



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5904 B

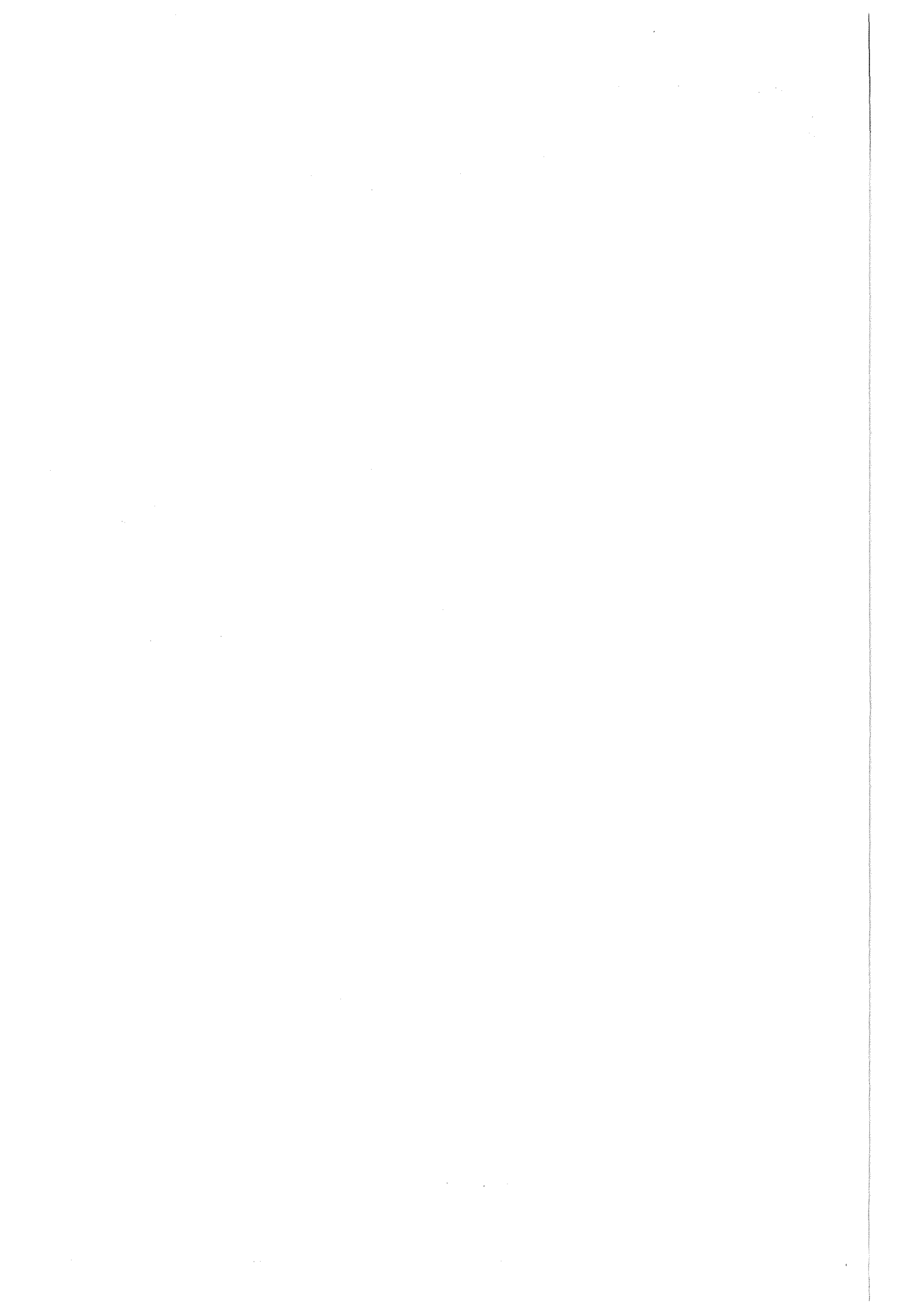
**Einfluß des Proto-Onkogens bcl-2  
auf die Apoptose alveolärer  
Brustepithelzellen und auf die  
experimentell induzierte  
Tumorigenese der Brust,  
des Darms und der Haut in  
transgenen Mäusen**

**R. Jäger**

Institut für Genetik

März 1997

---



**Forschungszentrum Karlsruhe  
Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte  
FZKA 5904 B**

**Einfluß des Proto-Onkogens bcl-2  
auf die Apoptose alveolärer Brustepithelzellen  
und auf die experimentell induzierte Tumorigenese  
der Brust, des Darms und der Haut  
in transgenen Mäusen**

**Richard Jäger  
Institut für Genetik**

**\*Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe  
genehmigte Dissertation**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1997**

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

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**ISSN 0947-8620**

## **Zusammenfassung**

Das in die Entstehung humaner follikulärer B-Zell-Lymphome kausal involvierte Proto-Onkogen *bcl-2* wird auch in zahlreichen Tumoren epithelialen Ursprungs, z.B. der Brust, des Dickdarms und der Haut exprimiert. *Bcl-2* ist Mitglied einer Familie homologer Proteine, die in die Kontrolle des apoptotischen Absterbens von Zellen involviert sind. In Lymphomen beruht die onkogene Wirkung von *Bcl-2* auf seinem Vermögen, Apoptose unterdrücken zu können. Dagegen ist seine mögliche Rolle in der Entstehung epithelialer Tumore noch unerforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Frage experimentell angegangen, indem transgene Mäuse hergestellt wurden, die *Bcl-2* (a) in der Brustdrüse, (b) u.A. im Darmtrakt, und (c) in suprabasalen Hautschichten überexprimieren. Während die Wirkung der *Bcl-2*-Expression auf die Entstehung experimentell induzierter Tumore in Darm oder Haut zweifelhaft blieb, konnte *Bcl-2* die Entstehung *c-Myc*-induzierter Brusttumore beschleunigen. Weiterhin wurde gefunden, daß die durch *c-Myc*-induzierte hohe Apoptoserate im Brustepithel durch *Bcl-2* signifikant vermindert wurde. *Bcl-2* konnte zudem die Apoptose alveolärer Brustepithelzellen unterdrücken, die durch das Einsetzen der postlaktationalen Involution der Brustdrüse oder durch ein *WAPp53*-Transgen induziert wurde. Diese Befunde legen nahe, daß - analog zur Situation in Lymphomen - *Bcl-2* zur Entstehung von Brusttumoren durch sein Vermögen, Apoptose zu unterdrücken, beiträgt.

**Influence of the proto-oncogene bcl-2 on the apoptosis of mammary alveolar epithelial cells and on the experimentally induced tumorigenesis of mammary gland, intestine and skin of transgenic mice**

**Abstract.** Expression of bcl-2, a proto-oncogene causally involved in the development of follicular lymphoma in man, is also found in various tumours of epithelial origin including breast, colon and skin. Bcl-2 is a member of a family of homologous proteins controlling apoptotic cell death. In lymphoma Bcl-2 exerts its oncogenic action by its capability of suppressing apoptosis. However, its possible role in the development of epithelial tumours remains to be investigated.

To address this question experimentally, transgenic mice have been generated which overexpress Bcl-2 (a) in their mammary glands, (b) in their intestine, and (c) in suprabasal layers of the skin. While the effects of Bcl-2 expression on the development of experimentally induced tumors of the intestine and of the skin remained unclear, Bcl-2 accelerated the c-Myc-induced mammary tumor formation. Moreover, the high rate of apoptosis in the breast epithelium induced by c-Myc was significantly decreased by Bcl-2. In addition, Bcl-2 was capable of suppressing apoptosis of alveolar mammary epithelial cells induced by postlactational involution or a WAPp53 transgene, respectively. These findings suggest that, by analogy to lymphoma, Bcl-2 contributes to mammary tumorigenesis by suppressing apoptosis.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. ... in einfachen Worten.....	1
1.2. Das keineswegs triviale Absterben von Zellen .....	1
1.3. Zelluläre Veränderungen beim apoptotischen Zelltod .....	2
1.4. Apoptose und programmierter Zelltod in der Brustdrüse der Maus...5	
1.5. Steuerung der Apoptose in der Brustdrüse .....	6
1.6. Bcl-2.....	8
1.6.1. Struktur und Funktion des bcl-2-Gens.....	8
1.6.2. Expression von Bcl-2.....	9
1.6.3. Struktur und Funktion des Bcl-2-Proteins.....	10
1.6.3.1. Lokalisation und Funktion .....	10
1.6.3.2. Interaktionen mit anderen Proteinen .....	12
(a) Bcl-2 und Signaltransduktion.....	12
(b) Die Bcl-2-Familie .....	13
1.7. Onkogene modulieren die Apoptose .....	15
1.8. Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	19
2.1. Materialien.....	19
2.1.1. Bezugsquellen .....	19
2.1.2. Tiere und Bezugsquellen:.....	20
2.1.3. Bakterienstämme .....	20
2.1.4. Plasmide.....	21
2.1.5. Antikörper .....	21
2.1.6. Oligonukleotide.....	21
2.1.7. Lösungen.....	22
2.1.8. DNA-Sonden .....	24
2.2. Methoden .....	24
2.2.1. Klonierung von DNA.....	24
2.2.1.1. Konstruktion der Plasmide .....	24
2.2.1.2. Phenol/Chloroform-Extraktion .....	25
2.2.1.3. Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren .....	26
2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
2.2.1.5. Herstellung kompetenter E. coli .....	26
2.2.1.6. Transformation kompetenter E. coli .....	26

2.2.1.7. Plasmidpräparation im kleinen Maßstab .....	27
2.2.1.8. Plasmidpräparation im großen Maßstab .....	27
2.2.1.9. Analytischer und präparativer Verdau von Plasmid-DNA .....	28
2.2.1.10. Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	28
2.2.1.11. Elektroelution von DNA-Fragmenten .....	28
2.2.1.12. Kinasierung und Ligation von Adaptoren .....	28
2.2.1.13. Ligation von Linkern an DNA.....	29
2.2.1.14. Dephosphorylieren von 5'-Überhängen mit CIP .....	29
2.2.1.15. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	30
2.2.2. Test der Konstrukte in vitro .....	30
2.2.2.1. Transfektion von 3T3-Zellen .....	30
2.2.2.2. Transfektion von PAM-212-Zellen .....	30
2.2.2.3. Herstellung von Proteinextrakten.....	31
2.2.3. Herstellung und Analyse transgener Mäuse.....	31
2.2.3.1. Vorbereiten der DNA für die Mikroinjektionen .....	31
2.2.3.2. Superovulation .....	31
2.2.3.3. Isolierung, Mikroinjektion und Embryotransfer .....	32
2.2.3.4. Zucht von Mäusen .....	32
2.2.3.5. Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	32
2.2.3.6. Analytischer Verdau genomischer DNA.....	33
2.2.3.7. Southern Blot .....	33
2.2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.2.3.9. RNA-Präparation aus Geweben .....	34
2.2.3.10. RT-PCR-Nachweis von Maus-bcl-2-mRNA.....	34
2.2.3.11. Gelelektrophorese von RNA.....	35
2.2.3.12. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen .....	35
2.2.3.13. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	35
2.2.3.14. Hybridisierung .....	36
2.2.3.15. Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe.....	37
2.2.3.16. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen.....	37
2.2.3.17. Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen.....	37
2.2.3.18. Fixieren und Paraffinieren von Gewebe.....	38
2.2.3.19. Nachweis apoptotischer Zellen auf Gewebeschnitten..	39
2.2.3.20. Totalpräparate von Mausbrustdrüsen .....	40



2.2.3.21. 2-Stufen-Karzinogenese der Haut.....	40
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1. Allgemeiner Teil .....	41
3.1.1. DNA-Konstrukte zur Generierung der transgenen Mäuse ....	41
3.1.2. Erzeugung transgener Mäuse.....	44
3.1.3. Transgenexpression in den transgenen Mäusen.....	48
(a) Expression von transgenem und endogenem Bcl-2 in der Brustdrüse WAP-bcl-2-transgener Mäuse.....	48
(b) Transgenexpression in ubi-bcl-2-transgenen Mäusen.....	52
(c) Transgenexpression in iv-bcl-2-transgenen Mäusen .....	55
3.2. Spezieller Teil .....	57
3.2.1. Experimente zur Apoptose mit den WAP-bcl-2-transgenen Mäusen.....	57
(a) Inhibition der Apoptose alveolärer Epithelzellen während der postlaktationalen Involution der Brustdrüsen in WAP-bcl- 2-transgenen Mäusen.....	59
(b) Expression involutions-assoziiierter Transcripte.....	63
(c) Inhibition p53-abhängiger Apoptose in den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Mäuse.....	65
(d) Einfluß des WAP-bcl-2-Transgens auf durch ein WAP- TGF- $\beta$ 1-Transgen ausgelöste Laktationsinsuffizienz und erhöhte Apoptoserate des Brustepithels .....	69
3.2.2. Experimente zur Tumorigenese .....	72
3.2.2.1. Einfluß von Bcl-2 auf die Tumorigenese der Brustdrüse .....	72
(a) Kooperation mit c-myc in der Entstehung von Brusttumoren.....	72
(b) C-Myc-Überexpression führt zu Apoptosen im Brustepithel: partielle Inhibition durch Bcl-2.....	80
3.2.2.2. Experimente mit ubi-bcl-2-transgenen Mäusen.....	82
(a) Ubiquitäre Bcl-2-Überexpression führt nicht zu histologischen Veränderungen der Organe adulter Tiere.....	82
(b) Einfluß des ubi-bcl-2-Transgens auf die Entstehung intestinaler Tumore .....	83

3.2.2.3. Einfluß suprabasaler Bcl-2-Expression auf die Zwei- Stufen-Karzinogenese der Haut in iv-bcl-2-transgenen Mäusen.....	86
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1. Allgemeines.....	90
4.2. Experimente mit WAP-bcl-2-transgenen Mäusen.....	92
4.2.1. Eine methodische Vorbemerkung.....	93
4.2.2. Bcl-2-homologe Proteine sind in der Apoptose alveolärer Zellen beteiligt.....	94
4.2.3. Bcl-2 hat keinen Einfluß auf die Expression involutions- assoziiierter Transcripte.....	96
4.2.4. Separierung von Apoptose und Differenzierung.....	98
4.2.5. Spielt TGF- $\beta$ 1 eine Rolle in der involutions-assoziierten Apoptose alveolärer Zellen?.....	101
4.2.6. Inhibition p53-abhängiger Apoptose alveolärer Zellen durch Bcl-2.....	102
4.2.7. Partielle Inhibition c-Myc-induzierter Apoptose.....	104
4.3. Apoptose und Tumorigenese.....	106
4.3.1. Onkogenkooperation zwischen Bcl-2 und c-Myc in der Mammakarzinogenese .....	107
4.3.2. Möglicher Beitrag von Bcl-2 zur Karzinogenese von Haut bzw. Dickdarm.....	110
4.3.4. Weitere experimentelle Hinweise auf eine Rolle der Apoptose-Inhibition in der Tumorigenese .....	112
4.3.5. Ausblick: Spekulationen und Folgerungen.....	115
<b>5. Literatur .....</b>	<b>117</b>

## Abkürzungen

$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
APC	Adenomatöse Polyposis Coli-Gen
B6D2F1	F1-Generation aus der Kreuzung von DBA/2- und C57Bl6-Mäusen
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	`counts per minute` (radioaktive Zerfälle pro Minute)
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
g	relative Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -Konvertase
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
LTR	long terminal repeat
M	molar (Mol/Liter)
Min	multiple intestinal neoplasia
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	`messenger`-RNA
OD	optische Dichte (Absorption)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGP-2	schwefelhaltiges Glycoprotein-2
SV40	Simian Virus 40
SV40-Tag	Großes T-Antigen aus SV40
Tdt	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TGF $\alpha$	Tumor-Wachstumsfaktor $\alpha$
TGF- $\beta$ 1	Tumorwachstumsfaktor- $\beta$ 1
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Tris	Tri-(hydroxymethyl-)aminoethan
TUNEL	Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labelling
U	Enzymeinheiten
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
WAP	whey acidic protein, saures Molkeprotein

## **1. Einleitung**

### **1.1. ... in einfachen Worten**

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, daß eine Zelle, sobald sie zur Krebszelle zu entarten droht, ein Notprogramm aktiviert, das in ihre eigene Zerstörung mündet. Demnach kann aus einer Zelle nur dann Krebs entstehen, wenn dieses Notprogramm ausgeschaltet worden ist. Im Experiment sollte die Inaktivierung dieses Notprogramms somit die Tumorentstehung begünstigen. Ein solches Notprogramm existiert wirklich, es wird als Apoptose bezeichnet. Es ist eine Art Selbstmordprogramm der Zelle, und diese besitzt Faktoren, die es steuern - es anschalten, aber auch es abschalten können. In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse genetisch so manipuliert, daß sie einen der Faktoren, die die Apoptose abschalten können, ein Protein namens Bcl-2, in bestimmten Geweben aktiviert haben. Es wurde untersucht, inwieweit und unter welchen Umständen dies das Ablaufen des Notprogramms tatsächlich beeinträchtigt. Zudem wurde geprüft, ob dieses Außerkraftsetzen des Notprogramms die Krebsentstehung wirklich begünstigt. Im folgenden wird daher zunächst die Rede sein von Apoptose. Dann wird Funktion und Wirkungsweise von Bcl-2 nach dem heutigen Wissenstand kurz dargestellt, um schließlich die durchgeführten Experimente zu beschreiben.

### **1.2. Das keineswegs triviale Absterben von Zellen**

Auf den ersten Blick ist das Absterben von Zellen ein triviales Phänomen, ähnlich wie vielleicht der Tod eines Tieres infolge Verletzung trivial erscheinen mag. Tatsächlich können Zellen aber auf zwei fundamental verschiedene Weisen absterben, nekrotisch oder apoptotisch (Übersichten in: Cohen, 1993; Schwartz und Osborne, 1993). Nekrose bezeichnet die mehr triviale, passive Form des Absterbens. Sie erfolgt aufgrund von physikalischen oder chemischen Einwirkungen, die direkt oder indirekt die Integrität der Zelle verletzen und zu ihrer Lyse führen. Nekrotische Zelltode hinterlassen häufig Spuren - dauerhafte durch Narbenbildung im Gewebe, transiente in

Form von Entzündungen, die durch die bei der Zellyse ins Interstitium freigesetzten intrazellulären Bestandteile ausgelöst werden.

Im Unterschied dazu erfolgt der apoptotische Zelltod nicht passiv; die zur Apoptose führenden Einflüsse sind lediglich *Signale*, die über einen Signaltransduktionsmechanismus ein intrazelluläres Programm auslösen, mit dem die betroffene Zelle sich selbst, in einer Art Suizid, zerstört. Der zugrundeliegende Mechanismus gewährleistet, daß die Zelle unbemerkt, und ohne Spuren zu hinterlassen, verschwindet. Hieraus wird verständlich, daß Apoptose den physiologischen Modus des Zelltodes darstellt. In der Tat treten Apoptosen nicht nur in pathologischen Situationen auf, beispielsweise durch Bestrahlung, virale Infektion, Hyperthermie, oder im Rahmen der Immunabwehr durch cytotoxische T-Lymphocyten ausgelöst (Übersicht in Thompson, 1995). Unentwegt sterben Zellen in vielen Geweben und Organen des Körpers als Teil der (physiologischen) Balance zwischen Zellvermehrung und Zellverlust. Weiter werden während der Entwicklung des Organismus in vielen Körperstrukturen zunächst Zellen angelegt, die nach einiger Zeit wieder verschwinden (Programmierter Zelltod, Übersicht in Ucker, 1991). Bekannte Beispiele hierfür sind die interdigitalen Bereiche der Extremitätenknospe, diejenigen Nervenzellen des sich entwickelnden Nervensystems, denen es nicht gelingt, funktionelle synaptische Kontakte zu knüpfen, sowie autoreaktive Zellen während der Ausbildung des Immunsystems.

Dabei ist nicht klar, ob dieses in der Ontogenie und normalen Organfunktion relevante Todesprogramm im Lauf der Evolution sekundär auf pathologische Situationen angewandt, oder ob ein als Reaktion auf pathogene Einflüsse entstandenes Prinzip auf physiologische Prozesse adaptiert worden ist. Auf jeden Fall ist diese Form des Zelltodes aus der Sicht der Zelle offenbar altruistisch und kann in der Evolution nur infolge seiner sozialen Funktion für einen Organismus (oder eine Population genetisch identischer Zellen) konserviert worden sein.

### **1.3. Zelluläre Veränderungen beim apoptotischen Zelltod**

Der apoptotische Zelltod vollzieht sich in den unterschiedlichsten pathologischen oder physiologischen Kontexten nach einem stereotypen Muster (Übersicht in Cohen, 1993). Die betreffende Zelle verliert den Kontakt zu Nachbarzellen, schrumpft und rundet sich ab, während es an der

Zellmembran zu bläschenförmigen Vorwölbungen kommt. Parallel hierzu kondensiert im Kern das Chromatin, zunächst an den Randbereichen, was zur Herausbildung sichelförmiger elektronendichter Bereiche führt. Sodann zerfällt der Zellkern in Chromatin enthaltende Fragmente, die zusammen mit intakten Organellen in größeren Vesikeln von der nun zerfallenden Zelle abgeschnürt werden. Diese sogenannten apoptotischen Körperchen (englisch: "apoptotic bodies") werden schließlich von Nachbarzellen oder von Makrophagen phagozytiert.

Neben diesen mikroskopisch erkennbaren, morphologischen finden eine Vielzahl biochemischer Veränderungen statt. Zu diesen gehören: die Fragmentierung der chromosomalen DNA; die Vernetzung zellulärer Proteine; die Spaltung bestimmter Proteine. Wie diese Veränderungen mit der morphologischen Erscheinung der Apoptose zusammenhängen, ist nur teilweise bekannt.

**(a) DNA-Fragmentierung** (Übersicht in Bortner et al., 1995). Die Aktivierung einer noch nicht zweifelsfrei identifizierten  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen DNase führt zur endonukleolytischen Spaltung des Chromatins in den internukleosomalen Bereichen. Wahrscheinlich unabhängig hiervon kommt es zunächst auch zur Bildung größerer Fragmente (30-50 und 200-300 kb). Somit liegen in einer Momentaufnahme vor dem vollständigen Abschluß des Prozesses DNA-Fragmente von  $n \times 180$  bp Länge vor, die gelelektrophoretisch nachweisbar sind. Da die DNA-Fragmentierung auch mit anderen Techniken, beispielsweise auf histologischen Schnitten per TUNEL-Methode (Gavrieli et al., 1992), leicht nachgewiesen werden kann, ist sie zu einem wichtigen analytischen Kriterium der Apoptose geworden. Allerdings ist die DNA-Fragmentierung für die übrigen zellulären Veränderungen während der Apoptose nicht von Belang. So kann experimentell in nach Cytochalasin B-Behandlung entkernten Zellen Apoptose ausgelöst und vollzogen werden (Jacobson et al., 1994; Schulze-Osthoff et al., 1994).

