, daß bei 150 analysierten drei Wochen alten Tieren keine GR^{dim/dim}/Fos^{-/-} Mäuse identifiziert werden konnten, obwohl alle anderen möglichen Genotypen in der erwarteten Häufigkeit auftraten. Im Gegensatz dazu konnten bei der Isolation von 18.5 dpc Embryonen aus einer Kreuzung von GR^{dim/dim}/Fos^{+/-} Elterntieren zweifach homozygote Tiere (GR^{dim/dim}/Fos^{-/-}) für beide Gen-Loci gefunden werden (Tab. 3 B). Diese erste Analyse deutet auf eine perinatale bis frühpostnatale Lethalität hin. Tiere mit homozygoten GR^{null} Genotyp sterben während der Geburt (Cole et al., 1995).

	GR ^{Null/Null}	GR ^{dim/dim}	
Lunge	Actelectasie	normal	
HPA Achse			
CRF	hochreguliert	normal	
POMC a.l.	hochreguliert	hochreguliert	
ACTH Freisetzung	hochreguliert	normal	
PRL	hochreguliert	hochreguliert	
Nebennieren kortex	vergrößert	normal	
Nebennierenmark	gestörter Aufbau	normal	
T-Zellen Apoptose	beeinträchtigt	beeinträchtigt normale CD4/8 Vert.	
Leberenzyme	reduziert	reduziert	
Erythropoese	n.d.	Langzeit Prolifer. reduziert	

Tab.2: Phänotypen von GR-Null und GR^{dim}-Mäusen. Sämtliche Prozesse, die in den GR^{dim}-Mäusen dem Wildtyp-Phänotyp gleichen, sind in der dritten Spalte als „normal“ bezeichnet. Die Interpretation der Genregulation durch den GR, die dem Phänotyp zugrunde liegen könnte, ist symbolisch dargestellt:  entspricht der Protein-Protein Interaktion des GR- oder des GR^{dim}-Moleküls mit einem weiteren Transkriptionsfaktor;  entspricht DNA Bindung des GR.

A

GR ^{+/+} Fos ^{+/+}	GR ^{+/dim} Fos ^{+/+}	GR ^{dim/dim} Fos ^{+/+}	GR ^{+/+} Fos ^{+/-}	GR ^{+/dim} Fos ^{+/-}	GR ^{dim/dim} Fos ^{+/-}	GR ^{+/+} Fos ^{-/-}	GR ^{+/dim} Fos ^{-/-}	GR ^{dim/dim} Fos ^{-/-}	# Mäuse
13	19	5	21	49	16	9	18	0	150
9,4	18,8	9,4	18,8	37,5	18,8	9,4	18,8	9,4	erwartet aus 150

B

GR ^{dim/dim} Fos ^{+/+}	GR ^{dim/dim} Fos ^{+/-}	GR ^{dim/dim} Fos ^{-/-}	# 18.5 dpc
8	19	7	34
8,5	17	8,5	erwartet aus 34

Tab. 3: Analyse der Genotypen der Nachkommen aus der GR^{dim}/Fos^{-/-}-Kreuzung. **A:** Darstellung der Genotypen der Nachkommen aus einer zweifachen Heterozygoten Kreuzung von GR^{+/dim}/Fos^{+/-}-Elterntieren. In der ersten Zeile ist die Anzahl der tatsächlich auftretenden Genotypen aus einer Analyse von 150 Mäusen dargestellt. In der zweiten Zeile ist die erwartete Anzahl zu sehen, wenn eine Mendel'sche Verteilung der GR- und Fos-Allele zugrunde gelegt wird. **B:** Analyse der Genotypen aus Kaiserschnitten von Embryonen zum Stadium 18.5 dpc aus einer Kreuzung im homozygoten GR^{dim/dim}-Hintergrund. In der ersten Zeile befinden sich die tatsächliche Anzahl pro Genotyp, in der zweiten Zeile die nach den Mendel'schen Gesetzen erwartete.

Das gleichzeitige Ausschalten von c-Fos und der DNA-Bindungsfunktion des GR (GR^{dim}) beeinträchtigt lebensnotwendige Vorgänge. Mit diesem Versuchsansatz werden zum ersten Mal Hinweise darauf gegeben, daß die Wechselwirkungen zwischen c-Fos und dem Glucocorticoidrezeptor nicht nur bei der therapeutischen Anwendung von Glucocorticoiden stattfinden, sondern auch für überlebensnotwendige, entwicklungsbiologische und physiologische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen.