**(b) Vernetzung zellulärer Proteine.** Durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, während der Apoptose spezifisch aktivierte Gewebe-Transglutaminase (Typ II-Transglutaminase; Übersichten in: Gentile et al., 1992; Melino et al., 1994) werden zelluläre Proteine über  $\text{N}^\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)Lysin-Querverbindungen verknüpft. Die derart vernetzte Proteinmatrix ist für die hohe Widerstandsfähigkeit der apoptotischen Körperchen gegenüber Detergentien

in vitro verantwortlich (Fesus et al., 1989); in vivo wird auf diese Weise wahrscheinlich die Freisetzung potentiell schädlicher intrazellulärer Bestandteile verhindert (z.B. lysosomale Enzyme, Nukleinsäuren).

Zudem führte Überexpression der Gewebe-Transglutaminase in 3T3-Zellen zu den für die Apoptose typischen zellulären Veränderungen wie Bläschenbildung an der Zellmembran und Zell-Fragmentierung (Gentile et al., 1992). Möglicherweise sind also auch diese Veränderungen während der Apoptose eine direkte Konsequenz der Gewebe-Transglutaminase-Aktivierung.

**(c) Spaltung von Proteinen.** Zu den spezifisch während der Apoptose gespalteten Proteinen gehören Lamine und das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (Übersicht in Takahashi und Earnshaw, 1996). Lamine sind mit der inneren Kernhülle assoziierte Intermediärfilamente. Ihre Spaltung ist essentiell für die Kernfragmentierung während der Apoptose. - Dagegen ist die Bedeutung der Spaltung von PARP unklar. Dieses mit der Reparatur von DNA-Schäden in Zusammenhang stehende Enzym katalysiert in Gegenwart von DNA-Strangbrüchen die ADP-Ribosylierung nukleärer Proteine. Wie die Spaltung der Lamine ist auch die Spaltung des 113 kDa-PARP-Enzyms in typische 85 kDa- und 21 kDa-Fragmente ein frühes Ereignis bei der Apoptose.

Die an der Spaltung beteiligten Enzyme bilden mit dem Enzym Interleukin-1 $\beta$ -Konvertase die Familie ICE-ähnlicher Enzyme (Übersichten in Kumar, 1994; Takahashi und Earnshaw, 1996). Interleukin-1 $\beta$ -Konvertase (ICE) war zunächst im Cytosol von Monocyten entdeckt und als Cysteinprotease beschrieben worden, die den 31 kDa-Interleukin-1 $\beta$ -Vorläufer zur aktiven 17,5 kDa-Form spaltet. ICE wird selbst als ein 45 kDa-Proenzym synthetisiert, das erst nach (möglicherweise autokatalytischer) Spaltung eine 10 kDa- sowie die katalytisch wirksame 20 kDa-Untereinheit liefert, die zusammen als Heterodimere den aktiven tetrameren Enzymkomplex bilden. Zu den homologen Proteasen gehören TX, Nedd-2 (und dessen humanes Homolog Ich-1), Mcl-2 sowie CPP32 (identisch mit Yama und Apopain). Da die Spaltstellen in den jeweiligen Proenzymen typischen Erkennungssequenzen der ICE-ähnlichen Proteasen entsprechen, nimmt man eine kaskadenartige Aktivierung der Enzyme während der Apoptose an. So vermag ICE nicht selbst PARP zu spalten, allerdings den Präkursor des PARP-spaltenden Homologs CPP32.

Für die meisten der ICE-Homologen wurde gezeigt, daß ihre experimentelle Überexpression in kultivierten Zellen Apoptose auslöst. Zusammen mit der Existenz spezifischer Peptid-Inhibitoren sowie viraler Inhibitorproteine (Crm A aus Kuhpockenvirus [Ray et al., 1992], p35 aus Bakulovirus [Bertin et al., 1996]), die in den verschiedensten zellulären Kontexten Apoptose zu hemmen vermögen, legt dies die kausale Beteiligung der ICE-Homologen an der Apoptose nahe.

#### **1.4. Apoptose und programmierter Zelltod in der Brustdrüse der Maus**

Die Brustdrüse der Maus ist ein aufgrund seiner Lage und postembryonalen Entwicklung leicht zugängliches und experimentell gut untersuchtes Organ (Übersicht über Entwicklung und Anatomie in Green, 1966). Die Maus besitzt 5 Paar Brustdrüsen, die sich, ausgehend von den Mamillen auf der Bauchseite, unter der Haut seitlich nach oben ziehen. Das Brustdrüsengewebe umspannt so den Brust- und Schulter-, den Bauch- und den Lendenbereich. Aufgrund dieser superfiziellen Lage sind beispielsweise Brusttumore der Maus leicht von außen als Erhebungen erkennbar, die an unterschiedlichsten Positionen auftreten können.

Unmittelbar nach der Geburt stellt die Brustdrüse noch ein rudimentäres, von einem zur Mamille führenden Hauptgang abzweigendes, kurzes Gangsystem dar, das lediglich in den Anfangsbereich des bereits ausgebildeten Fettkissens ragt. Während der Pubertät (3. bis 6. Lebenswoche) beginnt an speziellen Strukturen an den Gangenden, den terminalen Endknöpfchen, intensive Zellproliferation und davon ausgehend Verlängerung der Gänge, bis sie ein das gesamte Fettkissen durchziehendes System gebildet haben. Während der 18 Tage dauernden Schwangerschaft kommt es zu weiteren Verzweigungen und in den lateralen und terminalen Bereichen der Gänge zur Bildung bläschenförmiger Strukturen (Alveoli). Am Ende der Schwangerschaft ist das stromale Fettgewebe fast vollständig von duktalem und alveolärem Strukturen verdrängt. Die Alveoli repräsentieren die milchsezernierenden Anteile der laktierenden Brust. Sie bestehen aus einer epithelialen Lage differenzierter, milchproduzierender Zellen, die korbartig von Myoepithelzellen umgeben ist, deren Oxytocin-stimulierte Kontraktion zum Auspressen der von den Epithelzellen zuvor sezernierten Milch in die Milchgänge und somit zur Laktation führt. Die gesamte Anordnung ist durch



eine Basallamina vom fibro-adipösen Stroma abgegrenzt. Mit der Beendigung der Laktation nach etwa 3 Wochen kommt es schließlich zur Rückbildung des Brustepithels zu einem Stadium, welches dem vor der Schwangerschaft vorliegenden entspricht. - Auch während des Ovarialzyklusses der nichtschwangeren Maus kommt es regelmäßig in begrenztem Ausmaße während der Östrusphase zur Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen und zu ihrer Rückbildung während der Diöstrusphase (Andres et al., 1995; Robinson et al., 1995).

In jeder dieser Entwicklungsphasen spielt Apoptose eine prominente Rolle. So ist das apoptotische Zugrundegehen von Zellen in der unmittelbar hinter den terminalen Endknöpfchen liegenden Region für die Lumenbildung während des duktales Wachstums in der Pubertät verantwortlich (Humphreys et al., 1996). - Die während des Ovarialzyklus in der Östrusphase gebildeten "überzähligen" Zellen bilden sich durch Apoptose zurück (Andres et al., 1995). - Im größten Ausmaß finden apoptotische Zelltode während der postlaktationalen Rückbildung des alveolären Brustepithels (postlaktationale Involution) statt. Sowohl die alveolären als auch myoepitheliale Zellen gehen hierbei apoptotisch zugrunde (Walker et al., 1989). Dies führt zusammen mit der Expression von Matrix-Metalloproteinasen schließlich zum Kollabieren und Verschwinden der alveolären Strukturen (Lund et al., 1996). Das apoptotische Absterben der Zellen ist begleitet von spezifischer DNA-Fragmentierung (Strange et al., 1992), die sich per TUNEL-Assay oder der verwandten ISEL-Technik auf Gewebeschnitten nachweisen läßt; die Zahl apoptotischer Zellen erreicht ihr Maximum am dritten oder vierten Tag der Involution (Quarrie et al., 1995; Heermeier et al., 1996).

### **1.5. Steuerung der Apoptose in der Brustdrüse**

Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurden Gene identifiziert und kloniert, die bei der Steuerung des programmierten Zelltodes eine Rolle spielen; inzwischen ist klar geworden, daß diese Gene generell in der Kontrolle der Apoptose mitwirken. Zu ihnen gehören *ced-3*, dessen Genprodukt homolog zu den ICE-ähnlichen Proteasen der Säugetiere ist, und das gleich diesen an der Exekution des Zelltodes beteiligt ist (Yuan et al., 1993). Zudem wurde mit *ced-9* ein Gen isoliert, das programmierte Zelltode zu unterdrücken vermag (Hengartner et al., 1992); das unabhängig hiervon zunächst als Onkogen

identifizierte bcl-2-Gen des Menschen (siehe unten) stellte sich sowohl hinsichtlich der Struktur als auch der anti-apoptotischen Funktion seines Genprodukts als ced-9-Homologon heraus (Vaux et al., 1992; Hengartner & Horvitz 1994a).

Über die genetische Steuerung programmierter Zelltode im Säuger ist trotz der Klonierung zahlreicher möglicherweise beteiligter Gene konkret wenig bekannt. Wahrscheinlich bilden die Ced-3- und Ced-9-homologen Proteine in Säugerzellen eine Maschinerie, die das Überleben der Zellen steuert. Gemäß einer extremen Sichtweise ist jede Zelle dazu vorbereitet, apoptotisch abzusterben, und ihr Überleben davon abhängig, daß "überlebensfaktoren" die Apoptose unterdrücken (Raff, 1992) \*. Als Überlebensfaktoren alveolärer Brustepithelzellen wurden die extrazelluläre Matrix (ECM) sowie Steroidhormone identifiziert.

So führte in Zellkulturexperimenten Kontakt normaler Brustepithelzellen zur ECM zu Zellzyklus-Arrest, zur Bildung dreidimensionaler Strukturen sowie zur Inhibition der Apoptose, die in Abwesenheit von ECM stattfand; diese Unterdrückung der Apoptose war  $\beta$ 1-Integrin-abhängig (Boudreau et al., 1995; Boudreau et al., 1996; Pullan et al., 1996). In Organkulturen von Mausbrustdrüsen löste Entzug der Hormone Prolaktin, Insulin und Hydrocortison Apoptose alveolärer Zellen aus, was diese laktogene Hormone als Überlebensfaktoren wahrscheinlich macht (Atwood et al., 1995). Allerdings erwies sich Zufuhr von Prolactin durch ins Brustdrüsengewebe implantierte Pellets als nicht effektiv, lokal während der Involution Apoptose zu unterdrücken, während Progesteron und Deoxycorticosteron, sowie (systemisch wirkend bzw. verabreicht) Dexamethason hierzu in der Lage waren (Feng et al., 1995; Lund et al., 1996). Möglicherweise geschieht die Inhibition der Apoptose durch diese Steroidhormone indirekt über die Inhibition AP-1-abhängiger Gene (Feng et al., 1995), die sonst während der Involution induziert werden (Marti et al., 1994). Da zu ihnen die Gene für Matrix-Metalloproteinasen wie Stromelysin-1 und Gelatinase A gehören, besteht hier ein Zusammenhang mit der Degradation der ECM während der Involution (Lund et al., 1996).

In der Apoptose alveolärer Brustepithelzellen während der postlaktationalen Involution der Brustdrüse spielt wahrscheinlich die Ced-3-

---

\* Mit dem zur TNF-Rezeptorfamilie gehörenden Fas-Rezeptor wurde indes auch die Eintrittspforte eines Signaltransduktionsweges identifiziert, der positiv zur Apoptose führt (Itoh et al., 1991).

homologe Cysteinprotease ICE (siehe oben) eine Rolle. ICE-mRNA wird während der Involution induziert (Boudreau et al., 1995; Lund et al., 1996); ICE-Inhibitoren konnten in einer epithelialen Brustzelllinie Apoptose verhindern, die durch Kultivierung auf Plastik induziert worden war (Boudreau et al., 1995). Zudem läßt die Hochregulierung der Gene der Bcl-2-homologen, aber pro-apoptotisch wirksamen Proteine Bax und Bcl-x<sub>s</sub> (siehe unten) auf die Beteiligung Ced-9-homologer Proteine schließen, wengleich dies experimentell noch nicht belegt worden ist (Heermeier et al., 1996).

## **1.6. Bcl-2**

### **1.6.1. Struktur und Funktion des bcl-2-Gens**

Bcl-2 ist das zuerst entdeckte und am genauesten untersuchte Mitglied einer Familie homologer Proteine, denen experimentell allen eine Rolle in der Kontrolle der Apoptose zugewiesen werden konnte. Entdeckt und kloniert wurde das bcl-2-Gen anhand der bei humanen folliculären B-Zell-Lymphomen zu über 85 % auftretenden t(14;18)(q32;q21)-Chromosomentranslokation (Yunis et al., 1982). Hierbei gerät das auf Chromosom 18 lokalisierte bcl-2-Gen unter die Kontrolle des Immunglobulin-Schwerketten-Enhancers und wird dadurch überexprimiert (Bakhshi et al., 1985; Cleary und Sklar, 1985).

Experimentelle Überexpression der bcl-2-cDNA führte allerdings nicht zur Tumorigenität einer B-lymphoblastoiden Zelllinie (Nunez et al., 1989). Dagegen hatte das Gen im Fibroblasten-Transformationsassay onkogenes Potential, ohne allerdings selbst transformierend zu wirken (Reed et al., 1989). Den Schlüssel zum Verständnis der onkogenen Wirkung des bcl-2-Gens lieferte die Entdeckung, daß es Interleukin-3-abhängigen Zellen nach Entzug des Wachstoffs überleben helfen konnte (Vaux et al., 1988). Dieser Effekt beruht auf dem Vermögen des bcl-2-Genprodukts, durch verschiedenartige Stimuli ausgelöste Apoptosen in den unterschiedlichsten zellulären Kontexten zu unterdrücken (Hockenberry et al., 1990; Zhong et al., 1993; Übersicht in Hale et al., 1996). Interessanterweise häuft sich das Auftreten von t(14;18)-Chromosomentranslokationen mit zunehmendem Lebensalter; die verlängerte Lebensspanne der entsprechenden Zellklone könnte die Anhäufung weiterer, zur Tumorigenese beitragender Mutationen ermöglichen (Liu et al., 1994).

Das *bcl-2*-Gen (Tsujimoto und Croce, 1986) des Menschen besteht aus zwei Exons\* , die durch ein mindestens 15 kb-langes Intron voneinander getrennt sind. Durch differentielles Spleißen des primären Transkripts entstehen drei mRNA-Sorten von 3,5, 5,5 und 8,5 kb Länge. Die beiden größeren Transkripte enthalten beide Exons und unterscheiden sich lediglich im 3'-nichttranslatierten Bereich des zweiten Exons infolge unterschiedlicher verwendeter Polyadenylierungsstellen. Die translatierten Bereiche der beiden zusammengespleißten Exons machen lediglich 717 bp aus. Ungewöhnlich große Sequenzen (ca. 1,4 kb am 5'-, 3,4 kb bzw. 5,4 kb am 3'-Bereich) werden also nicht translatiert und haben womöglich regulatorische Bedeutung. - Die kleinere mRNA-Species divergiert hinter der 3'-Spleißstelle des ersten Exons. Das darauf folgende Intron wird nicht herausgeschnitten, sondern im Leserahmen weiter translatiert bis zu einem Stopcodon 29 bp weiter stromabwärts. Das von diesem Transkript kodierte Bcl-2 $\beta$ -Protein divergiert somit in den 10 carboxyterminalen Aminosäuren und ist, einem Molekulargewicht von 22 kDa entsprechend, nur 205 Aminosäuren lang. Das von den beiden größeren Transkripten kodierte Bcl-2 $\alpha$ -Protein hat dagegen ein Molekulargewicht von 26 kDa und eine Länge von 239 Aminosäuren (Tsujimoto und Croce, 1986).

Beim auf Chromosom 1 lokalisierten *bcl-2*-Gen der Maus ist die Situation sehr ähnlich. Die auf analoge Weise entstehenden 2,4 kb- und 7,5 kb-Transkripte kodieren für ein 199 Aminosäuren langes Bcl-2 $\beta$ - bzw. ein 236 Aminosäuren langes Bcl-2 $\alpha$ -Protein; die Aminosäuresequenz ist zu 85 Prozent konserviert zwischen Bcl-2 $\alpha$  aus Maus und Mensch (Negrini et al., 1987).

Im Folgenden ist, falls nicht ausdrücklich angezeigt, stets von Bcl-2 $\alpha$  die Rede.

### 1.6.2. Expression von Bcl-2

Entsprechend seiner anti-apoptotischen Funktion wird Bcl-2-Expression hauptsächlich in langlebigen oder proliferierenden Zellpopulationen gefunden, wie z.B. postmitotischen Neuronen, duktalem Epithelien exokriner Drüsen, basalen Keratinocyten sowie in den unteren Anteilen der Dick- und

---

\* Inzwischen hat es sich herausgestellt, daß das erste der beiden Exons in Wirklichkeit aus zwei Exons besteht, die durch ein sehr kurzes Intron getrennt sind.

Dünndarmkrypten (Hockenberry et al., 1991; Lu et al., 1993). Darüberhinaus findet sich Bcl-2 in vielen lymphoiden Geweben, und zwar negativ korrelierend mit Bereichen hohen apoptotischen Zellumsatzes: Im Thymus beispielsweise in der Medulla, nicht jedoch in kortikalen Bereichen, in denen die positive und negative Selektion reifender Thymocyten stattfindet; zudem in vielen Bereichen von Milz und Lymphknoten sowie in peripheren Lymphocyten (Pezzella et al., 1990; Hockenberry et al., 1991). Die verbreitete Expression im Embryo sowie deren Einschränkung auf bestimmte Gewebe im Adulten, lassen vermuten, daß Bcl-2 während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Veis Novack und Korsmeyer, 1994). So wird die im embryonalen Nervensystem weitläufige Expression auf einige distinkte Regionen im Adulten beschränkt (Merry et al., 1994); ebenso ist die Expression im embryonalen Darmtrakt zunächst annähernd ubiquitär. In den Extremitätenknospen findet sich Bcl-2-Expression in den prospektiven Fingerbereichen, nicht jedoch in den später apoptotisch zugrundegehenden Zellen der interdigitalen Zonen (Veis Novack und Korsmeyer, 1994). Mehrere Studien brachten Bcl-2-Expression, z.B. in der embryonalen Niere, in Verbindung mit Morphogenese und Differenzierung (LeBrun et al., 1993, Lu et al., 1993; Nathan et al., 1994). Allerdings verläuft die Entwicklung von Mäusen, deren Bcl-2-Gene durch homologe Rekombination experimentell zerstört wurden, weitgehend normal (Veis et al., 1993; Nakayama et al., 1994; Kamada et al., 1995). Zu den pleiotropen Defekten, die diese Tiere aufweisen, gehören solche der Niere, eine verminderte Anzahl von Lymphocyten sowie Störungen im Bau der Darmmukosa; infolge vorzeitigen Absterbens von Melanocyten kommt es früh zum Grauwerden des zunächst normal gefärbten Fells. Die Tiere sterben bereits nach wenigen Wochen.

### **1.6.3. Struktur und Funktion des Bcl-2-Proteins**

#### **1.6.3.1. Lokalisation und Funktion**

Der im Bcl-2 $\beta$ -Protein fehlende carboxyterminale Bereich des Bcl-2 $\alpha$ -Proteins enthält eine Folge von 19 hydrophoben Aminosäuren, mit denen das Protein posttranslational in intrazellulären Membranen inseriert wird, und zwar (möglicherweise Zelltyp-abhängig) in der äußeren mitochondrialen Membran, dem endoplasmatischen Reticulum sowie der äußeren Kernhülle (Monaghan

et al., 1992; Nguyen et al., 1993). Der aminoternale Großteil des Proteins ragt hierbei ins Cytoplasma und erlaubt so die Interaktion mit anderen Proteinen (s.u.). Da Bcl-2 $\beta$  keine anti-apoptotische Wirkung hat, diese ihm jedoch durch Fusion einer heterologen Membraninsertionssequenz verliehen werden kann, ist die Membranlokalisation offenbar von essentieller Bedeutung für die Funktion (Tanaka et al., 1993). Entsprechend sind carboxyterminal deletierte Bcl-2 $\alpha$ -Mutanten im Cytosol lokalisiert und nur noch partiell aktiv (Alnemri et al., 1992; Hockenberry et al., 1993).

Sehr wahrscheinlich sind die verschiedenen Membrankompartimente hinsichtlich der Funktion von Bcl-2 nicht gleichwertig. Da in entkernten Zellen ausgelöste Apoptose durch Bcl-2 unterdrückt werden konnte, scheint der Zellkern weder für die Apoptose noch für die Funktion von Bcl-2 von Belang (Jacobson et al., 1994). Dirigierte man Bcl-2 durch Austausch der Membraninsertionssequenz mit äquivalenten Regionen aus im ER oder in Mitochondrien lokalisierten Membranproteinen selektiv zu diesen Kompartimenten, so führte dies zu unterschiedlichem anti-apoptotischen Potential je nach Zelltyp und auslösendem Stimulus (Zhu et al., 1996).

Besonderes Augenmerk hat indes die mitochondriale Lokalisation erfahren, da sie für das Produkt eines Protoonkogens einzigartig ist. Zudem war in einem Bcl-2-inhibierbaren in vitro-Apoptose-System die Anwesenheit einer Mitochondrien-enthaltenden Zellfraktion erforderlich (Newmeyer et al., 1994). Zwar war Bcl-2 auch in Zellen aktiv, die durch Inkubation in Ethidiumbromid ihre mitochondriale DNA verloren hatten (Jacobson et al., 1993). Allerdings enthalten diese gleichwohl Mitochondrien, die ihr Membranpotential aufrecht erhalten können (Zamzami et al., 1996). Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ist ein frühes Ereignis bei der Apoptose und kann die übrigen zellulären Veränderungen auslösen. Der Verlust kann durch Bcl-2 verhindert werden (Shimizu et al., 1996), einhergehend mit der Hemmung der Freisetzung eines pro-apoptotischen Faktors aus den Mitochondrien (Zamzami et al., 1996). Bei letzterem könnte es sich um Cytochrom c handeln, das in einer anderen Arbeit als von Mitochondrien freigesetztes, Apoptose-induzierendes Agens identifiziert werden konnte (Liu et al., 1996).