6 Literatur

- Aarnisalo, P., J.J. Palvimo, und O.A. Janne. 1998. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2122-2127.
- Abbott, B.D., F.M. McNabb, und C. Lau. 1994. Glucocorticoid receptor expression during the development of the embryonic mouse secondary palate. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 14:87-96.
- Airola, K., N. Johansson, A.L. Kariniemi, V.M. Kahari, und U.K. Saarialho-Kere. 1997. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest Dermatol.* 109:225-231.
- Althoff, J., P. Quint, E.R. Krefting, und H.J. Hohling. 1982. Morphological studies on the epiphyseal growth plate combined with biochemical and X-ray microprobe analyses. *Histochemistry.* 74:541-552.
- Angel, P., E.A. Allegretto, S.T. Okino, K. Hattori, W.J. Boyle, T. Hunter, und M. Karin. 1988a. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature.* 332:166-171.
- Angel, P., I. Baumann, B. Stein, H. Delius, H.J. Rahmsdorf, und P. Herrlich. 1987a. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol.* 7:2256-2266.
- Angel, P., K. Hattori, T. Smeal, und M. Karin. 1988b. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell.* 55:875-885.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R.J. Imbra, H.J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, und M. Karin. 1987b. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 49:729-739.
- Angel, P., und M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1072:129-157.
- Auphan, N., J.A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg, und M. Karin. 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 270:286-290.

- Baeuerle, P.A., und D. Baltimore. 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. 242:540-546.
- Bailly, S., M. Fay, N. Israel, und M.A. Gougerot-Pocidallo. 1996. The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *Eur Cytokine Netw*. 7:125-128.
- Baldwin, A.S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 14:649-683.
- Basuyaux, J.P., E. Ferreira, D. Stehelin, und G. Buttice. 1997. The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and - independent manner. *J Biol Chem*. 272:26188-26195.
- Baxter, J.D., und G.G. Rouseau. 1979. Glucocorticoid Hormone Action. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Beato, M., P. Herrlich, und G. Schütz. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 83:851-857.
- Belman, S., und W. Troll. 1972. The inhibition of croton oil-promoted mouse skin tumorigenesis by steroid hormones. *Cancer Res*. 32:450-454.
- Berko-Flint, Y., G. Levkowitz, und L. Vardimon. 1994. Involvement of c-Jun in the control of glucocorticoid receptor transcriptional activity during development of chicken retinal tissue. *Embo J*. 13:646-654.
- Birkedal-Hansen, H., W.G. Moore, M.K. Bodden, L.J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, und J.A. Engler. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 4:197-250.
- Boyer, J.L., J.R. Hepler, und T.K. Harden. 1989. Hormone and growth factor receptor-mediated regulation of phospholipase C activity. *Trends Pharmacol Sci*. 10:360-364.
- Brinckerhoff, C.E., I.M. Plucinska, L.A. Sheldon, und G.T. O'Connor. 1986. Half-life of synovial cell collagenase mRNA is modulated by phorbol myristate acetate but not by all-trans-retinoic acid or dexamethasone. *Biochemistry*. 25:6378-6384.
- Brown, K., M. Quintanilla, M. Ramsden, I.B. Kerr, S. Young, und A. Balmain. 1986. v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell*. 46:447-456.

- Brown, P.H., R. Alani, L.H. Preis, E. Szabo, und M.J. Birrer. 1993. Suppression of oncogene-induced transformation by a deletion mutant of c-jun. *Oncogene*. 8:877-886.
- Brüsselbach, S., U. Mohle-Steinlein, Z.Q. Wang, M. Schreiber, F.C. Lucibello, R. Muller, und E.F. Wagner. 1995. Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene*. 10:79-86.
- Buttice, G., und M. Kurkinen. 1993. A polyomavirus enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *J Biol Chem*. 268:7196-7204.
- Caelles, C., J.M. Gonzalez-Sancho, und A. Munoz. 1997. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev*. 11:3351-3364.
- Canalis, E. 1998. Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth. Is local insulin-like growth factor I to blame? *Endocrinology*. 139:3041-3042.
- Cato, A.C., P. Skroch, J. Weinmann, P. Butkeraitis, und H. Ponta. 1988. DNA sequences outside the receptor-binding sites differently modulate the responsiveness of the mouse mammary tumour virus promoter to various steroid hormones. *Embo J*. 7:1403-1410.
- Cazorla, M., L. Hernandez, A. Nadal, M. Balbin, J.M. Lopez, F. Vizoso, P.L. Fernandez, K. Iwata, A. Cardesa, C. Lopez-Otin, und E. Campo. 1998. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol*. 186:144-150.
- Celeste, A.J., V. Rosen, J.L. Buecker, R. Kriz, E.A. Wang, und J.M. Wozney. 1986. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *Embo J*. 5:1885-1890.
- Chang, T.J., B.M. Scher, S. Waxman, und W. Scher. 1993. Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Mol Endocrinol*. 7:528-542.
- Chapple, I.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 24:287-296.
- Chedid, M., B.K. Yoza, J.W. Brooks, und S.B. Mizel. 1991. Activation of AP-1 by IL-1 and phorbol esters in T cells. Role of protein kinase A and protein phosphatases. *J Immunol*. 147:867-873.

- Chin, J.R., G. Murphy, und Z. Werb. 1985. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J Biol Chem.* 260:12367-12376.
- Chomczynski, P., und N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Clark, S.D., S.M. Wilhelm, G.P. Stricklin, und H.G. Welgus. 1985. Coregulation of collagenase and collagenase inhibitor production by phorbol myristate acetate in human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 241:36-44.
- Clohisy, J.C., D.K. Scott, K.D. Brakenhoff, C.O. Quinn, und N.C. Partridge. 1992. Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.* 6:1834-1842.
- Cockett, M.I., G. Murphy, M.L. Birch, J.P. O'Connell, T. Crabbe, A.T. Millican, I.R. Hart, und A.J. Docherty. 1998. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp.* 63:295-313.
- Cole, T.J., J.A. Blendy, A.P. Monaghan, K. Kriegelstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker, und G. Schütz. 1995. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9:1608-1621.
- Creamer, P., und M.C. Hochberg. 1997. Osteoarthritis. *Lancet.* 350:503-508.
- Cupps, T.R., und A.S. Fauci. 1982. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev.* 65:133-155.
- D'Armiento, J., T. DiColandrea, S.S. Dalal, Y. Okada, M.T. Huang, A.H. Conney, und K. Chada. 1995. Collagenase expression in transgenic mouse skin causes hyperkeratosis and acanthosis and increases susceptibility to tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 15:5732-5739.
- Dahlman-Wright, K., A. Wright, J.A. Gustafsson, und J. Carlstedt-Duke. 1991. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem.* 266:3107-3112.

- Delany, A.M., J.J. Jeffrey, S. Rydziel, und E. Canalis. 1995. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* 270:26607-26612.
- Deleersnijder, W., G. Hong, R. Cortvrindt, C. Poirier, P. Tylzanowski, K. Pittois, E. Van Marck, und J. Merregaert. 1996. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins. *J Biol Chem.* 271:19475-19482.
- Diamond, M.I., J.N. Miner, S.K. Yoshinaga, und K.R. Yamamoto. 1990. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science.* 249:1266-1272.
- DiBattista, J.A., J. Martel-Pelletier, T. Antakly, G. Tardif, J.M. Cloutier, und J.P. Pelletier. 1993. Reduced expression of glucocorticoid receptor levels in human osteoarthritic chondrocytes. Role in the suppression of metalloprotease synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 76:1128-1134.
- Dong, Z., M.J. Birrer, R.G. Watts, L.M. Matrisian, und N.H. Colburn. 1994. Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:609-613.
- Dony, C., und P. Gruss. 1987. Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature.* 328:711-714.
- Drouin, J., Y.L. Sun, M. Chamberland, Y. Gauthier, A. De Lean, M. Nemer, und T.J. Schmidt. 1993. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *Embo J.* 12:145-156.
- Ducy, P., C. Desbois, B. Boyce, G. Pinero, B. Story, C. Dunstan, E. Smith, J. Bonadio, S. Goldstein, C. Gundberg, A. Bradley, und G. Karsenty. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 382:448-452.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall, und G. Karsenty. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89:747-754.
- Erlebacher, A., und R. Derynck. 1996. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol.* 132:195-210.

- Fawell, S.E., J.A. Lees, R. White, und M.G. Parker. 1990. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell*. 60:953-962.
- Feinberg, A.P., und B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 132:6-13.
- Florin-Christensen, M., C. Missero, G.P. Dotto, und J. Florin-Christensen. 1992. The Ela gene prevents inhibition of keratinocyte proliferation by dexamethasone. *Exp Cell Res*. 203:285-288.
- Fort, P., L. Marty, M. Piechaczyk, S. el Sabrouly, C. Dani, P. Jeanteur, und J.M. Blanchard. 1985. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res*. 13:1431-1442.
- Fraser, F.C., und T.D. Fainstat. 1951. Production of congenital defects in the offspring of pregnant mice treated with cortisone. *Pediatrics*. 8:527-533.
- Freedman, L.P. 1992. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev*. 13:129-145.
- Freije, J.M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L.M., Blasco, R., Tolivia, J., und C. Lopez-Otin. 1994. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*. 269: 16766-16773.
- Fürstenberger, G., P. Krieg, R. Schnapke, S. Feil, und F. Marks. 1993. The role of endogenous factors in skin carcinogenesis. *Recent Results Cancer Res*. 128:323-337.
- Gack, S., R. Vallon, J. Schaper, U. Rütger, und P. Angel. 1994. Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. Regulation of mouse metalloproteinases by carcinogens, tumor promoters, cAMP, and Fos oncoprotein. *J Biol Chem*. 269:10363-10369.
- Gack, S., R. Vallon, J. Schmidt, A. Grigoriadis, J. Tuckermann, J. Schenkel, H. Weiher, E.F. Wagner, und P. Angel. 1995. Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ*. 6:759-767.