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kann zwar durch Bcl-2, nicht jedoch durch Inhibitoren ICE-ähnlicher Proteasen verhindert werden, obgleich in beiden Fällen Apoptose unterdrückt wird (Shimizu et al., 1996). Demnach läge Bcl-2 stromaufwärts von ICE-ähnlichen Proteasen in

einem möglichen, zur Apoptose führenden Signalweg. In diesem wäre der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials die Begleiterscheinung eines zur Aktivierung ICE-ähnlicher Proteasen führenden Prozesses (z.B. die Freisetzung von Cytochrom c). Konsistent hiermit ergaben unabhängige Experimente, daß Bcl-2 die Aktivierung ICE-ähnlicher Proteasen unterdrücken kann (Chinnaiyan et al., 1996; Cosulich et al., 1996). Allerdings gibt es zur Apoptose führende Signalwege, die zwar durch ICE-Inhibitoren, nicht jedoch durch Bcl-2 gestört werden können (Chinnaiyan et al., 1996). Somit gibt es mindestens zwei verschiedene Signalwege, die zur Apoptose führen, und es wäre interessant zu wissen, ob im Bcl-2-unabhängigen Mitochondrien involviert sind.

### **1.6.3.2. Interaktionen mit anderen Proteinen**

#### **(a) Bcl-2 und Signaltransduktion**

Mehrere Beobachtungen bringen Bcl-2 in Zusammenhang mit intrazellulären Signaltransduktionswegen. Erstens die Interaktion mit der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinase Raf-1 (Wang et al., 1994), zweitens die Interaktion mit der zur Ras-Familie gehörenden GTPase R-Ras (Fernandez-Sarabia und Bischoff, 1993), die selbst Raf-1-Kinaseaktivität erhöhen kann (Wang et al., 1995), sowie, drittens, die Entdeckung, daß Bcl-2 selbst phosphoryliert werden kann und dann möglicherweise seine anti-apoptotische Wirkung verliert; die hierbei beteiligte Kinase ist noch nicht identifiziert (Chen und Faller, 1995; Haldar et al., 1995; Haldar et al., 1996).

Die physikalische Interaktion zwischen Bcl-2 und der Serin/Threoninkinase Raf-1 stellt möglicherweise die mechanistische Basis des synergistischen Zusammenwirkens beider in der Apoptose-Inhibition dar. Zwar ist die katalytische Domäne von Raf-1 ausreichend zur Bindung, gleichwohl ist Bcl-2 nicht selbst Substrat der Kinase (Wang et al., 1994). Ein anderes Bcl-2-bindendes Protein, BAG-1 (Takayama et al., 1995), stellte sich inzwischen als ein auch an Raf-1-bindendes und diese Kinase aktivierendes Protein heraus (Wang et al., 1996). Möglicherweise dirigiert Bcl-2 also die Kinase Raf-1 zu spezifischen, mit der Apoptose in Zusammenhang stehenden

Substraten. Es ist aber nicht klar, inwieweit die Interaktion mit Raf-1 zur Apoptose-Inhibition notwendig ist.

Die per Hefe-Zwei-Hybrid-Klonierung gefundene und in HeLa-Zellen nachgewiesene direkte Interaktion zwischen Bcl-2 und dem GTP-bindenden Protein R-Ras (Fernandez-Sarabia und Bischoff, 1993) ist in einer neueren Studie bezweifelt worden (Wang et al., 1995). R-Ras vermochte hier zwar in verschiedenen experimentellen Systemen Apoptose zu beschleunigen, und diese Wirkung konnte durch Bcl-2-Expression aufgehoben werden. Allerdings änderte Bcl-2-Expression in Sf9-Insektenzellen weder das Verhältnis von an R-Ras gebundenem GTP zu GDP, noch die Aktivierung der Kinase Raf-1. Zudem konnten Bcl-2 und R-Ras nicht kopräzipitiert werden. Bcl-2 ist R-Ras somit sehr wahrscheinlich in einem hypothetischen zur Apoptose führenden Signaltransduktionsweg nachgeschaltet. Möglicherweise enthalten HeLa-Zellen einen Faktor, der die physikalische Interaktion beider Proteine begünstigt. Die Bedeutung dieser Interaktion für die Unterbindung der Apoptose durch Bcl-2 ist indes nicht klar.

### **(b) Die Bcl-2-Familie**

Bcl-2 bildet mit mehreren Proteinen, die in ihrer Aminosäuresequenz signifikante Homologien aufweisen, eine Proteinfamilie, die in die Kontrolle der Apoptose involviert ist (Übersicht in Hale et al., 1996). Daß zu dieser Bcl-2-Familie virale Proteine, Proteine aus Nematoden bis hin zu solchen aus Säugetieren gehören, weist auf die Konservierung des Zelltodprogramms in der Evolution hin.

Zu den homologen Proteinen, die gleich Bcl-2 eine inhibitorische Wirkung auf den apoptotischen Zelltod ausüben können, gehören Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 sowie A1 aus Säugern, das in der Wachtel vorkommende NR13, das C.elegans-Protein Ced-9 sowie die viralen Proteine BHFR1 (Epstein-Barr-Virus), E1B19k (Adenovirus), HMW5-HL (Afrikanisches Schweinepestvirus) sowie ORF16 (Herpes saimiri). Daneben gibt es Bcl-2-Homologe, die die Wirkung anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder aufzuheben vermögen bzw. selbst Apoptose induzieren können. Zu diesen "pro-apoptotischen" Proteinen, die bislang nur in Säugetieren nachgewiesen worden sind, zählen Bax, Bak, Bad und Bik, sowie die Bcl-x<sub>s</sub> genannte kürzere Spleißvariante des bcl-x-Gens, das auch für Bcl-x<sub>L</sub> kodiert. Sowohl für das bax- als auch für das



bcl-x-Gen wurden darüberhinaus weitere Spleißvarianten beschrieben, deren Bedeutung nicht bekannt ist.

Die Homologien in der Aminosäuresequenz konzentrieren sich ganz besonders auf drei Bereiche, die als Bcl-2-Homologie-Regionen bezeichnet werden (BH-Regionen; eine Übersicht gibt die Diskussion in Gibson et al., 1996). BH1 und BH2 (gelegentlich auch als S2 bzw. S3 bezeichnet) sind Blöcke von 19 oder 20 Aminosäuren Länge, die zwischen den pro- und den anti-apoptotischen Bcl-2-Homologen konserviert sind (auch ihr Abstand von 32 bzw. 33 Aminosäuren ist konserviert); sie fehlen dem pro-apoptotischen Bcl-x<sub>S</sub>-Protein. Dieses hat mit den anderen pro-apoptotischen Bcl-2-homologen Proteinen dagegen die nur acht Aminosäuren lange BH3-Region gemein; die entsprechenden BH3-Regionen der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder weichen hiervon an 2 Positionen ab. Noch ein weiterer Unterschied besteht am aminoterminalen Bereich. Hier ist zwischen den anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern ein S3 genannter Block von 22 Aminosäuren konserviert, der den pro-apoptotischen Mitgliedern fehlt. Beide Klassen von Bcl-2-homologen Proteinen weisen eine in der genauen Aminosäuresequenz nicht konservierte carboxyterminale Folge hydrophober Aminosäuren auf, die vermutlich der Insertion in Membranen dient; sowohl für Bcl-x<sub>L</sub> als auch für Mcl-1 ist eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen worden (Gonzalez-Garcia et al., 1994, Yang et al., 1995b).

Die Konservierung der genannten Bereiche läßt vermuten, daß diese für die Funktion der Bcl-2-Familienmitglieder von Bedeutung sind. NMR- und Röntgenstrukturanalyse von Bcl-x<sub>L</sub> ergaben, daß die BH1-, BH2- und BH3-Regionen eng beieinander liegen und eine längliche hydrophobe Spalte ausbilden; zudem ähnelt Bcl-x<sub>L</sub> in seiner Raumstruktur der Membrantranslokationsdomäne von Diphtheriatoxin, von der man annimmt, daß sie dimerisiert und so eine pH-abhängige Membranpore ausbildet (Muchmore et al., 1996). Tatsächlich wurde sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-System als auch durch Kopräzipitationsexperimente selektive Homo- und Heterodimerisierung bestimmter Bcl-2-Familienmitglieder nachgewiesen. Bax vermag beispielsweise sowohl Homodimere zu bilden als auch mit Bcl-2 zu heterodimerisieren; die BH1- und BH2-Regionen sind hierfür essentiell (Oltvai et al., 1993; Yin et al., 1994). Für die Interaktion zwischen Bak und Bcl-x<sub>L</sub> ist dagegen die BH3-Region entscheidend (Chittenden et al., 1995b). In diesen Experimenten wurde zudem gefunden, daß die selben Regionen, von denen die Dimerisierung kritisch abhängt, auch für die Steuerung der Apoptose durch

Bcl-2 bzw. Bak entscheidend sind. Mutationen in BH1 bzw. BH2 von Bcl-2 bzw. in BH3 von Bak, die die Heterodimerisierung verhinderten, hoben auch die anti- bzw. pro-apoptotische Wirkung des jeweiligen Proteins auf.

Diese selektive Dimerisierung bildet somit wahrscheinlich die molekulare Basis für die antagonistische Wirkung der pro- und anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2-homologen Proteine. Beispielsweise kann die Apoptose-supprimierende Wirkung von Bcl-2 in Il-3-abhängigen Zellen nach Il-3-Entzug durch gleichzeitige Bax-Expression aufgehoben werden (Oltvai et al., 1993). Ebenso gibt es einen funktionalen Antagonismus zwischen Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-x<sub>S</sub> (Boise et al., 1993) sowie zwischen Bak und Bcl-2 (Chittenden et al., 1995a; Kiefer et al., 1995). Das Bcl-2-homologe Protein Bad kann durch Bindung an Bcl-x<sub>L</sub> Bax aus dem Bax-Bcl-x<sub>L</sub>-Heterodimer verdrängen und dabei die Apoptose beschleunigen (Yang et al., 1995a).

Demzufolge würden Bax-Bax-Homodimere dominant pro-apoptotisch wirken und müßten zur Apoptose-Inhibition durch Bcl-2 kompetitiv gespalten werden. Für solch ein Modell spricht die Existenz von mutanten Formen von Bcl-2, die zwar noch die homodimerisieren, allerdings nicht mehr mit Bax interagieren konnten; sie hatten ihre protektive Wirkung eingebüßt (Yin et al., 1994). Weiterhin war es nicht möglich, Bax in Hefen zu exprimieren, wahrscheinlich aufgrund eines lethalen Effekts (Sato et al., 1994).

Diesem einfachen Modell, wonach Homodimere pro-apoptotischer Bcl-2-homologer Proteine die dominant wirkenden Signalgeber wären und durch kompetitive Heterodimerisierung mit anti-apoptotisch wirkenden Homologen gespalten werden könnten, widerspricht allerdings, daß mutante Formen von Bcl-x<sub>L</sub> gefunden wurden, die weder Bax noch Bak (und wahrscheinlich auch keine weiteren Bcl-2-Homologen) binden konnten, gleichwohl aber Apoptose zu inhibieren vermochten (Cheng et al., 1996). Interaktion mit Bax-/Bak-artigen Homologen und anti-apoptotischer Effekt wurden hier also klar separiert. Dies könnte bedeuten, daß Bcl-x<sub>L</sub> einen dominanten protektiven Effekt ausübt; Bax oder Bak würden in diesem Modell Bcl-x<sub>L</sub> in dieser anti-apoptotische Wirkung bloß blockieren.

## 1.7. Onkogene modulieren die Apoptose

Bcl-2 ist unter den Proto-Onkogenen keineswegs das einzige, das Einfluß auf die Apoptose nimmt; für eine Vielzahl weiterer Proto-Onkogene hat sich

mittlerweile herausgestellt, daß sie Apoptose zu modulieren vermögen (übersicht in Hale et al., 1996). Beispielsweise führte Überexpression von c-Myc in Rat-1-Fibroblasten zur Apoptose, wenn die Zellen in niedrigen Serumkonzentrationen kultiviert wurden (Evan et al., 1992). Stimulation der Zellproliferation und Induktion von Apoptose sind hierbei zwei klar separierbare Wirkungen der c-Myc-Expression (Rudolph et al., 1996). Die c-Myc-induzierte Apoptose ist abhängig von der Gegenwart des Tumor-Suppressor-Gens p53 (Hermeking & Eick, 1994). Das p53-Protein, das in einer Vielzahl von Tumoren mutiert ist, erwies sich neben seiner die Zellproliferation hemmenden Wirkung als potenter Induktor von Apoptose; auch hier sind Einfluß auf den Zellzyklus und Induktion von Apoptose zwei separierbare Eigenschaften (Chen et al., 1996b; Rowen et al., 1996).

Diese Befunde führen zu einem Modell der Tumorentstehung, wonach die "Entartung" einer Zelle im Normalfall zur Aktivierung eines intrinsischen Zell-Suizid-Programms, also zur Deletion der veränderten Zelle durch Apoptose führt. Erst wenn gleichzeitig (oder zuvor) das Apoptose-Programm gestört wird, z. B. durch Mutation bzw. Verlust von p53 oder durch die Expression anti-apoptotisch wirksamer Proteine wie Bcl-2, kann es zur Tumorentstehung kommen.

Gestützt wird diese Hypothese dadurch, daß Bcl-2-(Über-)Expression sich nicht auf Tumore des lymphoiden Systems beschränkt, sondern auch in verschiedenen epithelialen Tumoren des Menschen gefunden wurde. Hierzu gehören beispielsweise Androgen-unabhängige Prostata-Karzinome (McDonnel et al., 1992; Colombel et al., 1993), Ovarial-Karzinome (Eliopoulos et al., 1995), Lungen-Karzinome (Jiang et al., 1995), Neuroblastome (Castle et al., 1993), Brustkarzinome, Karzinome des Gastrointestinaltraktes sowie verschiedene Haut-Karzinome (siehe unten).

In **Brusttumoren** korreliert die Bcl-2-Expression mit dem Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus und, entsprechend, mit gutem Ansprechen auf Hormontherapien (Gee et al., 1994; Leek et al., 1994; Sierra et al., 1995). Da Hormontherapien Apoptose der Brusttumorzellen auslösen, scheint dieser Befund hinsichtlich des anti-apoptotischen Potentials von Bcl-2 paradox. Allerdings lassen in vitro-Experimente darauf schließen, daß bcl-2 möglicherweise ein Östrogen-reguliertes Gen ist: Östradiol-Behandlung der MCF-7-Mammakarzinom-Zelllinie führte gleichzeitig zur Induktion von Bcl-2 sowie zu gesteigerter Resistenz gegen Tamoxifen-induzierte Apoptose (Wang und Phang, 1995). Zwischen der Bcl-2-Expression früher Tumorstadien sowie

deren Metastasierung zu regionalen Lymphknoten wurde eine positive Korrelation gefunden und mit einem kleineren apoptotischen Index in Verbindung gebracht (Sierra et al., 1995). Bcl-2 korreliert in den genannten Studien negativ mit Markern schlechter Prognose bzw. später Tumorstadien (EGF-Rezeptor, p53; vgl. Leek et al., 1994). Diese Studien legen somit den Schluß nahe, Bcl-2 könne eine Rolle spielen in der Tumor-Initiation oder in der frühen Progression.

Bei **Kolon-Tumoren** wurde in allen Progressionsstadien Bcl-2-Expression gefunden (Hague et al., 1994; Bronner et al., 1995; Sinicrope et al., 1995). Diese korreliert invers mit p53 sowie in situ-detektiertem apoptotischen Index (Sinicrope et al., 1995). Dagegen ergab eine neuere Arbeit einen Verlust der Bcl-2-Expression in Tumoren größeren Durchmessers, einhergehend mit schlechterer Prognose (Öfner et al., 1995). Auch bei Kolon-Tumoren könnte Bcl-2 somit bereits während der Frühphase der Tumorentstehung eine Rolle spielen.

Unter den Nicht-Melanom-**Hautkrebsen** weisen Basalzell-Karzinome starke Bcl-2-Expression auf, wohingegen Tumore verhornten Zelltyps (squamous cell carcinomas) nur selten Bcl-2 exprimieren (Nakagawa et al., 1994; Moralesducret et al., 1995; Rodriguezvillanueva et al., 1995; Verhaegh et al., 1995). Dies würde der Bcl-2-Expression derjenigen Zellen entsprechen, aus denen diese Tumore möglicherweise hervorgehen: mit zunehmender Differenzierung (Verhornung) suprabasaler Hautschichten geht die ursprünglich in der basalen Keratinocyten-Zellschicht vorhandene Bcl-2-Expression verloren.

## 1.8. Fragestellung

Gegenwärtig ist nicht bekannt, welche Rolle der Expression von Bcl-2 in den genannten Tumorarten epithelialer Herkunft zukommt. Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, daß Bcl-2 über die Inhibition der Apoptose die Tumorbildung begünstigen könnte. Daher sollten transgene Mäuse hergestellt werden, die Bcl-2 (a) in der Brustdrüse, (b) u.A. im Darmtrakt sowie (c) in der Haut überexprimieren und somit gestatten, den Einfluß von Bcl-2 auf die Tumorentstehung in diesen Geweben zu untersuchen. Den Schwerpunkt bildet hierbei die brustdrüsenspezifische Überexpression von Bcl-2, deren Konsequenzen auf die während der postlaktationalen Involution und

durch verschiedene Transgene induzierte Apoptose alveolärer Brustepithelzellen sowie auf die c-Myc-induzierte Mammakarzinogenese studiert wurden. Darüberhinaus werden Pilotexperimente dargestellt, die das Potential der erzeugten transgenen Mäuse hinsichtlich des Studiums der funktionellen Signifikanz der Bcl-2-Expression für die experimentell induzierte Tumorbildung in Haut und Darmtrakt illustrieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Bezugsquellen

Allgemein gebräuchliche Chemikalien	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Sigma, München
Alkalische Phosphatase (CIP)	Böhringer, Mannheim
Ampicillin	Sigma, München
AMV Reverse Transkriptase	Promega Biotec, Heidelberg
Apoptag Kit	Oncor, Gaithersburg (bezogen über Appligen, Heidelberg)
APS	Appligen, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienschalen	Greiner, Nürtingen
Blaukappengefäße (15 und 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Desoxynucleosidtriphosphate	Pharmacia, Freiburg Boehringer, Mannheim
DMEM	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Gibco, Eggenstein
Hybond N <sup>+</sup> -Membranen	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm <sup>TM</sup> Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig
Klenow Enzym	Promega Biotec, Heidelberg
Lachssperma-DNA	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	BioRad, München
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
α- <sup>32</sup> P-dCTP (370 MBequerel/ml)	Amersham, Braunschweig
Polyacrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Qiagen tip 500	Diagen, Düsseldorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rediprime-Kit	Amersham, Braunschweig

Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim Biolabs, Frankfurt Pharmacia, Freiburg USB/ Amersham, Braunschweig Promega Biotec, Heidelberg
RNase A (Rinderpankreas)	Sigma, München
Seakem LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Sephadex g50	Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Promega Biotec, Heidelberg
T4-Polynukleotidkinase	USB/Amersham Braunschweig
Taq Polymerase	Pharmacia, Freiburg
TEMED	BioRad, München
Whatmann 3MM Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen

### 2.1.2. Tiere und Bezugsquellen:

B6D2F1-Hybride	Charles River, Sulzfeld
DBA/2	Charles River, Sulzfeld
NMRI	Charles River, Sulzfeld
C57Bl6 min/+	Jackson Laboratory, Bar Harbor
MMTVmyc (FVB/N)	Charles River, Sulzfeld
WAPTGF- $\beta$ (FVB/N)	freundlicherweise von L. Hennighausen (NIH, Bethesda) zur Verfügung gestellt
WAPp53	freundlicherweise von Dr. J. Rosen (Baylor College of Medicine, Houston, Texas) zur Verfügung gestellt

### 2.1.3. Bakterienstämme

E.coli K12/DH5 $\alpha$  F<sup>-</sup>; endA1; hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), supE44; thi-1;l<sup>-</sup>; recA1;  
gyrA96; relA1

### 2.1.4. Plasmide

pGEM-7	Kloniervektor (Promega Biotec, Heidelberg)
pBSWAP	enthält das 7,2 kb-EcoR I-Fragment des Maus-WAP-Gens (Burdon et al., 1991; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L. Hennighausen, NIH, Bethesda, USA)
Bcl-2/PURO	retroviraler Expressionsvektor, der die bcl-2 $\alpha$ -cDNA einkloniert in die EcoR I-Stelle des Polylinkers enthält (Fanidi et al., 1992; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G. I. Evan, ICRF, London)

### 2.1.5. Antikörper

124	monoklonaler Maus-IgG-Antikörper, gegen humanes Bcl-2 gerichtet (Pezzella et al., 1990; Genosys Biotech., Cambridge, bezogen über IC Chemikalien, Ismaning)
N-19	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen ein Peptid, das Aminosäuren 4 bis 21 des humanen Bcl-2 entspricht. Diese Sequenz ist zwischen Bcl-2 aus Maus und Mensch konserviert (Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, California)
Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment gerichtet (Dianova, Hamburg)	
Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)	

### 2.1.6. Oligonukleotide

Myc 1: 5' CCC AAG GCT TAA GTA AGT TTT TGG 3'

Myc 2: 5' GGG CAT AAG CAC AGA TAA AAC ACT 3'

Diese Primer-Kombination amplifiziert ein 825 bp-Fragment des MMTVmyc-Transgens (Angaben der Firma Charles River).

bcl-s: 5' ACT TGT GGC CCA GAT AGG CAC CCA G 3'

bcl-as: 5' CGA CTT CGC CGA GAT GTC CAG CCA G 3'

Diese Primer-Kombination ist beschrieben in Wang und Phang (1995); sie amplifiziert ein 381 bp-Fragment der humanen bcl-2-cDNA.