- Geisterfer, M., C. Richards, M. Baumann, G. Fey, D. Gywnne, und J. Gauldie. 1993. Regulation of IL-6 and the hepatic IL-6 receptor in acute inflammation in vivo. *Cytokine*. 5:1-7.
- Gille, H., M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M.H. Cobb, und P.E. Shaw. 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *Embo J*. 14:951-962.
- Glass, C.K., S.M. Lipkin, O.V. Devary, und M.G. Rosenfeld. 1989. Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell*. 59:697-708.
- Göttlicher, M., S. Heck, und P. Herrlich. 1998. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*. 76:480-489.
- Graham, F.L., und A.J.v.d. Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52:456-467.
- Grigoriadis, A.E., K. Schellander, Z.Q. Wang, und E.F. Wagner. 1993. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol*. 122:685-701.
- Grigoriadis, A.E., Z.Q. Wang, und E.F. Wagner. 1995. Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet*. 11:436-441.
- Gschwendt, M., G. Fürstenberger, S. Rose-John, M. Rogers, W. Kittstein, G.R. Pettit, C.L. Herald, und F. Marks. 1988. Bryostatin 1, an activator of protein kinase C, mimics as well as inhibits biological effects of the phorbol ester TPA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*. 9:555-562.
- Gschwendt, M., W. Kittstein, G. Fürstenberger, und F. Marks. 1984. The mouse ear edema: a quantitatively evaluable assay for tumor promoting compounds and for inhibitors of tumor promotion. *Cancer Lett*. 25:177-185.
- Gum, R., E. Lengyel, J. Juarez, J.H. Chen, H. Sato, M. Seiki, und D. Boyd. 1996. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen- activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem*. 271:10672-10680.

- Gutman, A., und B. Wasylyk. 1990. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *Embo J.* 9:2241-2246.
- Habuchi, H., H.E. Conrad, und J.H. Glaser. 1985. Coordinate regulation of collagen and alkaline phosphatase levels in chick embryo chondrocytes. *J Biol Chem.* 260:13029-13034.
- Hashimoto, Y., O. Tajima, H. Hashiba, K. Nose, und T. Kuroki. 1990. Elevated expression of secondary, but not early, responding genes to phorbol ester tumor promoters in papillomas and carcinomas of mouse skin. *Mol Carcinog.* 3:302-308.
- Heck, S., K. Bender, M. Kullmann, M. Göttlicher, P. Herrlich, und A.C. Cato. 1997. I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *Embo J.* 16:4698-4707.
- Heck, S., M. Kullmann, A. Gast, H. Ponta, H.J. Rahmsdorf, P. Herrlich, und A.C. Cato. 1994. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J.* 13:4087-4095.
- Hennings, H., P.M. Blumberg, G.R. Pettit, C.L. Herald, R. Shores, und S.H. Yuspa. 1987. Bryostatins 1, an activator of protein kinase C, inhibits tumor promotion by phorbol esters in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis.* 8:1343-1346.
- Henriet, P., G.G. Rousseau, und Y. Eeckhout. 1992. Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA. Divergence of mouse and rat collagenases from the other mammalian collagenases. *FEBS Lett.* 310:175-178.
- Herron, G.S., M.J. Banda, E.J. Clark, J. Gavrilovic, und Z. Werb. 1986. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem.* 261:2814-2818.
- Horton, W.A. 1993. Morphology of Connective Tissue: Cartilage. In *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. P.M. Royce und D. Steinman, editors. John Wiley & Sons, New York.
- Hu, E., E. Mueller, S. Oliviero, V.E. Papaioannou, R. Johnson, und B.M. Spiegelman. 1994. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and - independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *Embo J.* 13:3094-3103.

- Imai, E., J.N. Miner, J.A. Mitchell, K.R. Yamamoto, und D.K. Granner. 1993. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem.* 268:5353-5356.
- Johansson, N., K. Airola, R. Grenman, A.L. Kariniemi, U. Saarialho-Kere, und V.M. Kahari. 1997a. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol.* 151:499-508.
- Johansson, N., U. Saarialho-Kere, K. Airola, R. Herva, L. Nissinen, J. Westermarck, E. Vuorio, J. Heino, und V.M. Kahari. 1997b. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn.* 208:387-397.
- Johnson, R., B. Spiegelman, D. Hanahan, und R. Wisdom. 1996. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol.* 16:4504-4511.
- Jonat, C., H.J. Rahmsdorf, K.K. Park, A.C. Cato, S. Gebel, H. Ponta, und P. Herrlich. 1990. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 62:1189-1204.
- Kalter, H. 1965. Interplay of intrinsic and extrinsic factors. In *Teratology, Principles and Techniques*. Vol. III. J.G. Wilson and J. Warkany, editors, Chigago. 57-80.
- Kameda, T., und H. Iba. 1998. Suppression of cellular transformation by glucocorticoid receptor mutants. *Cancer Res.* 58:867-870.
- Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzl, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass, und M.G. Rosenfeld. 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 85:403-414.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 270:16483-16486.
- Karin, M. 1998. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell.* 93:487-490.
- Kennard, M.D., D.C. Kang, R.L. Montgomery, und A.P. Butler. 1995. Expression of epidermal ornithine decarboxylase and nuclear proto- oncogenes in phorbol ester tumor promotion-sensitive and -resistant mice. *Mol Carcinog.* 12:14-22.

- Kerppola, T.K., D. Luk, und T. Curran. 1993. Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol Cell Biol.* 13:3782-3791.
- Kerr, L.D., J.T. Holt, und L.M. Matrisian. 1988. Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science.* 242:1424-1427.
- King, R.J.B., und W.I.P. Mainwaring. 1974. Steroid-Cell Interactions. Butterworths, London. 1-440 pp.
- Knäuper, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight, und G. Murphy. 1996a. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 271:1544-1550.
- Knäuper, V., B. Smith, C. Lopez-Otin, und G. Murphy. 1997. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur J Biochem.* 248:369-373.
- Knäuper, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S.J. Atkinson, H. Stanton, R.M. Hembry, und G. Murphy. 1996b. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem.* 271:17124-17131.
- Kolbus, A., H. I., S. M., D. K.-M., E.F. Wagner, und P. Angel. 1999. c-Jun dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *EMBO*, eingereicht.
- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R.T. Bronson, Y.H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, und T. Kishimoto. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89:755-764.
- König, H., H. Ponta, H.J. Rahmsdorf, und P. Herrlich. 1992. Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *Embo J.* 11:2241-2246.
- Kouzarides, T., und E. Ziff. 1988. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature.* 336:646-651.
- Kraft, A.S., J.B. Smith, und R.L. Berkow. 1986. Bryostatin, an activator of the calcium phospholipid-dependent protein kinase, blocks phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:1334-1338.

- Kralova, J., A.S. Liss, W. Bargmann, und H.R. Bose, Jr. 1998. AP-1 factors play an important role in transformation induced by the v- rel oncogene. *Mol Cell Biol.* 18:2997-3009.
- Krane, S.M. 1993. Mechanisms of tissue destruction in rheumatoid arthritis. In *Arthritis and Allied Conditions*. D.J. McCarty und W.J. Koopman, editors. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 763-779.
- Krieg, P., J. Finch, G. Fustenberger, K. Melber, L.M. Matrisian, und G.T. Bowden. 1988. Tumor promoters induce a transient expression of tumor-associated genes in both basal and differentiated cells of the mouse epidermis. *Carcinogenesis.* 9:95-100.
- Kuro-o, M., Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, T. Utsugi, Y. Ohyama, M. Kurabayashi, T. Kaname, E. Kume, H. Iwasaki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, S. Nishikawa, R. Nagai, und Y.I. Nabeshima. 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 390:45-51.
- Lanske, B., P. Divieti, C.S. Kovacs, A. Pirro, W.J. Landis, S.M. Krane, F.R. Bringhurst, und H.M. Kronenberg. 1998. The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone. *Endocrinology.* 139:5194-5204.
- Laplante, A.F., V. Moulin, F.A. Auger, J. Landry, H. Li, G. Morrow, R.M. Tanguay, und L. Germain. 1998. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 46:1291-1301.
- Lee, K., J.D. Deeds, S. Chiba, M. Un-No, A.T. Bond, und G.V. Segre. 1994. Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: in situ localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology.* 134:441-450.
- Leevers, S.J., H.F. Paterson, und C.J. Marshall. 1994. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature.* 369:411-414.
- Lewis, D.B., H.D. Liggitt, E.L. Effmann, S.T. Motley, S.L. Teitelbaum, K.J. Jepsen, S.A. Goldstein, J. Bonadio, J. Carpenter, und R.M. Perlmutter. 1993. Osteoporosis induced in mice by overproduction of interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:11618-11622.
- Lian, J.B., V. Shalhoub, F. Aslam, B. Frenkel, J. Green, M. Hamrah, G.S. Stein, und J.L. Stein. 1997. Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology.* 138:2117-2127.

- Lloyd, A., N. Yancheva, und B. Wasyluk. 1991. Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain. *Nature*. 352:635-638.
- Lochter, A., S. Galosy, J. Muschler, N. Freedman, Z. Werb, und M.J. Bissell. 1997. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 139:1861-1872.
- Lochter, A., M.D. Sternlicht, Z. Werb, und M.J. Bissell. 1998. The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*. 857:180-193.
- Luisi, B.F., W.X. Xu, Z. Otwinowski, L.P. Freedman, K.R. Yamamoto, und P.B. Sigler. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*. 352:497-505.
- Lukert, B.P. 1996. Glucocorticoid and Drug-Induced Osteoporosis. *In Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. M.J. Favus, editor. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York. 278-282.
- Madlener, M., W.C. Parks, und S. Werner. 1998. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res*. 242:201-210.
- Malyankar, U.M., S.R. Rittling, A. Connor, und D.T. Denhardt. 1994. The mitogen-regulated protein/proliferin transcript is degraded in primary mouse embryo fibroblast but not 3T3 nuclei: altered RNA processing correlates with immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:335-339.
- Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, et al. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83:835-839.
- Marais, R., Y. Light, C. Mason, H. Paterson, M.F. Olson, und C.J. Marshall. 1998. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science*. 280:109-112.
- Marcelo, C.L., und J. Tomich. 1983. Cyclic AMP, glucocorticoid, and retinoid modulation of in vitro keratinocyte growth. *J Invest Dermatol*. 81:64s-68s.