WAPforw: 5' CCG TCG ACG GCC ACA GTG AAG ACC TCC GGC CAG 3'

p53rev: 5' GCC TGA AAA TGT CTC CTG GCT CAG AGG G 3'

Diese Primerkombination dient zum Nachweis des WAP-p53-Transgens und amplifiziert ein 1,2 kb-Fragment (Prof. J. Rosen, Baylor College of Medicine, University of Texas, persönliche Mitteilung)

MAPC-MT: 5' TGA GAA AGA CAG AAG TTA 3'

MAPC 15: 5' TTC CAC TTT GGC ATA AGG C 3'

MAPC 9: 5' GCC ATC CCT TCA CGT TAG 3'

Diese Primer-Kombinationen zur Amplifikation des Min- bzw. des Wildtyp-Allels des murinen APC-Gens ist in Dietrich et al. (1993) angegeben.

8R: 5' ACA GCC AGG AGA AAT CAA AC 3'

6F: 5' GTC GCT ACC GTC GTG ACT TC 3'

Diese Primer-Kombination zur spezifischen Amplifikation via RT-PCR des Maus-bcl-2 $\alpha$ -Transcripts ist Abe-Dohmae et al. (1993) entnommen.

AD-s: 5' AAT TCG CGG CCG C 3'

AD-as: 5' GCG GCC GCG 3'

Nach Mischen in äquimolaren Konzentrationen, 10minütiger Inkubation bei 65 °C und schließlich langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur bilden beide Oligonukleotide zusammen einen EcoR I/Not I-Adaptor.

### 2.1.7. Lösungen

Ampicillin-Platten: 15 g Bacto-Agar wurden in 1 Liter TY-Medium autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50 °C wurde Ampicillin ad 100  $\mu$ g/ml zugesetzt. 10 ml hiervon wurden in eine 10 cm-Petrischale gegossen.

BBS 50 mM BES (N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,96

100xDenhardts-Lsg.: 2 % BSA, 2 % Ficoll, 2 % Polyvinylpyrrolidon

Formamid-Denaturierungspuffer: 35 µl 37 % (v/v) Formaldehyd, 54 µl Wasser, 1 µl (0,5 µg/ml) Ethidiumbromid, 10 µl 20 x MOPS, 100 µl rekristallisiertes Formamid.

GTE-Mix 50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA

Hybridisierungslösung: 6xSSC, 5xDenhardts-Lösung, 0,5 % SDS, 250 µg/ml Lachssperma-DNA, 10 Minuten 100°C, dann auf Eis

20xMOPS-Puffer: 400 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure (MOPS), 100mM NaAcetat, 10 mM EDTA, pH7

PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Probenpuffer: 8 % Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 5 % Triton X100

20xSSC 175.3 g/l NaCl, 88.2 g/l NaCitrat, pH7.0

STE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA

TE 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0

Tissue-Guanidinium-Lösung: 590,8 g Guanidiniumisothiocyanat wurden in 400 ml Wasser und 25 ml 2 M Tris-HCl (pH 7,5) sowie 20 ml 0,5 M EDTA gelöst, mit 3 M Na-Acetat (pH 4,8) auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt und nach Hinzufügen von 50 ml β-Mercaptoethanol auf ein Volumen von 1 Liter gebracht.

TY-Medium: 10 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, 2 NaOH-Plätzchen ad 1 Liter

TY-Amp-Medium: TY-Medium + Ampicillin ad 100 µg/ml

Western-Blotting-Puffer: 29 g Tris Base, 145 g Glycin, 5 g SDS, 1 l Methanol ad 5 l Wasser.

### 2.1.8. DNA-Sonden

Die Maus-SGP-2-cDNA- und Maus-WAP-cDNA-Sonden wurden freundlicherweise von Dr. A.-C. Andres (AKEF, Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. TGF- $\beta$ 1- und  $\beta$ -Casein-Sonden: zur Verfügung gestellt von Dr. A. Cato (Igen, Forschungszentrum Karlsruhe). p53-Sonde: von Dr. B. Baumann (damals noch Igen, Forschungszentrum Karlsruhe) erhalten. GAPDH: GAPDH-cDNA aus Maus. bcl-2-Sonde: EcoR I-Fragment der humanen bcl-2 $\alpha$ -cDNA aus PURO/bcl-2 (Fanidi et al., 1993; von Dr. G.I.Evan [ICRF, London] zur Verfügung gestellt).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Klonierung von DNA

#### 2.2.1.1. Konstruktion der Plasmide pSVWAP-bcl-2, ubi-bcl-2 und iv-bcl-2

In allen 3 Plasmiden wurde die bcl-2 $\alpha$ -cDNA als 1 kb-langes EcoR 1-Fragment verwendet, das zuvor aus dem Plasmid Bcl-2/PURO (Fanidi et al., 1992) durch EcoR 1-Verdau isoliert worden war.

**pSVWAP-bcl-2.** - Die überstehenden Enden des bcl-2 $\alpha$ -cDNA-EcoR 1-Fragments wurden aufgefüllt und Asp 718-Linker anligiert. Das entstandene Asp 718-Fragment wurde nach Asp 718-Verdau und Dephosphorylierung des Plasmids pBSWAP (Burdon et al., 1991) in dessen einzige Asp 718-Restriktionsstelle ligiert. Durch Bgl II-Verdau wurde ein 4,5 kb-Fragment isoliert, das 1,6 kb des WAP-Promoters, die in Exon 1 des Maus-WAP-Gens inserierte bcl-2 $\alpha$ -cDNA sowie die Exons 2 und 3 des Maus-WAP-Gens enthält. Dieses Fragment wurde in den mit dem Restriktionsenzym Bgl II geöffneten und dephosphorylierten Vektor pSVT7 $\Delta$ Eco ligiert. Das Plasmid pSVT7 $\Delta$ Eco war aus pSVT7 (Günthert et al., 1991) durch Deletion eines Teils des Polylinkers durch EcoR-1-Restriktion und Religation entstanden. Auf diese Weise folgt 3'-wärts hinter dem 3. Exon des WAP-Gens die SV40-Groß-T-Polyadenylierungssequenz. Im so entstandenen Plasmid pSVWAP-bcl-2 ist das

gesamte für die Mikroinjektionen verwendete Fragment, das 1,6 kb des WAP-Promoters, die in Exon 1 des Maus-WAP-Gens inserierte *bcl-2* $\alpha$ -cDNA, sowie die Exons 2 und 3 des Maus-WAP-Gens gefolgt von der Polyadenylierungssequenz aus SV40, von SSP-I-Restriktionsstellen flankiert und kann somit durch SSP-I-Verdau isoliert werden.

**ubi-*bcl-2*.** - Das EcoR I-*bcl-2* $\alpha$ -cDNA-Fragment wurde in die EcoR 1-Schnittstelle im Polylinker des Vektors pGEM-7 nach dessen Öffnung durch EcoR I-Verdau und anschließende Dephosphorylierung ligiert. Zuvor war die Kpn I-Schnittstelle in pGEM-7 durch Restriktion mit dem Enzym Asp 718, Auffüllen der überstehenden Enden und Religation zerstört worden. Auf diese Weise wurde die *bcl-2* $\alpha$ -cDNA mit vom pGEM-7-Polylinker herrührenden Xho I- und Hind III-Schnittstellen versehen und konnte als Xho I-/Hind III-Fragment in das mit den gleichen Enzymen geöffnete Plasmid Ubi-junB (Schorpp et al., 1996) ligiert werden. Im so entstandenen Plasmid ubi-*bcl-2* wird die Anordnung Ubiquitin-Promotor, *bcl-2* $\alpha$ -cDNA, 3'-nichttranslatiertes Teil aus der *c-jun*-cDNA sowie Spleiß- und Polyadenylierungsstelle aus SV40 von einer Bgl II- (am 5'-Ende) bzw. einer Kpn I-Schnittstelle (am 3'-Ende) flankiert und kann mit diesen beiden Restriktionsenzymen isoliert werden.

**iv-*bcl-2*.** - An das EcoR I-*bcl-2* $\alpha$ -cDNA-Fragment wurden EcoR I/Not I-Adaptoren ligiert. Durch Not I-Verdau wurde das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen aus dem Plasmid pH3700-pL2 (Abbildung 1A in Carroll et al., 1993) herausgeschnitten. Nach Dephosphorylierung des verbliebenen Plasmids wurde die *bcl-2* $\alpha$ -cDNA als Not I-Fragment einligiert. Die so konstruierte Anordnung Involucrin-Promoter (und Intron), SV40-Spleißstelle, *bcl-2* $\alpha$ -cDNA und schließlich SV40-Polyadenylierungsstelle wird von Sal I-Schnittstellen flankiert und kann somit durch Sal I-Verdau isoliert werden.

### **2.2.1.2. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren aus Protein-haltigen Lösungen**

Zur Entfernung von Proteinen wurden Nukleinsäuren in ihrer wäßrigen Lösung mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und 5 Minuten bei 10 000  $\times$  g zentrifugiert. Proteine sammeln sich in der Interphase zwischen den beiden sich ausbildenden Phasen. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und abermals zentrifugiert. Aus der sich ausbildenden oberen, wäßrigen Phase wurden die Nukleinsäuren schließlich Ethanol-präzipitiert.

### **2.2.1.3. Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren**

DNA wurde aus ihrer wäßrigen Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat, pH 4,8 sowie des doppelten (im Falle von RNA des zweieinhalbfachen) Volumens Ethanol durch 15minütige Inkubation im Ethanol/Trockeneisbad gefällt, durch Zentrifugation (5 bis 30 Minuten bei 10 000 x g) pelletiert und schließlich durch Zugabe und Absaugen von 80 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das feuchte Pellet wurde anschließend im Eksikkator oder in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac) getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

### **2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in ihren Lösungen wurde spektralphotometrisch über die OD bei 260 nm ermittelt. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA bzw. von 40 µg/ml für RNA.

### **2.2.1.5. Herstellung kompetenter E. coli**

200 ml TY wurden mit 500 µl einer Übernachtskultur von E. coli DH5α angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 geschüttelt. Nach 10minütiger Inkubation bei 0 °C wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000 x g, 10 Minuten, 0 °C) und in 200 ml eiskaltem (0 °C) 100 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 40 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> vorsichtig resuspendiert und 30 Minuten auf Eis (0 °C) inkubiert, ehe sie erneut zentrifugiert (5 Minuten) und in einer eiskalten Mischung von 24 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 8 ml Glycerin vorsichtig resuspendiert wurden. 450 µl-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt.

### **2.2.1.6. Transformation kompetenter E. coli**

200 µl kompetenter E. coli wurden bei 0 °C mit 5 µl des Ligationsansatzes (oder 5 ng Plasmid-DNA) sehr vorsichtig gemischt und 45 Minuten bei 0 °C (Eiswasser) inkubiert. Dann wurde für 3 Minuten bei 37 °C, dann für 3

Minuten bei 0 °C inkubiert, ehe die Bakterien abzentrifugiert (3 Minuten bei 1000 x g und 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes in 450 µl TY sehr vorsichtig resuspendiert wurden. Nach 45-minütigem Schütteln wurden die Bakterien auf Amp-Platten ausplattiert.

#### **2.2.1.7. Plasmidpräparation im kleinen Maßstab ("Minipräp")**

1,5 ml einer 2 ml-E. coli-Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfröhrchen überführt und für 20 Sekunden bei 10 000 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Bakterien in 150 µl GTE-Mix mit der Pipette resuspendiert und durch kräftiges Zupipettieren von 300 µl 0,2 M NaOH/ 1% (w/v) SDS lysiert. Die Lösung wurde neutralisiert und das SDS ausgefällt durch Zumischen von 150 µl 2,55 M K-Acetat pH 4,8. Nach Pelletieren durch fünfminütige Zentrifugation (10 000 x g) wurden 500 µl des Überstandes mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und abermals zentrifugiert. Schließlich wurden die Nukleinsäuren in der wäßrigen Phase Ethanol-präzipitiert.

#### **2.2.1.8. Plasmidpräparation im großen Maßstab ("Maxipräp", Qiagen-Methode)**

200 ml TY-Amp wurden mit einer Bakterien-Kolonie angeimpft und 15 Stunden im Warmluftschüttler bei 37 °C wachsen gelassen. Plasmid-DNA wurde zunächst durch alkalische Lyse der Bakterien präpariert. Hierzu wurden diese durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend in 10 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Diese Suspension wurde mit RNaseA ad 100 µg/ml versetzt. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 10 ml 0,2 M NaOH/1% SDS unter vorsichtigem Schwenken lysiert. Neutralisation des Lysats sowie Fällung des SDS erfolgte durch Zumischen von 10 ml 2,55 M K-Acetat, pH 4,8. Aus dem nach Zentrifugation (3000 x g) gewonnenen Überstand wurde die Plasmid-DNA säulenchromatographisch mittels Qiagen-Säulen gemäß dem Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

### **2.2.1.9. Analytischer und präparativer Verdau von Plasmid-DNA**

Für analytische Zwecke wurden 5  $\mu\text{l}$  von Minipräp-DNA oder ca. 1  $\mu\text{g}$  von Maxipräp-DNA für 3 Stunden bei 37 °C in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  mit 5 bis 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym im entsprechenden Reaktionspuffer inkubiert. Beim präparativen Verdau wurden 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einem Volumen von 70  $\mu\text{l}$  mit 50 U des jeweiligen Restriktionsenzym im entsprechenden Reaktionspuffer übernacht bei 37 °C inkubiert.

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

Zur Auftrennung von DNA-Gemischen sowie zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gele verwendet. Die Agarose-Konzentration betrug 1%. Hierzu wurde Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst und nach Abkühlen auf 60°C Ethidiumbromid zugesetzt (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Den Proben wurde 1/10 des Volumens Probenpuffer zugefügt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Auftrennung erfolgte bei Feldstärken um 7 V/cm. Die Detektion der DNA-Fragmente im Gel erfolgte durch Fluoreszenz im UV-Licht (320 nm).

### **2.2.1.11. Elektroelution von DNA-Fragmenten**

Das das interessierende DNA-Fragment enthaltende Gelstück wurde ausgeschnitten und in einen mit 400  $\mu\text{l}$  TE gefüllten Dialyse-Schlauch überführt. Das Gelstück wurde an eine Schlauchseite geschoben und der beidseitig verschlossene Schlauch so in einer mit TAE-Puffer gefüllten Gelkammer plziert, daß die DNA elektrophoretisch aus dem Gelstück heraus wandern konnte (ca. 60 Minuten bei 7 V/cm). Nach einminütiger Umkehrung der Polungsrichtung wurde die DNA-haltige Lösung aus dem Schlauch herauspipettiert, Phenol-/Chloroform-extrahiert und Ethanol-präzipitiert.

### **2.2.1.12. Kinasierung und Ligation von Adaptoren**

1  $\mu\text{l}$  T4-Polynukleotid-Kinase (30 U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  10 x Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM  $\text{MgCl}_2$  und 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), 1  $\mu\text{l}$  10 mM ATP wurden mit 7  $\mu\text{l}$  EcoR I/Not I-Adaptor-DNA (1 nM/ $\mu\text{l}$ ) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$

nach Zufügen von 1  $\mu$ l 10 x Ligase-Puffer (300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP) und 2  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (3 U/ $\mu$ l) an 200 bis 300 ng durch EcoR I-Verdau linearisierte DNA ligiert. Vor der Weiterverwendung des mit den Adaptoren versehenen DNA-Fragments wurde der Ansatz Ethanol-gefällt und die DNA mit dem Enzym Not I verdaut. Das Fragment wurde schließlich über ein Agarose-Gel gereinigt.

#### **2.2.1.13. Ligation von Linkern an DNA**

Zunächst erfolgte Phosphorylierung von 1  $\mu$ g (ca. 300 pmol) Asp 718-Linker-DNA durch 5 U T4-Polynukleotid-Kinase in Gegenwart von 0,5 mM ATP und 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in einem Volumen von 10  $\mu$ l durch einstündige Inkubation bei 37 °C. 2  $\mu$ l dieses Ansatzes wurden zum trockenen Präzipitat von DNA, deren überhängende Enden zuvor aufgefüllt worden waren, gegeben und in einem Volumen von 10  $\mu$ l in Gegenwart von Ligase-Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP) und 1 U T4-DNA-Ligase übernacht bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationsreaktion wurde durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C abgestoppt. Die überzählig anligierten Linker wurden schließlich durch Asp 718-Verdau entfernt und das resultierende DNA-Fragment über ein Gel aufgereinigt.

#### **2.2.1.14. Dephosphorylieren von 5'-Überhängen mit CIP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)**

Linearisierte, über ein Agarose-Gel gereinigte und elektroeluierte DNA wurde mit 5  $\mu$ l CIP-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 9,3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin) und 2  $\mu$ l CIP (1 U/ $\mu$ l) in einem Volumen von 50  $\mu$ l zweimal für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, zwischendurch wurden nochmals 2  $\mu$ l CIP hinzugemischt. Die Reaktion wurde beendet durch Zumischen von 40  $\mu$ l Wasser, 10  $\mu$ l 10 x STE und 2,5  $\mu$ l 20% (w/v) SDS und 20-minütige Inkubation bei 75 °C. Nach anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation wurde die DNA in 11  $\mu$ l Wasser aufgenommen.



### **2.2.1.15. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Insgesamt etwa 500 ng Insert-DNA und linearisierte, gegebenenfalls dephosphorylierte Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3 zu 1 wurden in einem 20 µl Volumen Ligase-Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 2 µl T4-DNA-Ligase (3U/µl) für 15 Stunden bei 15 °C inkubiert.

## **2.2.2. Test der Konstrukte in vitro**

### **2.2.2.1. Transfektion von 3T3-Zellen**

24 Stunden vor der Transfektion wurden 3T3-Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 10 cm-Gewebekulturschale ausplattiert und in 10 ml DMEM/10 % FCS bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. 20 µg ubi-bcl-2-Plasmid-DNA und 1 µg pBabePuro-Vektor-DNA wurden mit 0,5 ml 0,25 M CaCl<sub>2</sub> und 0,5 ml BBS gemischt und nach 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur tropfenweise auf die Zellen gegeben unter leichtem Schwenken der Schale. Die Zellen wurden weitere 20 Stunden bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Schließlich wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in Medium weiterkultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen trypsiniert, auf 1 : 10 verdünnt und in Selektionsmedium (Medium mit 1,5 µg/ml Puromycin), das im Abstand von 2 Tagen erneuert wurde, weiterkultiviert. Die nach 14 Tagen erkennbaren Klone einer Schale wurden zusammengefaßt und ein Proteinextrakt daraus hergestellt (vgl xx).

### **2.2.2.2. Transfektion von PAM-212-Zellen**

PAM-212-Zellen wurden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  pro 10 cm-Gewebekulturschale ausplattiert und in 10 ml DMEM/ 10 % FCS für 20 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde ersetzt durch 3 ml Medium, das 20 µg iv-bcl-2-Plasmid-DNA und 30 µg Polybren enthielt. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 6 Stunden inkubiert, wobei die Schale alle 90 Minuten vorsichtig geschwenkt wurde. Schließlich wurde das Medium durch 5 ml 20 % (v/v) DMSO in Medium ersetzt. Nach 4 Minuten wurden die Zellen in Medium ohne Serum gewaschen und schließlich in serumhaltigem

Medium weiterkultiviert. Nach 48 Stunden wurde aus den Zellen ein Proteinextrakt hergestellt (vgl. xx).

### **2.2.2.3. Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Keratinocyten (bzw. aus transfizierten 3T3- oder PAM-212-Zellen)**

Menschliche Keratinocyten (erhalten von Dr. J. Simon, Universitäts-Hautklinik, Freiburg) wurden in serumfreien Keratinocyten-Medium (Gibco) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 10 ml PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und per Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei  $500 \times g$  und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 100  $\mu$ l Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 6,8/6,7 % SDS) aufgenommen und im Eisbad  $3 \times 10$  Sekunden Ultraschall-behandelt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei  $1500 \times g$  wurde der Überstand in ein Eppendorfgesäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden 20  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer (5-fach konzentriert) beigemischt.

### **2.2.3. Herstellung und Analyse transgener Mäuse**

#### **2.2.3.1. Vorbereiten der DNA für die Mikroinjektionen**

Die zu injizierende DNA wurde durch Restriktionsverdau von Vektorsequenzen befreit, über ein Agarose-Gel gereinigt und in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA in einer Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l aufgenommen. Schließlich wurde die Lösung über ein 0,22  $\mu$ m-Sterilfilter ("MILLEX-GV<sub>4</sub>", Millipore, Bedford) filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### **2.2.3.2. Superovulation zur Gewinnung hoher Zahlen befruchteter Oocyten**

Durch i.p.-Injektion von je 10 IU PMSG ("pregnant mare serum gonadotropin", Sigma, München) bzw. HCG (Humanes Chorion-Gonadotropin, Sigma, München) in jeweils 200  $\mu$ l PBS im Abstand von 48 Stunden jeweils 8 Stunden vor Beginn der Nachtphase wurden 5 Wochen alte B6D2F1-Weibchen superovuliert und in der folgenden Nacht mit DBA/2-Männchen verpaart (3 Stunden vor Beginn der Nachtphase).

### **2.2.3.3. Isolierung, Mikroinjektion und Embryotransfer**

Am auf die Superovulation folgenden Tag wurden die befruchteten Eizellen aus Vaginalpfropf-positiven Mäusen isoliert und nach etablierter Methode mikroinjiziert (Hogan et al., 1986). Dabei wurden die Eizellen unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Haltekapillare fixiert. Dann wurde die Mikroinjektionskapillare, über mechanische Mikromanipulatoren gesteuert, in den größeren, männlichen Vorkern eingeführt und 1 - 2 pl der DNA-Lösung injiziert. Die die DNA-Mikroinjektion überlebenden Zygoten wurden in den Eileiter pseudoträchtiger (zuvor mit einem vasktomierten Männchen verpaarter) NMRI-Mäuse implantiert (Embryotransfer), die dadurch als Leihmütter die fremden Embryonen austrugen und nach der Geburt säugten.

Die Mikroinjektion mit anschließendem Embryotransfer zur Erzeugung transgener Mäuse wurde von Herrn Dr. Johannes Schenkel (Institut für Genetik, Universität Karlsruhe) durchgeführt.