- Mark, M.P., W.T. Butler, C.W. Prince, R.D. Finkelman, and J.V. Ruch. 1988. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation*. 37:123-136.
- Marks, F., und G. Fürstenberger. 1990. The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 11:2085-2092.
- Martin, T., P.M. Cardarelli, G.C. Parry, K.A. Felts, und R.R. Cobb. 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol*. 27:1091-1097.
- Maser, R.L., B.S. Magenheimer, und J.P. Calvet. 1994. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem*. 269:27066-27073.
- Matrisian, L.M., G.T. Bowden, P. Krieg, G. Fürstenberger, J.P. Briand, P. Leroy, und R. Breathnach. 1986. The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:9413-9417.
- Mattot, V., M.B. Raes, P. Henriët, Y. Eeckhout, D. Stehelin, B. Vandebunder, und X. Desbiens. 1995. Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J Cell Sci*. 108:529-535.
- McKee, M.D., M.J. Glimcher, und A. Nanci. 1992. High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec*. 234:479-492.
- Medcalf, R.L., R.I. Richards, R.J. Crawford, und J.A. Hamilton. 1986. Suppression of urokinase-type plasminogen activator mRNA levels in human fibrosarcoma cells and synovial fibroblasts by anti-inflammatory glucocorticoids. *Embo J*. 5:2217-2222.
- Minden, A., und M. Karin. 1997. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1333:F85-104.
- Miner, J.N., und K.R. Yamamoto. 1992. The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev*. 6:2491-2501.
- Mitchell, P.G., H.A. Magna, L.M. Reeves, L.L. Lopresti-Morrow, S.A. Yocum, P.J. Rosner, K.F. Geoghegan, und J.E. Hambor. 1996. Cloning, expression, and type II collagenolytic

- activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 97:761-768.
- Mordacq, J.C., und D.I. Linzer. 1989. Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes Dev.* 3:760-769.
- Moscatelli, D., E. Jaffe, und D.B. Rifkin. 1980. Tetradecanoyl phorbol acetate stimulates latent collagenase production by cultured human endothelial cells. *Cell.* 20:343-351.
- Munaut, C., T. Salonurmi, S. Kontusaari, P. Reponen, T. Morita, J.M. Foidart, und K. Tryggvason. 1999. Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem.* 274:5588-5596.
- Murphy, G., H. Stanton, S. Cowell, G. Butler, V. Knäuper, S. Atkinson, und J. Gavrilovic. 1999. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Apmis.* 107:38-44.
- Nguyen-Ba, G., und I. Chouroulinkov. 1989. Epidermal cell proliferation and modulation of the protective potency of dexamethasone against phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity. *Carcinogenesis.* 10:793-796.
- Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 308:693-698.
- Nissenson, R.A. 1998. Parathyroid hormone (PTH)/PTHrP receptor mutations in human chondrodysplasia. *Endocrinology.* 139:4753-4755.
- Oehler, T., und P. Angel. 1992. A common intermediary factor (p52/54) recognizing "acidic blob"-type domains is required for transcriptional activation by the Jun proteins. *Mol Cell Biol.* 12:5508-5515.
- Offringa, R., A.M. Smits, A. Houweling, J.L. Bos, und A.J. van der Eb. 1988. Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucleic Acids Res.* 16:10973-10984.
- Okada, A., C. Tomasetto, Y. Lutz, J.P. Bellocq, M.C. Rio, und P. Basset. 1997. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol.* 137:67-77.

- Ostrowski, L.E., J. Finch, P. Krieg, L. Matrisian, G. Patskan, J.F. O'Connell, J. Phillips, T.J. Slaga, R. Breathnach, und G.T. Bowden. 1988. Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. *Mol Carcinog.* 1:13-19.
- Otto, F., A.P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K.C. Gilmour, I.R. Rosewell, G.W. Stamp, R.S. Beddington, S. Mundlos, B.R. Olsen, P.B. Selby, und M.J. Owen. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89:765-771.
- Owen, T.A., M. Aronow, V. Shalhoub, L.M. Barone, L. Wilming, M.S. Tassinari, M.B. Kennedy, S. Pockwinse, J.B. Lian, und G.S. Stein. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 143:420-430.
- Pendas, A.M., M. Balbin, E. Llano, M.G. Jimenez, und C. Lopez-Otin. 1997. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics.* 40:222-233.
- Penzlin, H. 1989. Lehrbuch der Tierphysiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 657 pp.
- Perlmann, T., P. Eriksson, und O. Wrangé. 1990. Quantitative analysis of the glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element. *J Biol Chem.* 265:17222-17229.
- Petersen, M.J., D.T. Woodley, G.P. Stricklin, und E.J. O'Keefe. 1987. Production of procollagenase by cultured human keratinocytes. *J Biol Chem.* 262:835-840.
- Pinsky, L., und A.M. DiGeorge. 1965. Cleft palate in the mouse: A teratogenic index of glucocorticoid potency. *Science.* 147:402-403.
- Pollock, J.H., M.J. Blaha, S.A. Lavish, S. Stevenson, und E.M. Greenfield. 1996. In vivo demonstration that parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein stimulate expression by osteoblasts of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor. *J Bone Miner Res.* 11:754-759.
- Porte, D., J. Tuckermann, M. Becker, B. Baumann, S. Teurich, T. Higgins, M.J. Owen, M. Schorpp-Kistner, und P. Angel. 1999. Both AP-1 and Cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene.* 18:667-678.