### **2.2.3.4. Zucht von Mäusen**

Die Tiere wurden in Plastik Käfigen auf Streu gehalten und erhielten Trockenfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum. Der Nachtzyklus des konstanten Tag-Nacht-Rhythmus dauerte von 19.00 Uhr bis 7.00 Uhr (Sommerzeit). Die Tiere wurden zur Identifizierung mit nummertragenden Metall-Ohrmarken versehen; Schwanzbiopsien wurden durch Kauterisierung gewonnen. Tötung der Tiere erfolgte durch cervicale Dislokation.

### **2.2.3.5. Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien**

Ein ca. 1 cm langes Schwanzstück wurde über Nacht bei 55 °C in 750 µl 50 mM Tris-Hcl (pH 8), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K inkubiert und anschließend 5 Minuten geschüttelt. Proteine wurden durch Zufügen von 300 µl 5 M NaCl ausgesalzt und bei 10 000 x g abzentrifugiert. Aus 750 µl des Überstandes wurden die Nukleinsäuren durch Zumischen von 500 µl Isopropanol präzipitiert, abzentrifugiert und zweimal in 500 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge wurde das Pellet in 500 µl Wasser aufgenommen und drei Stunden bei 37 °C inkubiert und bisweilen geschüttelt.

### 2.2.3.6. Analytischer Verdau genomischer DNA

50 µl der aus Schwanzbiopsien gewonnenen genomischen DNA wurden mit 50 U (in der Regel 5 µl) des jeweiligen Restriktionsenzym im entsprechenden Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 60 µl übernacht bei 37 °C inkubiert, am Folgetag Ethanol-präzipitiert und in 20 µl TE aufgenommen und für 3 Stunden bei 37 °C unter bisweisligem Schütteln resuspendiert.

### 2.2.3.7. Southern Blot

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Hybond N<sup>+</sup>-Membranen wurde analog dem Northern Blotting-Verfahren durchgeführt. Als Transferflüssigkeit wurde 0,4 M NaOH verwendet. Dies führt einerseits zur Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen, andererseits zur kovalenten Fixierung der DNA an die Membran, so daß nachfolgendes UV-crosslinking nicht nötig ist. Nach dem Transfer wurde die Membran in 5 x SSC äquilibriert.

### 2.2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in 50 µl Volumen in 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3 in Gegenwart von 200 µM Desoxynukleotid-Triphosphaten und 0,025 U/µl Taq-Polymerase mit einem Cyclone-Thermocycler (Integra Biosciences, Woburn, USA) ausgeführt. Es wurde 5 µl aus Schwanzbiopsien gewonnene DNA eingesetzt. Die Konzentration der verwendeten Primer, die jeweilige MgCl<sub>2</sub>-Konzentration sowie die Zyklusbedingungen sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

PCR	Bcl-2	MMTVmyc	WAPp53	Min/ APC
Primer (nM)	bcl-s (150) bcl-as(150)	Myc 1 (150) Myc 2 (150)	WAPforw (150) p53rev (150)	MAPC-MT (1500) MAPC 15 (150) MAPC 9 (15)
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM	1 mM (*)	2 mM
Zyklus	1'95 °C 1'65 °C 45''72 °C	1'95 °C 1'58 °C 1'72 °C	1'94 °C 1'60 °C 3'72 °C	1'95 °C 1'55 °C 2'72 °C
Zyklen	35x	31x	35x	35x

(\*) In späteren Analysen funktionierte die PCR mit dieser MgCl<sub>2</sub>-Konzentration nicht mehr, und es wurde Spezifität bei 2 mM erreicht; evtl. anderes Batch Enzym o.ä. Gründe.

### **2.2.3.9. RNA-Präparation aus Geweben (verändert nach Chirgwin, 1979)**

Ein bei -80 °C gelagertes, zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebestück wurde in 2 ml Tissue-Guanidinium-Lösung mit dem Ultraturrax zerkleinert. Nach zehnmütiger Zentrifugation (10 000 x g) wurde der Überstand mit 200 µl 10 % (w/v) Sarkosyl versetzt und zwei Minuten bei 65 °C inkubiert. Diesem Lysat wurden 0,2 g CsCl zugefügt, anschließend wurde mit ihm 1 ml einer in ein SW60-Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto) vorgelegten Lösung von 5,7 M CsCl in 0,1 mM EDTA überschichtet und für 14 Stunden im SW56-Rotor bei 28 000 upm in einer Beckmann-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgesaugt, das Röhrchen invertiert, um ein Zurücklaufen der Lösung zu vermeiden, und das mittlere Drittel des Röhrchens abgeschnitten. Das hier am Boden befindliche RNA-Pellet wurde in 400 µl TE resuspendiert und nach Phenol-Chloroform-Extraktion Ethanol-präzipitiert und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

### **2.2.3.10. RT-PCR-Nachweis von Maus-bcl-2-mRNA**

Zunächst wurden 1 µg Gesamt-RNA oder 100 ng Poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit dem Oligonukleotid-Primer 8R revers transkribiert. Die Reaktion wurde in 20 µl Volumen ausgeführt und enthielt: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1 mM Desoxynukleotidtriphosphate, 0,75 µM 8F-Primer, 2,5 U/µl AMV-Reverse Transcriptase sowie 1,7 U/µl RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 42 °C inkubiert, danach 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und schließlich auf Eis gestellt. Für die anschließende PCR-Reaktion wurden noch Oligonukleotid-Primer 6F ad 0,15 µM, MgCl<sub>2</sub> ad 2 mM, KCl ad 50 mM, Tris-HCl (pH 8,3) ad 10 mM Endkonzentration sowie 2,5 U Taq-Polymerase und Wasser ad 100 µl Endvolumen zugefügt. Die Zyklusbedingungen (35 Zyklen) waren: 1 Minute 95 °C, 1 Minute 55 °C sowie 1 Minute 72 °C. Diese Reaktionen wurden in einem Cyclone-Thermocycler (Integra Biosciences, Woburn, USA) ausgeführt.

### 2.2.3.11. Gelelektrophorese von RNA

Gelherstellung und Elektrophorese wurden grundsätzlich wie in 2.4.8. beschrieben durchgeführt. Es wurden 1 g Agarose in 5 ml 20 x MOPS-Puffer und 83 ml Wasser durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst und nach Ausgleichen des Volumenverlustes mit Wasser und Abkühlen auf 60°C 12 ml (37% v/v) Formaldehyd sowie 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugemischt. Das Gel wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen.

Die aufgetragenen Proben wurden wie folgt vorbereitet: 15 µg RNA wurden zusammen mit 10 µl Formamid-Denaturierungspuffer für 10 Minuten auf 65°C erhitzt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und nach Zufügen von 5 µl Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophorese-Puffer diente MOPS-Puffer.

### 2.2.3.12. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blotting)

Das Formaldehyd-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht photographiert und auf 3 auf einer Glasplatte befindliche Lagen 20xSSC-getränktes 3MM-Papier plazierte. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Nylon-Membran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Hannover) gelegt, auf diese wiederum 3-lagig 3MM-Papier (20xSSC-getränkt), über welches ein mit einem Gewicht beschwerter Kleenex-Stapel geschichtet wurde, dessen Kapillarkräfte die Flüssigkeit nach oben ziehen und hierdurch die RNA auf die Membran transferieren sollten. Als Flüssigkeitsreservoir diente eine mit 20xSSC gefüllte Wanne, in die die Seitenränder der unteren Papierlagen getaucht waren. Das Blotting erfolgte über Nacht.

### 2.2.3.13. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Angewandt wurde die "Random Primer"-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). Hierbei wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen aufgeschmolzen und das Anhybridisieren kurzer DNA-Stücke randomisierter Sequenzen an die resultierenden Einzelstränge erlaubt. Die anhybridisierten Stücke dienen als Primer für die nachfolgende Polymerisation durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 aus *E. coli*. In Gegenwart radioaktiv markierter Nukleosid-Triphosphate werden durch den Einbau derselben die entstehenden Doppelstränge radioaktiv markiert. Verwendet wurde das

"rediprime-Kit" der Firma Amersham, Hannover. Vorgegangen wurde wie folgt:

20 ng DNA-Fragment wurden in einem Volumen von 45 µl durch 5minütige Inkubation bei 100°C und danach 5minütige Inkubation bei 0 °C denaturiert und in ein rediprime-Röhrchen gegeben; dieses enthält ein Lyophilisat aus Desoxynukleositriphosphate, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Anschließend erfolgte Zugabe von 5 µl alpha-<sup>32</sup>PdCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) und 10-minütige Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Zur Trennung des markierten Fragments von nicht-inkorporierten Nukleotiden wurde der Ansatz durch Zugabe von Wasser auf 200 µl gebracht und über eine Sephadex-G50-Säule geleitet. Die Packung dieser Säule mit in TE äquilibriertem Sephadex-G50 und die chromatographische Trennung von Fragment und Nukleotiden erfolgte unter Zentrifugation ("spun column") bei 350 x g für jeweils 3 Minuten. Anschließend wurde mit 200 µl TE nachgewaschen. Beide Eluate, die das Fragment enthielten, wurden schließlich vereinigt.

#### **2.2.3.14. Hybridisierung**

Nach beendetem Northern-Blotting wurde die Membran kurz in 5xSSC gewaschen und die Position der RNA-Spuren sowie der rRNA-Banden unter UV-Licht mit einem Kugelschreiber am Rand markiert. Nach der kovalenten Fixierung der RNA an die Membran durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 120 Joule) wurde die Membran in einer im 65 °C-Ofen rotierenden Röhre in 5 ml Hybridisierungslösung für zwei Stunden prähybridisiert. Danach wurden ca.  $3 \times 10^7$  cpm radioaktiv-markierte DNA (zuvor per 10-minütiger 100°C-Inkubation denaturiert) hinzupipettiert. Nun erfolgte 65 °C-Inkubation unter Rotieren des Röhrchens für 12 Stunden.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran bei 65°C unter Schütteln wie folgt gewaschen: 2 x 10 Minuten in 2xSSC/0,1 % SDS, dann 2x10 Minuten in 1xSSC/0,1 % SDS. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>, Amersham) aufgelegt und in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80 °C belichtet. Die Filmentwicklung erfolgte ca. 2 Tage später.

Sollte eine Membran nach der Hybridisierung mit einer anderen Probe hybridisiert werden, so wurde die ursprüngliche Probe entfernt durch Inkubation in kochender 0,1 % SDS-Lösung und Abkühlung auf

Raumtemperatur. Die Hybridisierung wurde dann wie beschrieben durchgeführt.

### 2.2.3.15. Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

In flüssigem Stickstoff sofort nach der Entnahme gefrorenes und bei -80 °C aufbewahrtes Gewebe wurde mit einem Mörser unter Flüssigstickstoff pulverisiert und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. Nach Zufügen von 400 µl 50 mM Tris-HCl (pH 6,8)/ 2,5 % SDS wurde für 10 Minuten bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension unter Eiskühlung Ultraschall-behandelt bis die Lösung homogen schien. Die groben Gewebeteile wurden abzentrifugiert (3 Minuten bei 500 x g), der Überstand in 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für weitere 10 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und die darin befindliche Proteinmenge photometrisch gemäß folgender Formel bestimmt:

$$\text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = 1,55 \times \text{OD}_{280} - 0,76 \times \text{OD}_{260}.$$

### 2.2.3.16. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Die Elektrophorese wurde nach Laemmli (1970) mit einem 12 %igen Polyacrylamidgel in Tris/Glycin-Puffer pH 8,3 durchgeführt. Die aufgetragene Protein-Menge je Spur betrug 50 µg. Die Proben (Proteinextrakte) wurden zuvor mit 1/10 Volumen 8 % SDS / 600 mM Tris pH 6,8 / 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt und durch 10-minütiges Erhitzen auf 100°C denaturiert. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten abgelöst und in Western-Blotting-Puffer überführt.

Als Molekulargewichtsmarker wurden "Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range" (Biorad) verwendet.

### 2.2.3.17. Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen

Der Transfer ("Western-Blotting") der im Polyacrylamidgel immobilisierten Proteine auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Immobilon-P, bezogen von Millipore Corporation, Bedford) erfolgte mittels Western-Blot-Apparatur



(Biorad) in der folgenden Weise: Das in der Reihenfolge aus 3 Lagen 3MM-Papier, Membran, Gel, 3 Lagen 3MM-Papier, luftblasenfrei zusammengesetzte Sandwich wurde mittels eines Trägers senkrecht in die mit Western-Blotting-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gebracht. Die Membran war durch 3 Sekunden Inkubation in Methanol aktiviert, 2 Minuten in Wasser gewaschen und 2 Minuten in Western-Blotting-Puffer äquilibriert worden, das 3MM-Papier in Western-Blotting-Puffer getränkt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte übernacht bei 4°C und einer Stromstärke von 300 mA.

Nach Zerlegen des Sandwiches wurde die Membran 1 Stunde unter Schütteln in 10 % (w/v) Milchpulver in PBS inkubiert, anschließend für 20 Minuten in PBS. Dann wurde die Membran mit 10 ml einer Lösung aus 5 µg/ml des jeweiligen Antikörpers in 10% (w/v) Milchpulver/0,3% (v/v) Tween in PBS in eine Folie eingeschweißt und 1 Stunde unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde unter Schütteln mit 0,3% Tween in PBS gewaschen (5-malige Erneuerung der Waschlösung, zunächst nach 15, dann 4 mal nach jeweils 5 Minuten). Analog erfolgte Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundär-Antikörper (1 : 5000 verdünnt) und anschließend das Waschen. Schließlich wurde nach Abtropfen der Membran diese auf der Protein-Seite mit 6 ml einer frisch bereiteten 1 : 1-Mischung der beiden ECL-Detektionslösungen genau 60 Sekunden lang bedeckt, die Flüssigkeit mit einem Kleenex-Tuch vom Rand her abgesaugt und die Membran, bedeckt von einer Lage Frischhaltefolie, in eine Filmkassette gelegt. Auflegen und nach ca. 1 Minute Entwicklung des Films erfolgten in der Dunkelkammer.

Das Detektionssystem basiert auf der von Chemolumineszenz begleiteten Oxydation eines cyclischen Diacylhydrazides, die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Meerrettich-Peroxydase katalysiert wird. Es wurde von Amersham, Hannover bezogen.

### **2.2.3.18. Fixieren und Paraffinieren von Gewebe**

Frisch entnommenes Gewebe wurde in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS übernacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten morgen wurde das Gewebe nacheinander bei Raumtemperatur in folgender Reihenfolge entwässert: je 1 Stunde 50 %, 70 %, 80 % und 90 %, dann zweimal 1 Stunde 100 % (v/v) Ethanol (vergällt); anschließend zweimal 1 Stunde Aceton, 2 Stunden Xylol. Die Einbettung in Paraffin geschah durch dreistündige Inkubation in einer 59 °C-

warmen 1:1 (v/v)-Mischung von Xylol und Paraffin und schließlich dreistündige Inkubation in Paraffin (59 °C).

Die paraffinierten Gewebe wurden richtig orientiert in einer auf ca. 60 °C erwärmten Gießform mit Paraffin übergossen und mit einem Halter versehen, mit dem das so erhaltene Blöckchen am Mikrotom befestigt werden konnte. Die Schnittdicke betrug 7 µm. Die Gewebeschnitte wurden in ein 40 °C-warmes Streckwasserbad überführt und hernach auf einem silanisierten Objektträger positioniert.

Silanisierte Objektträger: Die Objektträger wurden 10 Sekunden in 2% 3-Amino-Propyl-Triethoxysilan (Sigma, München) in Aceton getaucht, kurz in Aceton und danach in Wasser geschwenkt und unter dem Abzug trocknen gelassen.

#### **2.2.3.19. Nachweis apoptotischer Zellen auf Gewebeschnitten (TUNEL-Assay)**

Der Assay basiert auf der Extension freier 3'-OH-Enden von DNA mit dem Enzym Terminale Desoxynuklotidyltransferase (Tdt). Die an die DNA gefügten Nukleotide sind Digoxigenin-markiert und werden mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten, gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper nachgewiesen. Verwendet wurde das Apoptag-Kit der Firma Oncor gemäß dem Herstellerprotokoll.

7 bis 8 µm dicke Paraffinschnitte wurden durch folgende Inkubationsschritte deparaffiniert: 2 x 5 Minuten Xylol, 2 x 5 Minuten Ethanol (vergällt), 3 Minuten 95 % (v/v) Ethanol, 3 Minuten 70 % (v/v) Ethanol und schließlich 5 Minuten in PBS. Die deparaffinierten Schnitte wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit je 50 µl Proteinase K (20 µg/ml) inkubiert und dann 4 x 2 Minuten in Wasser gewaschen. Inaktivierung endogener Peroxidasen erfolgte durch 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 2 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. Nach 2 x 5 Minuten Waschen in PBS wurden die Schnitte in Equilibration Buffer (Oncor) äquilibriert und schließlich in 27 µl Enzym-Mix für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Enzym-Mix bestand pro Schnitt aus 2,5 µl Wasser, 5,5 µl Tdt-Enzym sowie 19 µl Reaction Buffer (dieser enthält u.A. die markierten Nukleotide). Die Reaktion wurde gestoppt durch 30minütige Inkubation in Stop/Wash Buffer bei 37 °C. Nach 3 x 5 Minuten Waschen in PBS wurde auf die Schnitte jeweils 55 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 x 5 Minuten Waschen in PBS wurde das AEC-Substrat

appliziert (1 ml 50 mM Natrium Acetat pH 4,9, 50 µl Aminoethylcarbazol [AEC, 25 mg in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst], 3 µl 30 % [v/v] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte kurz in Wasser gewaschen, für eine Minute mit Hämatoxylin (Sigma, München) gegengefärbt, 20 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut und in Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Glycerin-Gelatine: 7 g Gelatine wurde in 42 ml Wasser quellen gelassen, nach Hinzufügen von 50 ml Glycerin 10 Minuten erwärmt (ca. 60 °C) und filtriert. Vor dem Eindecken wurde die Lösung durch Erwärmen auf 60 °C verflüssigt.

#### **2.2.3.20. Totalpräparate von Mausbrustdrüsen**

Die inguinale Brustdrüse wurde auf einem silanisierten Objektträger gespreitet und übernacht bei 4 °C in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Dann wurde kurz in Wasser gewaschen und schließlich 3 mal 24 Stunden in Aceton inkubiert. Nach Durchlaufen einer Alkoholreihe (jeweils 1 Stunde 90 %, 70 % und 50 % Ethanol (vergällt) wurde übernacht bei 4 °C in Karminlösung gefärbt. Diese wurde jeweils frisch hergestellt, indem 1 g Karmin (Sigma, München) mit 2,5 g KAl (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in 500 ml Wasser für 10 Minuten gekocht und über ein Papierfilter filtriert wurde. Schließlich wurde in Glycerin-Gelatine eingedeckt.

#### **2.2.3.21. 2-Stufen-Karzinogenese der Haut**

Eine Woche vor Versuchsbeginn wurde die Rückenhaut der Tiere rasiert (ca 3 x 2 cm Fläche). Initiation erfolgte durch einmalige Applikation von 100 nMol DMBA in 100 µl Aceton mit einer Pipette. Beginnend eine Woche später, wurden zweimal wöchentlich (Montags und Freitags) je 10 nMol TPA in 100 µl Aceton auf die rasierte Rückenfläche pipettiert, über einen Zeitraum von 15 Wochen. Das Zählen der Papillome (einmal wöchentlich, über einen Zeitraum von 43 Wochen) erfolgte als Blindversuch.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß des "Anti-Apoptose-Proteins" Bcl-2 auf die Apoptose und Tumorigenese bestimmter Organe untersucht werden. Hierzu wurden transgene Mäuse hergestellt, die eine für das Bcl-2-Protein kodierende cDNA humanen Ursprungs in unterschiedlichen Geweben exprimieren; dabei handelt es sich um die laktierende Brustdrüse, eine Vielzahl von Geweben, sowie suprabasale Schichten der Haut. Im ersten und letzten Fall wurde dies durch die Wahl gewebespezifischer Promotoren, im zweiten Fall durch Verwendung des Promotors eines ubiquitär exprimierten Gens erreicht. Neben den Promotoren, die die cDNA "antreiben", müssen derartige Transgen-DNA-Konstrukte zur korrekten Polyadenylierung ihrer mRNA ein Polyadenylierungssignal am 3'-Ende aufweisen; darüberhinaus zeigte es sich, daß die Anwesenheit von Spleißsignalen die Transgenexpression verbessert (Brinster et al., 1988; Choi et al., 1991).

In einem ersten allgemeinen Teil sollen die klonierten Genkonstrukte sowie die mit ihnen erzeugten transgenen Mauslinien dargestellt werden; der folgende spezielle Teil handelt von den mit diesen Tieren durchgeführten Experimenten.

#### 3.1. Allgemeiner Teil

##### 3.1.1. DNA-Konstrukte zur Generierung der transgenen Mäuse

###### (1) Brustdrüsenspezifische Expression der bcl-2-cDNA

Brustdrüsenspezifische Transgenexpression kann durch die Promotoren verschiedener Milchproteingene wie  $\beta$ -Lactoglobulin (Bortner and Rosenberg, 1995) oder Saures Molkeprotein (whey acidic protein, WAP; Andres et al., 1987) sowie durch den LTR des Maus-Mammatumovirus (MMTV; Stewart et al., 1984) erreicht werden. Die Milchproteingene werden mit unterschiedlicher Kinetik während der Schwangerschaft induziert und ihre Expression während der Laktation beibehalten; das Expressionsmuster MMTV-LTR-getriebener Transgene unterliegt nicht so sehr diesem zyklischen, laktationsabhängigen Verlauf. Für die vorliegende Arbeit wurde der Promotor des WAP-Gens verwendet. Es war bereits gezeigt worden, daß das 1,6 kb-Bgl

II/Kpn I-WAP-Promotorfragment ausreichend ist, Transgenexpression in alveolären Epithelzellen der laktierenden Brustdrüse zu vermitteln (Tzeng et al., 1993). Zudem wurden Transgenkonstrukte, die 7,2 kb des Maus-WAP-Gens enthielten, korrekt in der Brustdrüse exprimiert (Burdon et al., 1991). Dieses Fragment enthält 2,5 kb des Promotors, die vier durch die jeweiligen Introns getrennten Exons sowie die die Polyadenylierungsstelle umspannende 3'-Region des WAP-Gens. Insertion einer heterologen cDNA in die einzige, im ersten Exon unmittelbar vor dem Translationsstartpunkt gelegene Kpn I-Schnittstelle führte zu einer starken und laktationsabhängigen Expression der cDNA in der Brustdrüse (Jhappan et al., 1993).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Transgen-Konstrukt (Abbildung 1A) besteht aus dem 2,9 kb-Bgl II-Fragment des Maus-WAP-Gens, das 1,6 kb des Promotors sowie die ersten drei Exons enthält. Die *bcl-2*-cDNA wurde in die singuläre Kpn I-Schnittstelle im ersten Exon inseriert; sie enthält kein eigenes Polyadenylierungssignal. Da diesem Konstrukt die endogene 3'-Region des WAP-Gens fehlt, wurde 3'-wärts die Polyadenylierungsstelle von SV40-Tag angefügt.

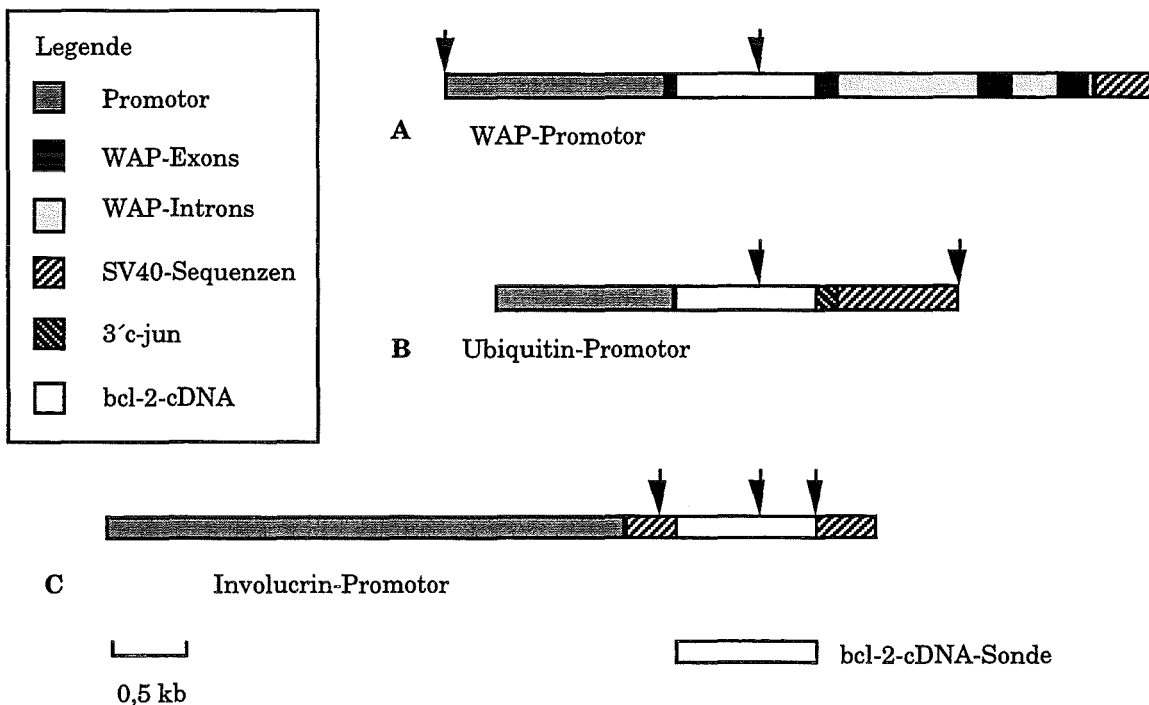


Abbildung 1. Schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Transgen-Konstrukte. A. WAP-*bcl-2*-Konstrukt. B. ubi-*bcl-2*-Konstrukt. C. iv-*bcl-2*-Konstrukt. Erklärungen siehe Legende und Text. Die in der Southern-Analyse verwendete DNA-Sonde ist eingezeichnet. Pfeile geben die BamH I-Schnittstellen an.

## (2) Ubiquitäre Bcl-2-Expression

Ubiquitäre Transgen-Expression sollte mit dem Promotor des humanen Ubiquitin C-Gens (UbiC) erreicht werden. Im Menschen existieren mehrere Ubiquitin-Proteine, die von einer Multigenfamilie kodiert werden (Wiborg et al., 1985). Ubiquitine sind in die ATP-abhängige, nicht-lysosomale intrazelluläre Degradation von Proteinen involviert. Da dies einen generellen Schritt des Zellstoffwechsels darstellt (Rechsteiner, 1987), ist die Expression der Ubiquitine nicht auf einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp festgelegt. Tatsächlich vermittelten 1,2 kb des UbiC-Promotors ubiquitäre Expression einer junB-cDNA in transgenen Mäusen (M.Schorpp, persönliche Mitteilung; siehe auch: Schorpp et al., 1996). In diesem Transgenkonstrukt ist die junB-cDNA gefolgt von 150 bp aus der 3'-Region des c-jun-Gens sowie der Spleiß- und Polyadenylierungssequenz aus SV40. Im entsprechenden ubi-bcl-2-Konstrukt der vorliegenden Arbeit wurde die junB-cDNA durch die bcl-2-cDNA ersetzt (Abbildung 1B).

Transfektion dieses DNA-Konstruktes in 3T3-Mausfibroblasten zum funktionalen Test *in vitro* führte zur Expression des Bcl-2-Proteins, das im Western Blot durch den spezifischen monoklonalen Antikörper 124 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 2a).

## (3) Bcl-2-Expression in suprabasalen Hautschichten

Zur Transgenexpression in der Haut wurde der Promotor des Involucrin-Gens verwendet. Involucrin ist ein 68 kDa-großes Protein, das spezifisch in den suprabasalen Schichten verhornender Epithelien exprimiert wird (Übersicht in Crish et al., 1993). Es war bereits gezeigt worden, daß ein 3,7 kb Promotorfragment (das auch das erste Intron des Involucrin-Gens enthält) in transgenen Mäusen die entsprechende Expression eines nachgeschalteten lacZ-Gens aus *E. coli* vermitteln kann (Carrol et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde das lacZ-Gen dieses Konstruktes gegen die bcl-2-cDNA ausgetauscht; ihr geht daher der Involucrin-Promotor samt erstem Intron sowie die Spleiß-Donor-/Akzeptorstelle aus SV40 voraus; gefolgt wird die bcl-2-cDNA von der Polyadenylierungssequenz von SV40-Tag (Abbildung 1C).

Zunächst wurde dieses Konstrukt *in vitro* getestet. Hierzu wurde es transient in die Mauskeratinocytenzelllinie PAM-212 transfiziert. Das gebildete

humane Bcl-2-Protein wurde mittels des spezifischen monoklonalen Antikörpers 124 in einem Western Blot nachgewiesen. Wie aus Abbildung 2b hervorgeht, erkennt dieser Antikörper in Extrakten transfizierter PAM-212-Zellen ein Protein von 26 kDa. Darüberhinaus sind noch schwächere Banden im Bereich zwischen 26 und 32 kDa sowie bei ca. 38 kDa zu erkennen, die nur bei den transfizierten Zellen auftreten; möglicherweise wird die Translation zum Teil nicht korrekt terminiert. Als Positivkontrolle diente der Proteinextrakt einer primären humanen Keratinocytenkultur; diese in niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultivierten Keratinocyten entsprechen unverhornten basalen Zellen der Haut und exprimieren wie diese Bcl-2.

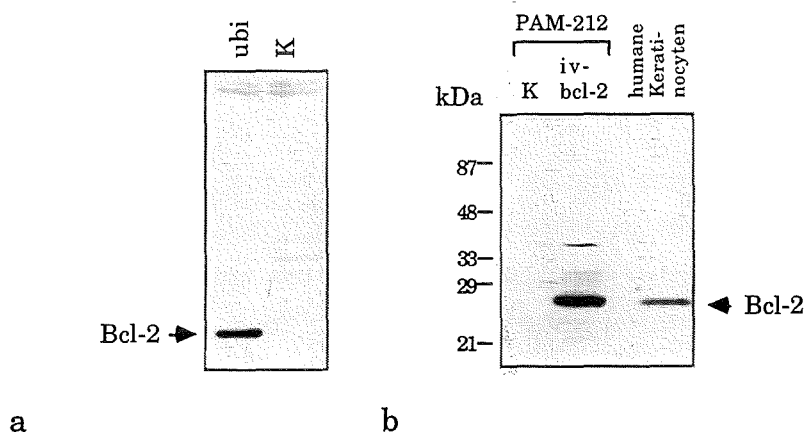


Abbildung 2. In vitro-Test der Konstrukte ubi-bcl-2 (a) und iv-bcl-2 (b). Das ubi-bcl-2-Konstrukt wurde stabil in 3T3-Zellen, das iv-bcl-2-Konstrukt transient in PAM-212-Zellen transfiziert. Aus den Transfektanten gewonnene Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und Bcl-2-Protein nach einem Western Blot mit dem Human-Bcl-2-spezifischen Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil). K: Extrakte nichttransfizierter Kontrollzellen.

### 3.1.2. Erzeugung transgener Mäuse

Die Generierung transgener Mäuse durch Mikroinjektion des linearisierten und von Vektorsequenzen befreiten DNA-Konstrukts in befruchtete Mausocyten und deren anschließender Transfer in die Uteri scheinsschwangerer Ammenmäuse ist mittlerweile zu einem Standardverfahren geworden und wird im Methodenteil ausführlich dargestellt. Bei einem Teil der injizierten Oocyten inseriert die Transgen-DNA ins Genom, und zwar gewöhnlich in einem einzigen chromosomalen Locus

und in mehreren Kopien, die tandemartig, "Kopf an Schwanz" aneinandergereiht sind (Jaenisch, 1988).

Für die Durchführung dieser Arbeiten danke ich Herrn Dr. Johannes Schenkel (Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe).

Die potentiell transgenen Nachkommen, die aus diesen Mikroinjektionen resultierten, wurden zunächst auf die Anwesenheit des jeweiligen Transgens untersucht. Zu diesem Zweck wurde aus Schwanzbiopsien genomische DNA isoliert, mit dem Restriktionsenzym BamH I gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem anschließenden Southern Transfer auf eine Membran wurde das Transgen dann durch Hybridisierung gegen eine radioaktiv markierte *bcl-2*-cDNA-Sonde nachgewiesen.

Die hierbei zu erwartenden Fragmentgrößen ergeben sich aus der Position der BamH I-Schnittstellen im Transgen-Konstrukt und dem Bereich, an den die Sonde hybridisieren kann (Abbildung 1). Bei den mit dem WAP-*bcl-2*-Konstrukt erzeugten Transgenen (WAP-*bcl-2*-Mäuse) ist nach BamH I-Restriktion der genomischen DNA somit ein "internes", 2,2 kb-großes Fragment zu beobachten, das den Promotorbereich sowie den 5'-seitigen Teil der *bcl-2*-cDNA enthält; darüberhinaus hybridisiert die Sonde noch mit dem 3'-seitigen Teil der *bcl-2*-cDNA; bei tandemartiger Anordnung der Transgenkopien resultiert hieraus ein 2,5 kb-großes Fragment (Abbildung 3a). Entsprechend wird nach BamH I-Restriktion in DNA der mit dem ubi-*bcl-2*-Konstrukt erzeugten transgenen Mäuse (ubi-*bcl-2*-Mäuse) ein "internes" 1,4 kb-Fragment detektiert sowie ein sich aus der Tandemanordnung der Transgenkopien erklärendes 1,8 kb-Fragment (Abbildung 3b). Im iv-*bcl-2*-Konstrukt wird die *bcl-2*-cDNA beiderseits von BamH I-Schnittstellen flankiert; hier detektiert die Sonde somit nur die internen, 600 bp bzw. 400 bp großen Fragmente der *bcl-2*-cDNA (Abbildung 4). Da die Hybridisierung nicht stringent ausgeführt wurde, hybridisiert die Sonde noch jeweils mit dem 1,47 kb-Fragment des endogenen *bcl-2*-Gens der Maus (Negrini et al., 1987). Neben diesen aus der Restriktionskarte des jeweiligen Konstrukts resultierenden Fragmenten können noch sogenannte Übergangs- oder Transitionsfragmente auftreten, die sich aus der Insertion des Transgens in der Nähe einer BamH I-Schnittstelle erklären lassen.



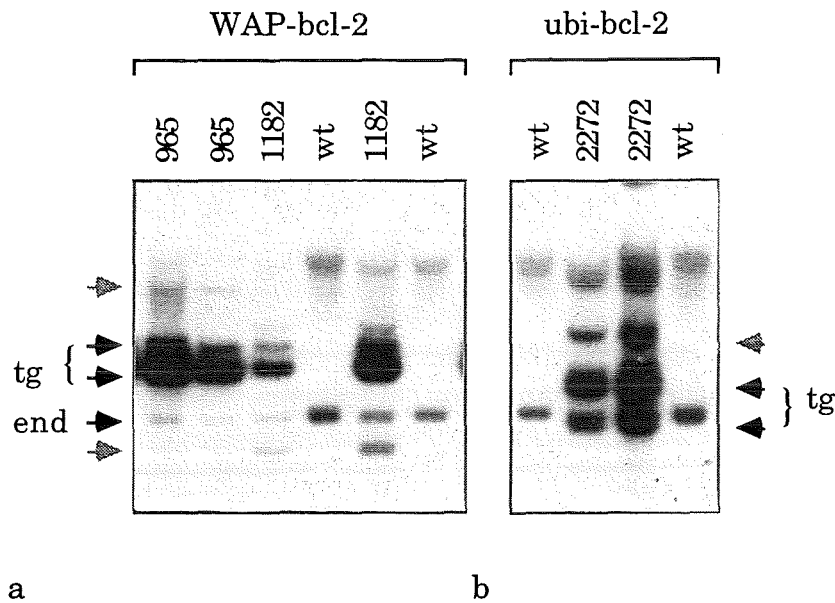


Abbildung 3. Genomischer Southern Blot zum Nachweis des WAP-bcl-2- (a) bzw. des ubi-bcl-2-Transgens (b). Genomische DNA der angegebenen Mäuse (Nummern) wurde nach BamH I-Restriktion gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer <sup>32</sup>P-markierten bcl-2-cDNA-Sonde hybridisiert. tg: Transgenspezifische Banden; end: endogenes Fragment des Maus-bcl-2-Gens; graue Pfeile: Transitionsfragmente.

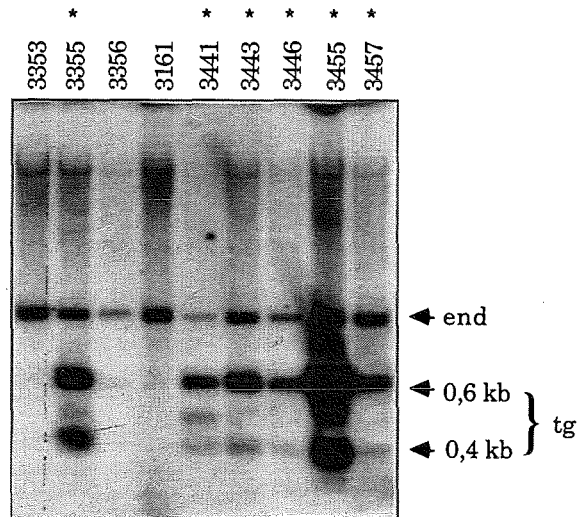


Abbildung 4. Genomischer Southern Blot zum Nachweis des iv-bcl-2-Transgens. Genomische DNA der angegebenen Mäuse (Nummern) wurde nach BamH I-Restriktion gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer <sup>32</sup>P-markierten bcl-2-cDNA-Sonde hybridisiert. tg: Transgenspezifische Banden; end: endogenes Fragment des Maus-bcl-2-Gens. Die mit einem Sternchen versehenen Tiere sind transgen (das ebenfalls transgene Tier 3361 ist nicht abgebildet; vgl. Abb.15).

Diesen Analysen zufolge resultierten aus den Oocyten-Injektionen der Konstrukte fünf transgene WAP-bcl-2-Mäuse, drei transgene ubi-bcl-2-Mäuse sowie sieben transgene involucrin-bcl-2-Mäuse (im folgenden kurz iv-bcl-2-Mäuse genannt) (vgl. Tabelle 1). Genetisch sind diese Mäuse F1-Hybride aus C57Bl6- und DBA/2-Mäusen, da dies der Genotyp der injizierten Oocyten war. Für die weiteren Analysen und Experimente wurden die transgenen Mäuse mit DBA/2-Mäusen verpaart, um sie diesem reinerbigen genetischen Hintergrund anzunähern. Dabei stellte sich heraus, daß alle transgenen WAP-bcl-2-Mäuse ihr Transgen an die Nachkommen weitergaben. Dies war nur bei zwei der drei ubi-bcl-2-Transgenen sowie lediglich bei einer einzigen der iv-bcl-2-transgenen Mäuse der Fall. Die Bezeichnungen der so entstandenen transgenen Mauslinien entsprechen der Nummer des jeweiligen Gründertieres (Tabelle 1). Der Erbgang läßt auf die Integration des jeweiligen Transgens in jeweils einen einzigen autosomalen Locus schließen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise weicht der Erbgang der ubi-bcl-2-Transgenen der Linie 2266 von der erwarteten mendelschen Verteilung ab (Tabelle 3).

Tabelle 1. Transgene Gründertiere und etablierte Mauslinien

Konstrukt	transgene Tiere	transgene Linien	exprimierende Linien
WAP-bcl-2	5	5	Linie 965 und 1182
ubibcl-2	3	2	Linie 2266 und 2272
iv-bcl-2	7	1	Linie 3446

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Transgene in den Nachkommen der identifizierten transgenen Mäuse mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Die hierbei verwendeten Oligonukleotid-Primer bcl-s und bcl-as korrespondieren den Nukleotiden 725-747 bzw. 361-385 der humanen bcl-2-cDNA. Sie amplifizieren somit in allen transgenen Konstrukten das gleiche 385 bp-große Fragment (Abbildung 5).

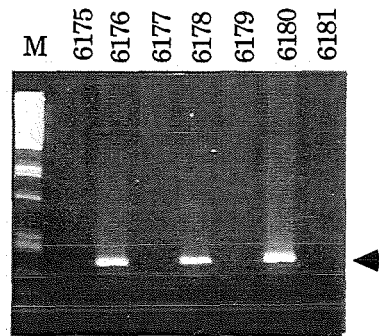


Abbildung 5. PCR-Nachweis der Bcl-2-Transgene, hier exemplarisch anhand Nachkommen der Linie ubi-bcl-2-2266. Genomische DNA der angegebenen Tiere (Nummern) wurde mit den Primern bcl-s und bcl-as amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Pfeil: 385 bp großes Amplifikationsprodukt. M: Größenstandard (Pst I-verdaute  $\lambda$ -DNA).

### 3.1.3. Transgenexpression in den transgenen Mäusen

Integration eines Transgens ins Genom führt nicht notwendigerweise zu dessen Expression. Der Integrationslocus könnte hierbei eine Rolle spielen. Allerdings sind die Faktoren, die zur Nichtexpression eines Transgens führen können, molekular wenig charakterisiert. Zunächst war es also nötig, aus den identifizierten transgenen Mäusen diejenigen herauszufinden, die das Transgen im gewünschten Zielgewebe exprimierten.

#### (a) Expression von transgenem und endogenem Bcl-2 in der Brustdrüse WAP-bcl-2-transgener Mäuse

**Transgenexpression.** - Das WAP-bcl-2-Transgen sollte in laktierenden Brustdrüsen exprimiert werden. Daher wurde aus den inguinalen Brustdrüsen laktierender Weibchen (Tag 5 nach dem Werfen) aller transgenen Mauslinien RNA bzw. Protein isoliert und per Northern bzw. Western Blot analysiert. Die Northern Blot-Analyse ergab zwei transgenexprimierende Linien, Linie 965 und Linie 1182 (Abbildung 6a). Beide zeigten ungefähr gleichstarke Expression. Das beobachtete Haupttranscript ist größer als die im Konstrukt vorhandenen WAP-Exons und die bcl-2-cDNA zusammengenommen (ca. 1,3 kb). Somit wurden die WAP-Introns vermutlich nicht komplett herausgespleißt.

Durch Western Blot-Analyse der Proteinextrakte wurde untersucht, ob diese Transkripte auch korrekt translatiert werden. In der Tat detektierte der gegen menschliches Bcl-2 gerichtete monoklonale Antikörper 124 in den transgenen, nicht jedoch in Wildtyp-Brustdrüsen, ein Protein der korrekten Größe (Abbildung 6b).

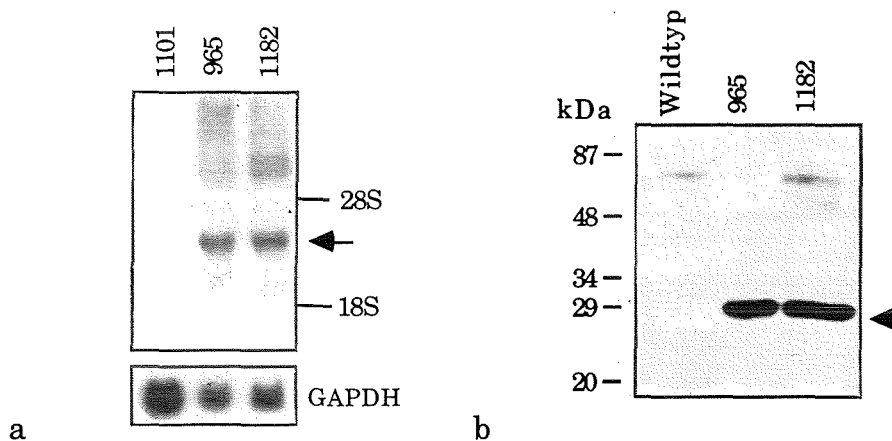


Abbildung 6. a. Northern Blot-Analyse der Transgenexpression in laktierenden Brustdrüsen der WAP-bcl-2-transgenen Mäusen der Linie 1101, 965 und 1182. 15 µg Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einer <sup>32</sup>P-markierten bcl-2-cDNA-Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt die Position des Haupttranscripts; die Positionen der 18S- und 28S-rRNAs sind angegeben. Unten: Hybridisierung des selben Blots gegen eine <sup>32</sup>P-markierte GAPDH-Sonde zur Kontrolle der Integrität und aufgetragenen Menge der RNA.

b. Western Blot-Analyse der Transgenexpression in laktierenden Brustdrüsen der WAP-bcl-2-transgenen Mäuse der Linien 965 und 1182. 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Human-Bcl-2-spezifischen Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil).