- Pratt, W.B. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 268:21455-21458.
- Puignero, V., A. Turull, und J. Queralt. 1998. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. *Inflammation.* 22:307-314.
- Quinn, C.O., D.K. Scott, C.E. Brinckerhoff, L.M. Matrisian, J.J. Jeffrey, und N.C. Partridge. 1990. Rat collagenase. Cloning, amino acid sequence comparison, and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 265:22342-22347.
- Quintanilla, M., K. Brown, M. Ramsden, und A. Balmain. 1986. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature.* 322:78-80.
- Ray, A., und K.E. Prefontaine. 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:752-756.
- Reboul, P., J.P. Pelletier, G. Tardif, J.M. Cloutier, und J. Martel-Pelletier. 1996. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 97:2011-2019.
- Reichardt, H.M., K.H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, und G. Schütz. 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 93:531-541.
- Reifel-Miller, A.E., D.M. Conarty, K.M. Valasek, P.W. Iversen, D.J. Burns, und K.A. Birch. 1996. Protein kinase C isozymes differentially regulate promoters containing PEA-3/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response element motifs. *J Biol Chem.* 271:21666-21671.
- Reik, A., A.F. Stewart, und G. Schütz. 1994. Cross-talk modulation of signal transduction pathways: two mechanisms are involved in the control of tyrosine aminotransferase gene expression by phorbol esters. *Mol Endocrinol.* 8:490-497.
- Rüther, U., D. Komitowski, F.R. Schubert, und E.F. Wagner. 1989. c-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene.* 4:861-865.
- Ryseck, R.P., und R. Bravo. 1991. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene.* 6:533-542.

- Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, R. Zinck, A. Nordheim, P. Herrlich, und H.J. Rahmsdorf. 1994. Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*. 78:963-972.
- Saez, E., S.E. Rutberg, E. Mueller, H. Oppenheim, J. Smoluk, S.H. Yuspa, und B.M. Spiegelman. 1995. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*. 82:721-732.
- Sako, T., S.H. Yuspa, C.L. Herald, G.R. Pettit, und P.M. Blumberg. 1987. Partial parallelism and partial blockade by bryostatin 1 of effects of phorbol ester tumor promoters on primary mouse epidermal cells. *Cancer Res*. 47:5445-5450.
- Sato, H., M. Kita, und M. Seiki. 1993. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*. 268:23460-23468.
- Scheinman, R.I., P.C. Cogswell, A.K. Lofquist, und A.S. Baldwin, Jr. 1995. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. 270:283-286.
- Schönthal, A., P. Herrlich, H.J. Rahmsdorf, und H. Ponta. 1988. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell*. 54:325-334.
- Schorpp, M., M.G. Mattei, I. Herr, S. Gack, J. Schaper, und P. Angel. 1995. Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene. *Biochem J*. 308:211-217.
- Schreiber, M., B. Baumann, M. Cotten, P. Angel, und E.F. Wagner. 1995. Fos is an essential component of the mammalian UV response. *Embo J*. 14:5338-5349.
- Schüle, R., P. Rangarajan, S. Kliewer, L.J. Ransone, J. Bolado, N. Yang, I.M. Verma, und R.M. Evans. 1990. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*. 62:1217-1226.
- Schwarz, J.A., A. Viaje, und T.J. Slaga. 1977. Fluocinolone acetonide: a potent inhibitor of mouse skin tumor promotion and epidermal DNA synthesis. *Chem Biol Interact*. 17:331-347.

- Scribner, J.D., und R.K. Boutwell. 1972. Inflammation and tumor promotion: selective protein induction in mouse skin by tumor promoters. *Eur J Cancer*. 8:617-621.
- Scribner, J.D., und T.J. Slaga. 1973. Multiple effects of dexamethasone on protein synthesis and hyperplasia caused by a tumor promoter. *Cancer Res*. 33:542-546.
- Selvamurugan, N., W.Y. Chou, A.T. Pearman, M.R. Pulumati, und N.C. Partridge. 1998. Parathyroid hormone regulates the rat collagenase-3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein-1 site and the runt domain binding sequence. *J Biol Chem*. 273:10647-10657.
- Shalhoub, V., D. Conlon, M. Tassinari, C. Quinn, N. Partridge, G.S. Stein, und J.B. Lian. 1992. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem*. 50:425-440.
- Slaga, T.J. 1984. Can tumour promotion be effectively inhibited? *IARC Sci Publ*. 56:497-506.
- Smith, J.B., L. Smith, und G.R. Pettit. 1985. Bryostatins: potent, new mitogens that mimic phorbol ester tumor promoters. *Biochem Biophys Res Commun*. 132:939-945.
- Stahle-Backdahl, M., B. Sandstedt, K. Bruce, A. Lindahl, M.G. Jimenez, J.A. Vega, und C. Lopez-Otin. 1997. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest*. 76:717-728.
- Stein, G.S., und J.B. Lian. 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*. 14:424-442.
- Stetler-Stevenson, W.G., L.A. Liotta, und D.E. Kleiner, Jr. 1993. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J*. 7:1434-1441.
- Stocklin, E., M. Wissler, F. Gouilleux, und B. Groner. 1996. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 383:726-728.
- Subramaniam, N., W. Cairns, und S. Okret. 1998. Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1. *J Biol Chem*. 273:23567-23574.