In Mäusen der Linie 1182 ist die Transgenexpression brustdrüsenpezifisch (Daten nicht gezeigt). In Weibchen der Linie 965 ist die Transgenexpression zeitlich offenbar nicht auf Schwangerschaft und Laktation limitiert, da auch in Brustdrüsen nichtschwangerer und nichtlaktierender Weibchen Transgenexpression nachweisbar ist (Abbildung 7). Die starken, kreuzreagierenden Signale bei ca. 25 und 50 kDa auf diesem Blot rühren möglicherweise von in den Extrakten vorhandenen Immunglobulinen her, da hier ein gegen IgG-H- und -L-Ketten gerichteter Sekundärantikörper verwendet wurde. Während in Uterus, Ovar und Dünndarm allenfalls schwache Transgenexpression zu verzeichnen ist, findet sich überraschenderweise stärkere Transgenexpression im Gehirn des nichtschwangeren und nichtlaktierenden Weibchens. Möglicherweise ist die

Transgenexpression in Gehirn und Brustdrüse in Tieren der Linie 965 also nicht an Schwangerschaftshormone gebunden. Um dem nachzugehen, wurden auch Extrakte aus Brustdrüse\* und Gehirn eines männlichen Tiers der Linie 965 per Western Blot untersucht. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, findet sich tatsächlich starke Expression im Gehirn, wohingegen in der männlichen Brustdrüse kein vom Transgen herrührendes Bcl-2 nachgewiesen werden konnte.

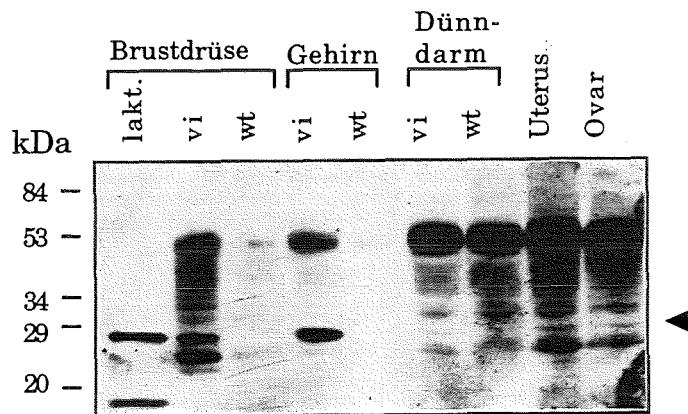


Abbildung 7. Western Blot-Analyse der Transgenexpression in den angegebenen Geweben einer WAP-bcl-2-transgenen weiblichen Maus. 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Human-Bcl-2-spezifischen Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil). lakt.: laktierende Maus der Linie 965; vi: nichtschwangere/nichtlaktierende Maus der Linie 965; wt: nichtschwangere/nichtlaktierende Wildtypmaus.

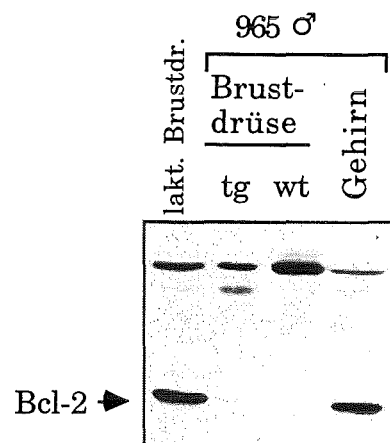


Abbildung 8. Transgenexpression in Brustdrüse und Gehirn eines Männchens (♂) der Linie 965. Gezeigt ist ein Western Blot gelelektrophoretisch getrennter Proteinextrakte (50 µg) der angegebenen Organe; die Detektion humanen Bcl-2-Proteins (Pfeil) erfolgte mit dem Antikörper 124. lakt. Brustdrüse: Extrakt einer laktierenden Brustdrüse eines Weibchens der Linie 965 als Positiv-Kontrolle; tg: transgen; wt: Wildtypkontrolle.

\* Die "Brustdrüsen" männlicher Tiere stellen lediglich gering verzweigte Gangsysteme ohne Ausführkanal in einem Fettkissen dar.

**Endogene Expression von Bcl-2 in der Mausbrustdrüse.** - Die Hybridisierung im in Abbildung 6a gezeigten Northern Blot war nicht stringent; unter identischen Bedingungen detektierte die verwendete bcl-2-cDNA-Sonde im Southern Blot das endogene bcl-2-Fragment der Maus (Abbildungen 3 und 4). Die Abwesenheit eines Signals in der Kontrollspalte spricht also dafür, daß in laktierenden Brustdrüsen kein endogenes Bcl-2 exprimiert wird. Allerdings läßt sich per Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) mit den Maus-bcl-2-spezifischen Oligonukleotid-Primern 6F und 8R sowohl in nichtlaktierenden als auch in laktierenden Mausbrustdrüsen ein spezifisches Produkt amplifizieren, das möglicherweise von Bcl-2-exprimierenden B-Lymphocyten im Lymphknoten der Brustdrüse herrührt (Abbildung 9). Wahrscheinlich tritt diese RNA aber mengenmäßig gegenüber der aus epitheliale Brustdrüsenengewebe so sehr zurück, daß sie aus Gesamt-RNA durch Northern Blot nicht nachweisbar ist.

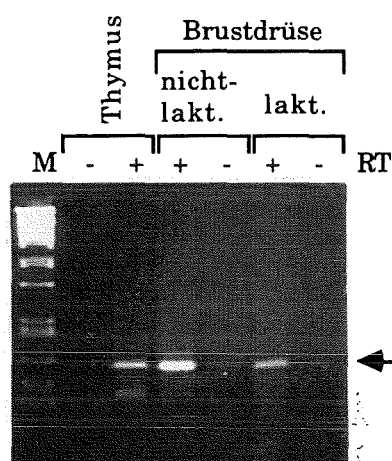


Abbildung 9. RT-PCR-Amplifikation des Maus-bcl-2-Transcripts in nichtlaktierenden und laktierenden Brustdrüsen von Wildtypmäusen. 1 µg Gesamt-RNA aus den angegebenen Geweben wurde mit dem Primer 8R revers transkribiert (+RT) und schließlich mit den Primern 6F und 8R amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt; der Pfeil markiert das spezifische 328 bp-Amplifikationsprodukt. Als Positivkontrolle wurde RNA aus Mausthymus RT-PCR-amplifiziert; Negativkontrollen sind die jeweiligen nicht revers transkribierten Ansätze (-RT). M: Pst I-verdaute λ-DNA als Größenstandard.

Bestätigt werden konnte die Abwesenheit endogenen Bcl-2-Proteins auch durch Western Blot-Analyse mit einem Bcl-2-spezifischen Antiserum, das zwischen humanem und murinem Protein nicht unterscheidet (Abbildung 10): lediglich in der laktierenden Brustdrüse einer transgenen, nicht jedoch einer Kontroll-Maus wurde ein Protein der korrekten Größe detektiert;

dagegen markierte das Antiserum ein schwächer exprimiertes Protein leicht unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität im Extrakt einer nichtlaktierenden Brustdrüse einer Wildtyp-Maus, bei dem es sich um endogenes Bcl-2 handeln könnte, wie ein Vergleich mit dem in (als Positivkontrolle dienenden) Mausthymusextrakt detektierten Bcl-2-Protein nahelegt. (Entsprechend ist das amplifizierte Signal in der RT-PCR bei nichtlaktierenden Brustdrüsen stärker als bei laktierenden. Zu beachten ist allerdings, daß das RT-PCR-Verfahren ohne internen Standard keine Quantifizierung erlaubt.)

Somit repräsentiert die laktierende Brustdrüse einen Hintergrund ohne endogene Bcl-2-Expression, vor dem sich die Auswirkung der vom WAP-bcl-2-Transgen herrührenden Bcl-2-Expression untersuchen läßt.

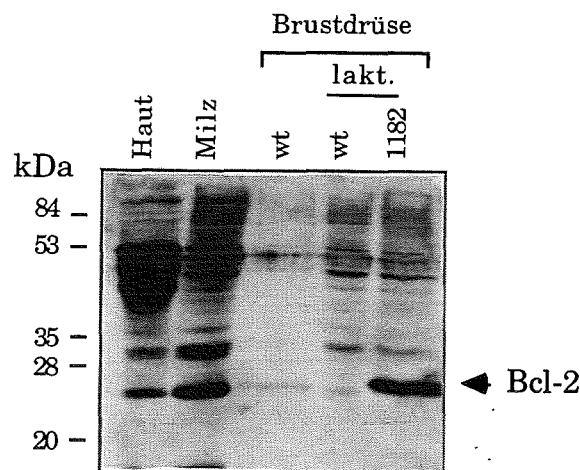


Abbildung 10. Western Blot-Analyse der endogenen Bcl-2-Expression in der Brustdrüse der Maus. 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Antikörper N-19 nachgewiesen (Pfeil). Als Positivkontrollen dienten Extrakte aus Haut und Milz einer Wildtypmaus. lakt.: laktierende Brustdrüse; wt: Wildtypmaus.

### (b) Transgenexpression in ubi-bcl-2-transgenen Mäusen

Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen einer Maus der Linie ubi-bcl-2 2272 ergab Transgenexpression in allen untersuchten Geweben (Abbildung 11). Das Expressionsmuster ist allerdings nicht völlig homogen; neben Organen wie Gehirn, Milz, Thymus, Brustdrüse und Haut, in denen das Transgen relativ am stärksten exprimiert wird, finden sich auch Organe mit geringfügig schwächerer Expression (Uterus, Leber), während

Verdauungstrakt, Niere und Herz intermediäre Expression aufweisen. Die spezifisch nachgewiesenen Transkripte sind mit etwa 3 kb wesentlich größer als zu erwarten (ungespleißt ca. 2 kb). Möglicherweise wird die Transcription somit nicht korrekt terminiert. In den Kontrollspuren wird die vergleichsweise geringe Menge endogener *bcl-2*-Transkripte erkennbar (Gehirn, Niere, Milz und Thymus; in Milz und Thymus ist neben dem 7,5 kb-auch ein kleineres Transcript von ca. 3,5 kb erkennbar). - Vom Transgen herrührende Transkripte identischer Größe treten auch in den untersuchten Geweben eines Tiers der Linie 2266 auf (Abbildung 12). Wie aus dem Vergleich der Transcriptmenge in den Gehirnen hervorgeht, ist die Stärke der Expression vergleichbar mit der von Tieren der Linie 2272.

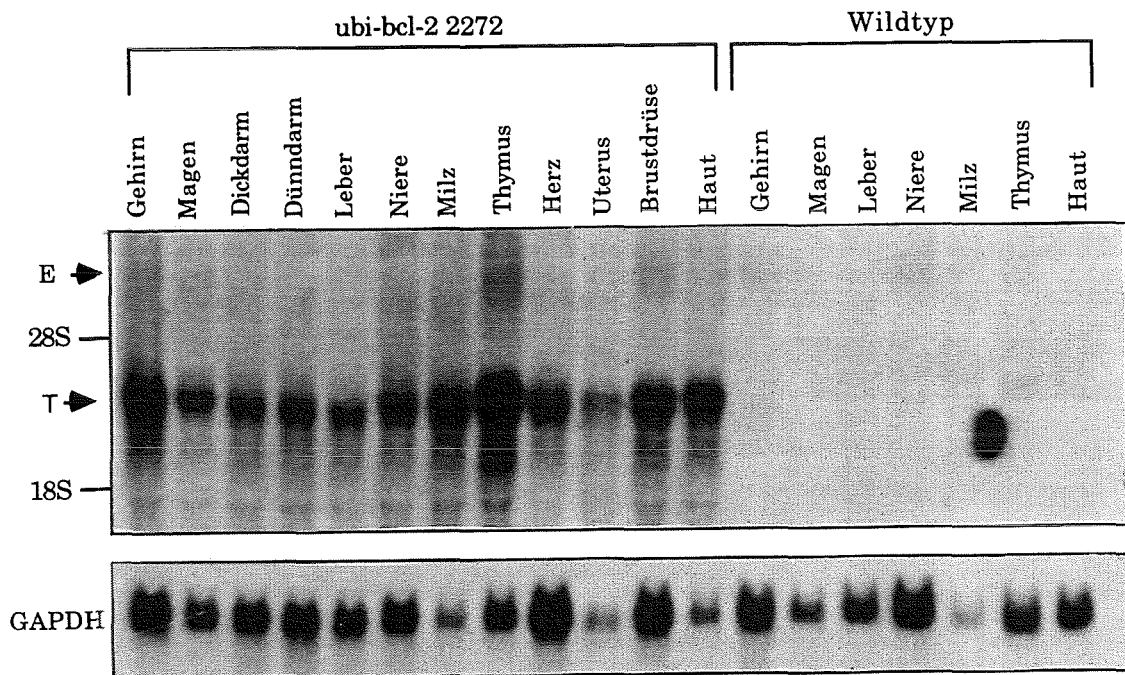


Abbildung 11. Northern Blot-Analyse der Transgenexpression in den angegebenen Geweben einer Maus der Linie 2272 bzw. einer Wildtypmaus. 15 µg Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten *bcl-2*-cDNA-Sonde hybridisiert. Der Pfeil (T) zeigt die Position des Haupttranscripts, der Pfeil (E) die Position des endogenen *bcl-2*-Transcripts; die Positionen der 18S- und 28S-rRNAs sind angegeben. Unten: Hybridisierung des selben Blots gegen eine  $^{32}\text{P}$ -markierte GAPDH-Sonde zur Kontrolle der Integrität und aufgetragenen Menge der RNA.



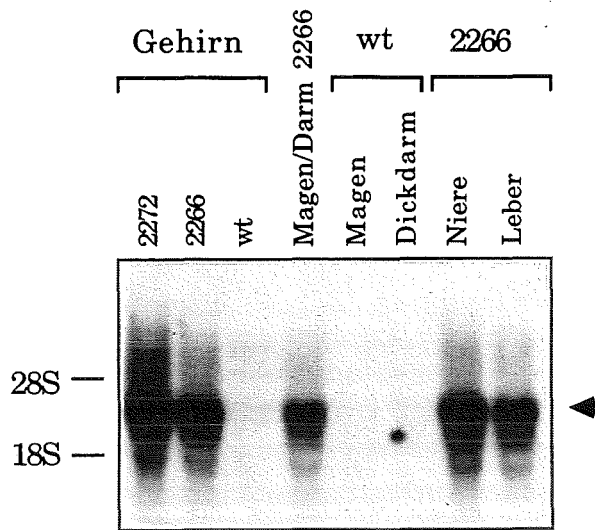


Abbildung 12. Transgenexpression in den angegebenen Organen einer Maus der Linie ubi-bcl-2 2266 im Vergleich zur Linie 2272 und Wildtyp (wt). 15 µg Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten bcl-2-cDNA-Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt die Position des Haupttranscripts; die Positionen der 18S- und 28S-rRNAs sind angegeben.

Wie Abbildung 13 zeigt, wird die vom Transgen herrührende RNA korrekt translatiert. Im Gehirn und im Dickdarm ist die Bcl-2-Expression stärker als in den übrigen Organen. Im Verhältnis zu den WAP-bcl-2-transgenen Mäusen ist die Stärke der Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene allerdings schwach, wie aus einem Vergleich von Brustdrüsenextrakten zwischen Weibchen der Linie 2272 und der Linien WAP-bcl-2 965 und 1182 (hier: laktierend) hervorgeht (Abbildung 14).

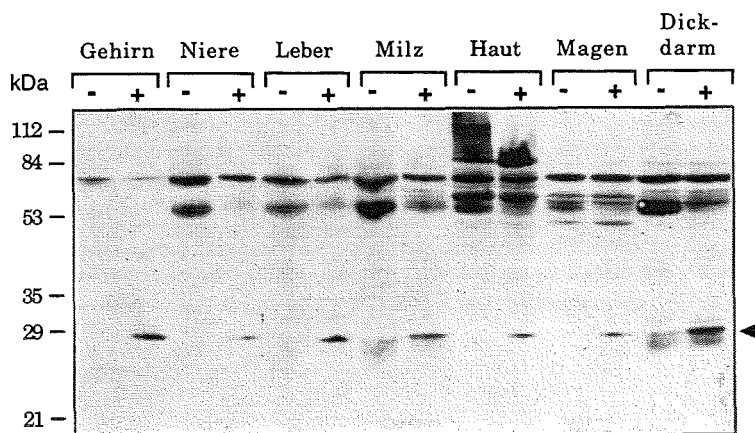


Abbildung 13. Western Blot-Analyse von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinextrakten der angegebenen Organe einer ubi-bcl-2-transgenen (+) und einer Wildtypmaus (-). Die Detektion des vom Transgen herrührenden Bcl-2-Proteins (Pfeil) erfolgte mit dem Human-Bcl-2-spezifischen Antikörper 124.

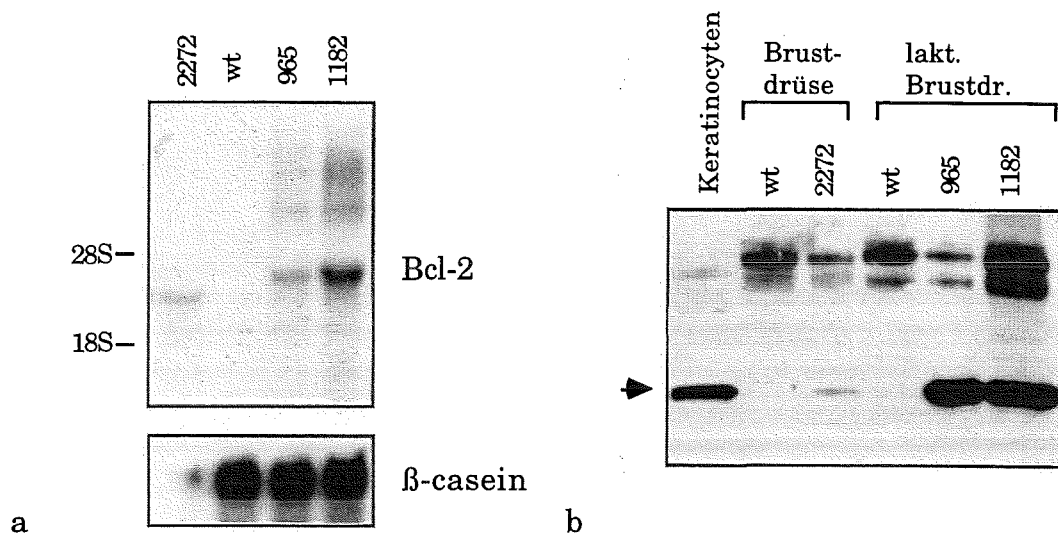


Abbildung 14. Vergleich der Transgenexpression zwischen weiblichen ubi-bcl-2- und WAP-bcl-2-transgenen Mäusen. a. Northern Blot-Analyse. 15 µg RNA aus einer nichtlaktierenden Brustdrüse eines Weibchens der Linie 2272 bzw. aus laktierenden Brustdrüsen einer Wildtypmaus (wt) und Tieren der Linien 965 und 1182 wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Membran mit einer <sup>32</sup>P-markierten bcl-2-cDNA-Sonde hybridisiert. Die zur Kontrolle eingesetzte β-casein-Sonde hybridisiert nur an RNA aus den laktierenden Brustdrüsen (bei 2272: vermutlich "spill over" aus der Nachbarspur); gleiche RNA-Menge auch in der 2272-Spalte war mit einer UV-Lampe unmittelbar nach dem Blotten kontrolliert worden (nicht gezeigt).

b. Western Blot-Analyse. 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil). Als Positivkontrolle diente ein Extrakt aus menschlichen Keratinocyten. wt: Extrakt von einem WildtypTier; Nummern: Extrakte von transgenen Tieren der angegebenen Linien. Beachte die längere Expositionsdauer, verglichen mit den Abbildungen 2b und 6b.

### (c) Transgenexpression in iv-bcl-2-transgenen Mäusen

Die erwartete Transgenexpression in der Haut gestattete auf einfache Weise, die transgenen Gründertiere selbst auf Expression zu analysieren. Hierfür wurde die von Schwanzbiopsien abgezogene Haut per Western Blot-Analyse direkt auf die Anwesenheit transgenen Bcl-2-Proteins untersucht. Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, exprimieren alle sieben transgenen Mäuse das Transgen, vier davon (3361, 3441, 3446 und 3455) stärker als die übrigen. Interessanterweise treten in den Extrakten der Linien 3361, 3441 und 3455, wie bereits bei der Transfektion von PAM-212-Zellen mit dem iv-bcl-2-Plasmid beobachtet, höhermolekularen Formen auf (vgl. Abbildung 2b). Mitaufgetragen wurde auch ein Hautextrakt einer ubi-bcl-2-transgenen Maus der Linie 2272, die im Vergleich zu den (stärker exprimierenden) iv-bcl-2-Transgenen nur schwache Expression zeigt.