- Suzuki, T., M. Murakami, N. Onai, E. Fukuda, Y. Hashimoto, M.H. Sonobe, T. Kameda, M. Ichinose, K. Miki, und H. Iba. 1994. Analysis of AP-1 function in cellular transformation pathways. *J Virol.* 68:3527-3535.
- Szallasi, Z., C.B. Smith, G.R. Pettit, und P.M. Blumberg. 1994. Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 269:2118-2124.
- Takahashi, K., und H.J. Cohen. 1986. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood.* 68:640-645.
- Takahashi, T., T. Wada, M. Mori, Y. Kokai, und S. Ishii. 1996. Overexpression of the granulocyte colony-stimulating factor gene leads to osteoporosis in mice. *Lab Invest.* 74:827-834.
- Taniguchi, T. 1988. Regulation of cytokine gene expression. *Annu Rev Immunol.* 6:439-464.
- Teurich, S., und P. Angel. 1995. The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem Senses.* 20:251-255.
- Todaro, G.J., und H. Green. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 17:299-313.
- Torchia, J., D.W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C.K. Glass, und M.G. Rosenfeld. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature.* 387:677-684.
- Tuckermann, J. 1995. Entwicklungsspezifische Regulation der Matrixdegradation in Mäusen mit normaler und genetisch veränderter c-fos-Expression. In Fakultät für Bio- und Geowissenschaften. Universität Karlsruhe, Karlsruhe.
- Tuckermann, J., K. Pittois, N.C.P. Partridge, J. Merregaert, und P. Angel. 1999. MMP-13 and *Itm2a* are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: Sequential temporal and spatial expression of *Itm2a*, alkaline phosphatase, MMP-13 and osteocalcin in the mouse. *J Bone Miner Res*, eingereicht.
- Umesono, K., und R.M. Evans. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell.* 57:1139-1146.

- Uria, J.A., M.G. Jimenez, M. Balbin, J.M.P. Freije, und C. Lopez-Otin. 1998. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 273:9769-9777.
- van Beuningen, H.M., P.M. van der Kraan, O.J. Arntz, und W.B. van den Berg. 1994. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* 71:279-290.
- van Dam, H., M. Duyndam, R. Rottier, A. Bosch, L. de Vries Smits, P. Herrlich, A. Zantema, P. Angel, und A.J. van der Eb. 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.
- van Dam, H., S. Huguier, K. Kooistra, J. Baguet, E. Vial, A.J. van der Eb, P. Herrlich, P. Angel, und M. Castellazzi. 1998. Autocrine growth and anchorage independence: two complementing Jun- controlled genetic programs of cellular transformation. *Genes Dev.* 12:1227-1239.
- van den Berg, W.B., G.J. van Osch, P.M. van der Kraan, und H.M. van Beuningen. 1993. Cartilage destruction and osteophytes in instability-induced murine osteoarthritis: role of TGF beta in osteophyte formation? *Agents Actions.* 40:215-219.
- Vayssiere, B.M., S. Dupont, A. Choquart, F. Petit, T. Garcia, C. Marchandeu, H. Gronemeyer, und M. Resche-Rigon. 1997. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol.* 11:1245-1255.
- Viaje, A., T.J. Slaga, M. Wigler, und I.B. Weinstein. 1977. Effects of antiinflammatory agents on mouse skin tumor promotion, epidermal DNA synthesis, phorbol ester-induced cellular proliferation, and production of plasminogen activator. *Cancer Res.* 37:1530-1536.
- Vogt, P.K., und T.J. Bos. 1990. jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res.* 55:1-35.
- Wang, Z.Q., A.E. Grigoriadis, U. Mohle-Steinlein, und E.F. Wagner. 1991. A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *Embo J.* 10:2437-2450.

- Wang, Z.Q., J. Liang, K. Schellander, E.F. Wagner, und A.E. Grigoriadis. 1995. c-fos-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with c-jun and the role of endogenous c-fos. *Cancer Res.* 55:6244-6251.
- Weinreb, M., D. Shinar, und G.A. Rodan. 1990. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res.* 5:831-842.
- White, L.A., C. Maute, und C.E. Brinckerhoff. 1997. ETS sites in the promoters of the matrix metalloproteinases collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) are auxiliary elements that regulate basal and phorbol-induced transcription. *Connect Tissue Res.* 36:321-335.
- Wilhelm, S.M., I.E. Collier, A. Kronberger, A.Z. Eisen, B.L. Marmer, G.A. Grant, E.A. Bauer, und G.I. Goldberg. 1987. Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:6725-6729.
- Windsor, L.J., H. Grenett, B. Birkedal-Hansen, M.K. Bodden, J.A. Engler, und H. Birkedal-Hansen. 1993. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J Biol Chem.* 268:17341-17347.
- Yang-Yen, H.F., J.C. Chambard, Y.L. Sun, T. Smeal, T.J. Schmidt, J. Drouin, und M. Karin. 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell.* 62:1205-1215.
- Yu, A.E., R.E. Hewitt, E.W. Connor, und W.G. Stetler-Stevenson. 1997. Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging.* 11:229-244.
- Ziegler, R., und C. Kasperk. 1998. Glucocorticoid-induced osteoporosis: prevention and treatment. *Steroids.* 63:344-348.