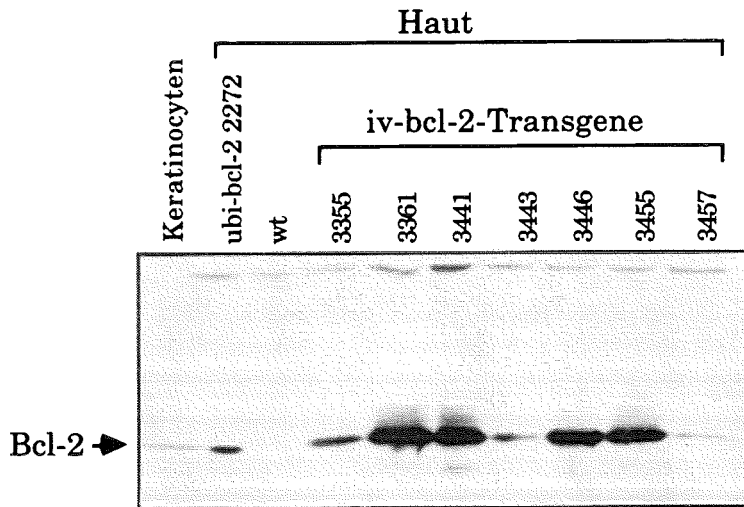
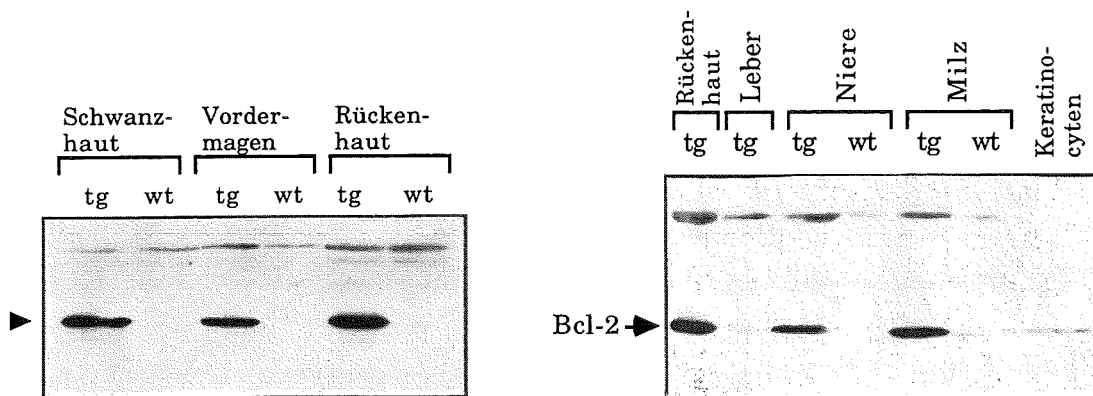


Abbildung 15. Transgenexpression in der Haut von iv-bcl-2-transgenen Mäusen. 50 µg Protein aus Schwanzhaut wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil). Zum Vergleich wurde ein Hautextrakt einer ubi-bcl-2-transgenen Maus der Linie 2272 und einer Wildtypmaus (wt), als Positivkontrolle ein Extrakt aus menschlichen Keratinocyten aufgetragen.



a

b

Abbildung 16. a. Transgenexpression in Haut und Vordermagen einer Maus der Linie iv-bcl-2 3446. b. Analyse der Transgenexpression in Leber, Niere und Milz einer Maus der Linie 3446. tg: Tier der Linie 3446; wt: Wildtypmaus; in (b) wurde als Positivkontrolle ein Extrakt aus menschlichen Keratinocyten mitaufgetragen. 50 µg Protein aus den angegebenen Organen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil).

Näher untersucht wurden lediglich Nachkommener der Maus 3446, da diese als einzige das Transgen an seine Nachkommenschaft weitervererbte und somit eine transgene Mauslinie begründete. Analysiert wurden hier zusätzlich Rückenhaut, Vordermagen sowie die in Abbildung 16 aufgeführten

weiteren Organe. Der Vormagen der Maus entspricht histologisch einer Fortsetzung des Oesophagus, ist also gleich diesem von verhornendem Epithel ausgekleidet. Erwartungsgemäß ließ sich in Haut und Vormagen Transgenexpression nachweisen. Überraschenderweise zeigten sowohl Niere als auch Milz ebenfalls starke Expression von transgenem Bcl-2.

## **3.2. Spezieller Teil**

### **3.2.1. Experimente zur Apoptose mit den WAP-bcl-2-transgenen Mäusen**

#### **(a) Inhibition der Apoptose alveolärer Epithelzellen während der postlaktationalen Involution der Brustdrüsen in WAP-bcl-2-transgenen Mäusen**

Mit der Beendigung der Laktation kommt es zur Regression des milchproduzierenden Epithels der Brustdrüse. Die differenzierten, alveolären Epithelzellen gehen hierbei durch Apoptose zugrunde (Walker et al., 1989). Im folgenden wurde anhand von WAP-bcl-2-transgenen Mäusen der Linie 1182 untersucht, inwieweit Überexpression von Bcl-2 hierauf Einfluß nimmt.

Da das natürliche Entwöhnen der gesäugten Jungen experimentell schwierig zu kontrollieren ist, wurde das Einsetzen der Involution standardisiert, indem säugenden Weibchen (gleichaltrige transgene oder Wildtyp-Kontrollen) 10 Tage nach dem Werfen die Jungen weggenommen wurden. Zuvor war deren Anzahl durch Wegnehmen oder Unterlegen weiterer Jungen unmittelbar nach dem Werfen auf fünf festgelegt worden. Der fehlende Saugreiz und die in den Brustdrüsen aufgestaute Milch lösen nach diesem erzwungenen Absetzen die Involution des Brustdrüsenepithels aus. Zu bestimmten Zeitpunkten danach wurden daher die inguinalen Brustdrüsen präpariert und analysiert.

Zunächst war es nötig, die Transgenexpression während der Involution zu bestimmen. Da nämlich während der Involution die Expression der Milchproteingene WAP und  $\beta$ -Casein (Strange et al., 1992) zurückgeht, ist ein ähnlicher Verlauf der Expression des WAP-Promotor-getriebenen Transgens zu erwarten. Wie aus der in Abbildung 17 gezeigten Western Blot-Analyse hervorgeht, wird transgenes Bcl-2 während der ersten drei Tage der Involution exprimiert; am vierten Tag geht die Expression zurück. Dies gestattete somit die Analyse des Einflusses von Bcl-2 auf die Apoptose alveolärer Epithelzellen während dieses Zeitraums.

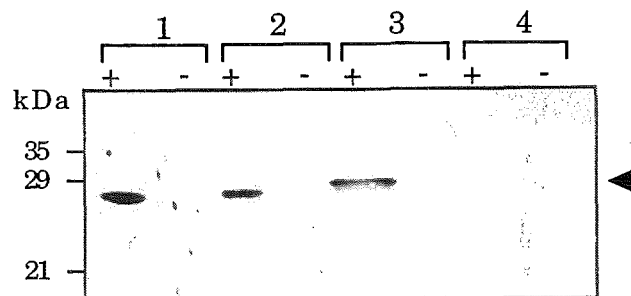


Abbildung 17. Western Blot-Analyse der Transgenexpression während der postlaktationalen Involution in WAP-bcl-2-transgenen Mäusen. An den angegebenen Tagen nach dem Absetzen der Jungen wurde Brustdrüsengewebe entnommen und Proteinextrakte daraus hergestellt. Jeweils 50  $\mu$ g Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil). "+": transgene Maus; "-": Wildtypmaus.

Für diese Untersuchungen wurde das TUNEL-Verfahren angewandt (Gavrielli et al., 1992). Es basiert auf der Extension freier 3'-OH-Enden von DNA durch das Enzym Terminale Transferase mittels markierter Nukleotide, deren Einbau auf Gewebeschnitten immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Da infolge der Apoptose-assoziierten DNA-Fragmentierung 3'-OH-Enden in hoher Zahl entstehen, können apoptotische Zellkerne auf Gewebeschnitten spezifisch angefärbt und ausgezählt werden. Die untersuchten inguinalen Brustdrüsen enthalten einen großen Lymphknoten; die in diesem festgestellten Apoptosen konnten als interne Kontrolle verwendet werden (Abbildung 18 a). Zudem wurden anfangs Negativkontrollen unter Weglassen des Enzyms durchgeführt; da hierbei niemals Hintergrundfärbung auftrat, wurde später darauf verzichtet (Abbildung 18 b,c).

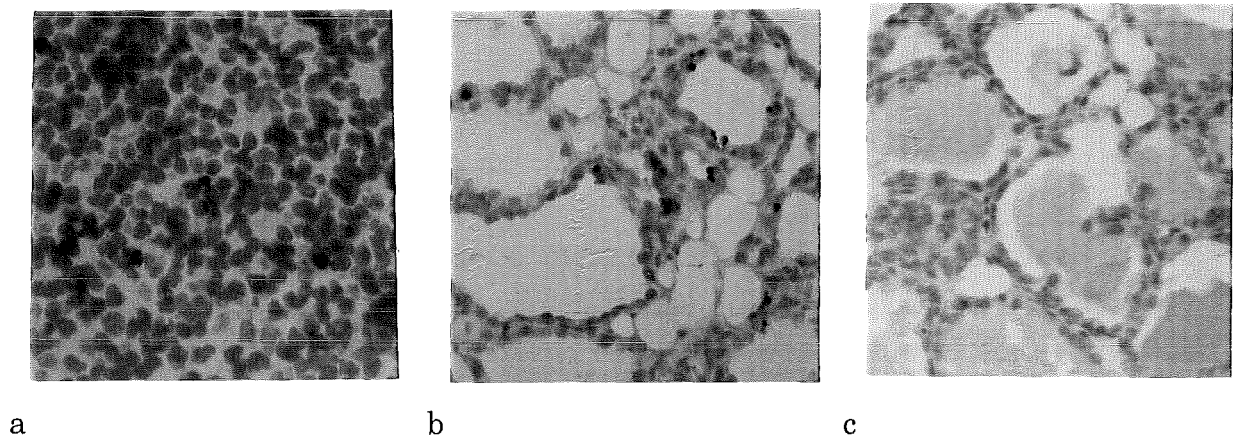


Abbildung 18. Detektion apoptotischer Zellen auf Dünnschnitten durch Mausbrustdrüsengewebe mit dem TUNEL-Verfahren. a. Apoptotische Zellen im Lymphknoten. b. Wildtypbrustdrüse am Tag 3 der Involution. Die Reaktion wurde in Gegenwart des Tdt-Enzyms durchgeführt. c. Parallel ausgeführter Kontroll-Assay ohne Tdt-Enzym. Vergrößerung in a. 1500x, in b., c. 750x. Apoptotische Kerne sind rotbraun gefärbt, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Die Morphologie der spezifisch angefärbten Kerne konnte recht unterschiedlich sein (Abbildung 19). Angefärbt wurden ansonsten noch gesund erscheinende, große Zellkerne, solche, die "pyknotisch" verändert schienen, bis hin zu bereits fragmentierten Kernen, deren einzelne Fragmente, in apoptotische Körperchen eingeschlossen, zum Teil bereits von Nachbarzellen phagozytiert worden waren; da solche eng beieinanderliegende Kernfragmente wahrscheinlich die Zerfallsprodukte eines einzelnen Kernes darstellen, wurden sie bei der Auswertung zusammengefaßt als ein einziger Kern gezählt. Daneben wurden auch die Kerne großer rundlicher, ins alveoläre Lumen abgegebener Zellen angefärbt.

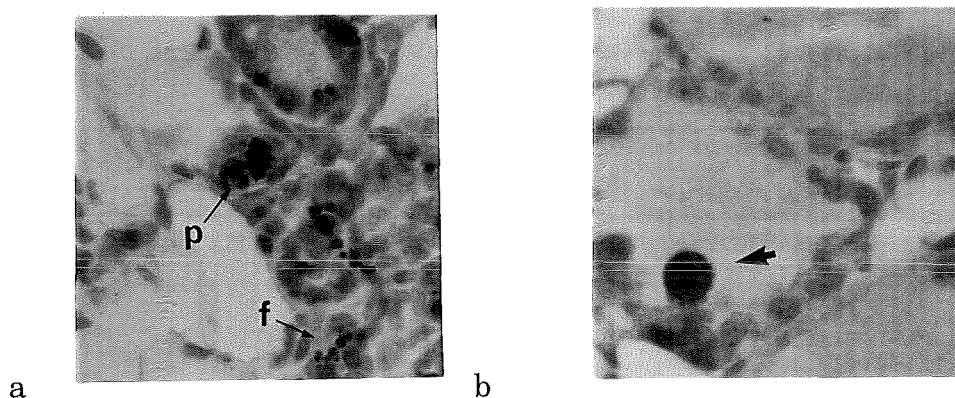


Abbildung 19. Unterschiedliche Morphologie mit dem TUNEL-Verfahren angefärbter (rotbraun) apoptotischer Kerne auf Mausbrustdrüsengewebe. a. Pyknotische und fragmentierte Kerne (P bzw. F). c. Große, ins alveoläre Lumen abgegebene apoptotische Zelle (Pfeil). Gegenfärbung: Hämatoxylin. Vergrößerung 1500x.

Für den zweiten und vierten Tag der Involution wurden jeweils 2 WAP-bcl-2-transgene und 2 Wildtypweibchen ausgewertet, für den dritten Tag jeweils 3 transgene bzw. 3 Wildtyptiere. Das zahlenmäßige Ergebnis, sowie die Anzahl pro Zeitpunkt unter dem Mikroskop ausgezählter Felder (200fache Vergrößerung) einschließlich statistischer Signifikanz ist in Tabelle 2 aufgeführt; die Kinetik der während der Involution auftretenden Apoptosen ist in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

Tabelle 2. Mittelwert±Standardabweichung der pro Feld (200x) ausgezählten apoptotischen Zellen im Involutionsexperiment.

Tag	wt*	WAP-bcl-2	Felder (wt; WAP-bcl-2)	$\alpha^{**}$
2	28,2±25,3	1,2±1,9	98;68	< 0,0001
3	152,2±58,9	22,4±18,3	32;42	< 0,0001
4	66,7±37,9	94,1±27,4	32;30	< 0,002

\* wt: Wildtypbrustdrüsen

\*\*Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit dem t-Test ermittelt

In Brustdrüsen von Wildtyp-Weibchen wurde bereits am zweiten Tag nach dem Absetzen eine hohe Zahl apoptotischer Kerne gefunden ( $28,2 \pm 25,3$  pro Feld). Die Alveoli waren weitlumig, stromales Fettgewebe kaum vorhanden. Allerdings wies die Brustdrüse eines der untersuchten Tiere stellenweise deutlich englumigere Alveoli auf; zudem waren Stränge von Fettgewebe zu beobachten (Abbildung 21a). Am darauffolgenden Tag erreichte die Anzahl apoptotischer Kerne mit  $152,2 \pm 58,9$  pro Feld ihren Gipfelpunkt. Die Alveoli waren durchweg englumiger, aber dennoch gut erhalten; das Stroma hatte prozentual größeren Anteil am Brustdrüsengewebe als am Vortag (Abbildung 21c). Am vierten Tag der Involution erschienen die Alveoli kollabiert; das Gewebe hatte seine für die Laktation charakteristische Strukturierung verloren: Anhäufungen von Zellen inmitten von Fettgewebe (Abbildung 21e). Die Zahl apoptotischer Kerne war gegenüber dem Vortag wieder zurückgegangen, lag mit  $66,7 \pm 37,9$  pro Feld aber immer noch höher als an Tag 2.

Bei den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Weibchen (Abbildung 21 b, d, f) lagen die Zahlen apoptotischer Kerne an den Tagen 2 und 3 der Involution deutlich unter den bei den Wildtypen gefundenen.; während am zweiten Tag mit  $1,2 \pm 1,8$  apoptotischen Kernen pro Feld kaum Apoptosen feststellbar waren, erreichte ihre Anzahl am Tag 3 ungefähr das Niveau der Wildtyp-Brustdrüse des Vortages ( $22,4 \pm 18,3$  pro Feld; der Unterschied zum Tag 2-Wert der Wildtyp-Brustdrüsen ist statistisch nicht signifikant). Interessanterweise weist die Brustdrüse der WAP-bcl-2-Weibchen am vierten Tag der Involution, an dem bei den Wildtypen die Zahl apoptotischer Kerne bereits wieder abfällt, eine höhere Anzahl apoptotischer Kerne auf als am dritten Tag. An diesem Tag war die Transgenexpression nur noch schwach (vgl. Abbildung 17). Histologisch bestehen an allen drei Tagen keine auffälligen Unterschiede zu den Wildtyp-Brustdrüsen (Abbildung 21); am vierten Tag waren bei einer der transgenen Brustdrüsen die Alveoli noch nicht vollständig kollabiert; gleichwohl war die Zahl apoptotischer Kerne gegenüber dem Vortag erhöht (nicht gezeigt).

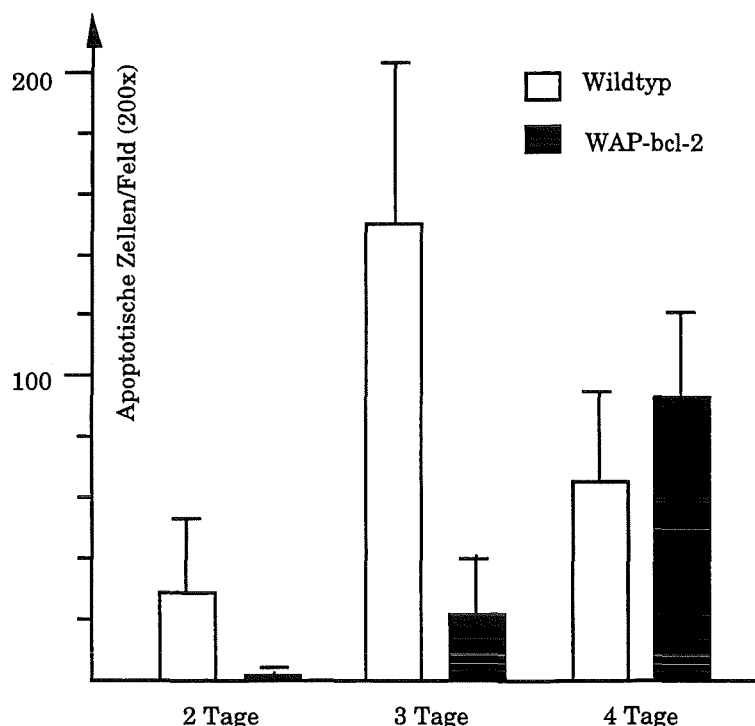


Abbildung 20. Kinetik des Auftretens apoptotischer Zellen in Brustdrüsen von WAP-bcl-2-transgenen (schwarze Balken) und von Wildtypmäusen (weiße Balken) während der postlaktationalen Involution. Apoptotische Kerne wurden auf Dünnschnitten mit dem TUNEL-Verfahren spezifisch angefärbt. Angegeben ist ihre Anzahl pro mikroskopisches Beobachtungsfeld in einer 200fachen Vergrößerung an den verschiedenen Tagen der Involution. Fehlerbalken repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.



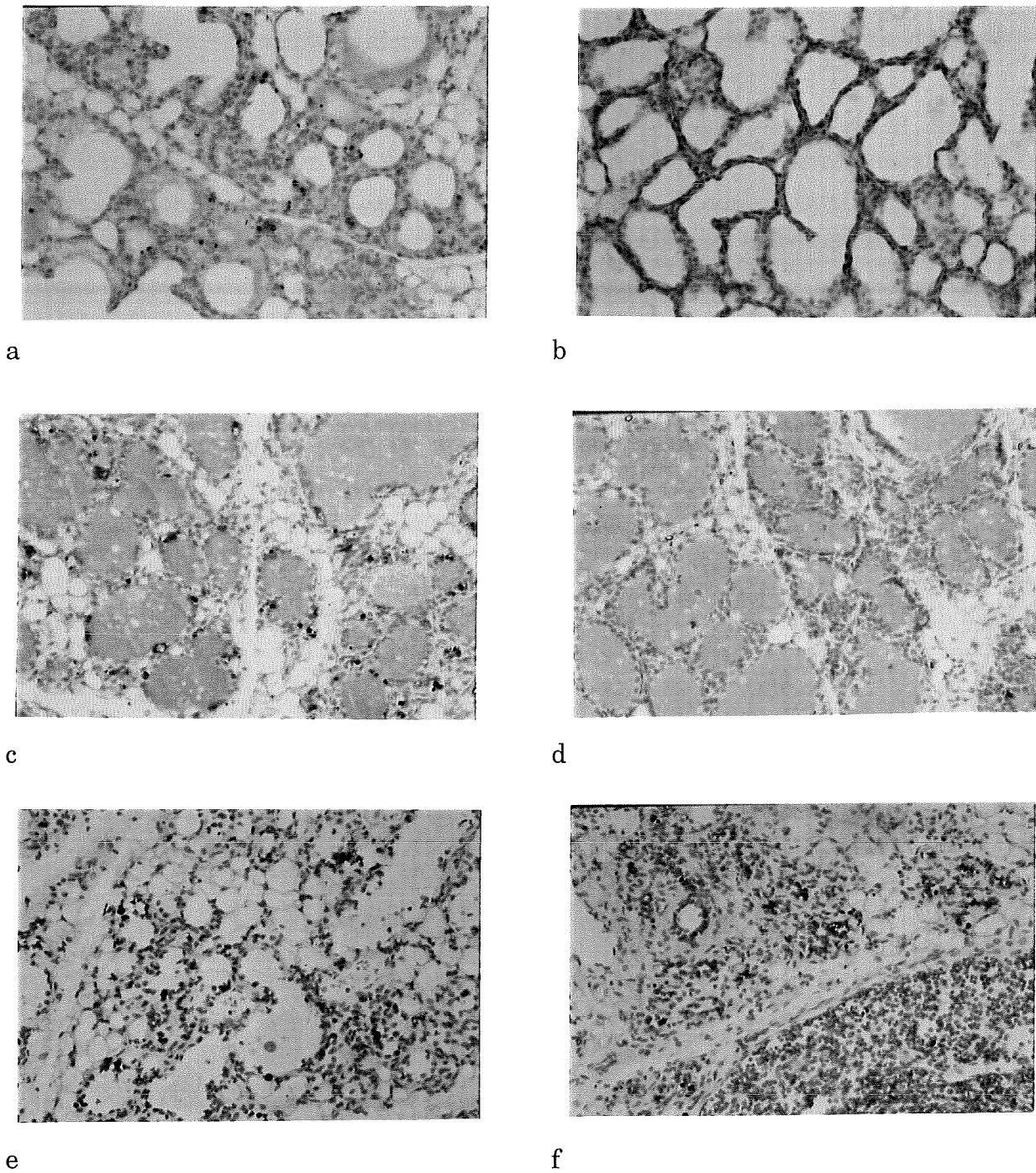


Abbildung 21. TUNEL-Assay auf Dünnschnitten durch Mausbrustdrüsengewebe an Tag 2 (a, b), 3 (c, d) und 4 (e, f) der postlaktationalen Involution in Wildtyp- (a, c, e) und WAP-bcl-2-transgenen Mäusen (b, d, f). Apoptotische Kerne sind rotbraun angefärbt. In (f) ist ein Teil des Lymphknotens getroffen. Gegenfärbung: Hämatoxylin. Vergrößerung 500x.

Bcl-2-Expression korreliert somit mit der verminderten Zahl apoptotischer Kerne, nicht jedoch mit dem histologischen Erscheinungsbild der Brustdrüsen. Folglich vermag Bcl-2 die Apoptose alveolärer Epithelzellen während der Involution zu unterdrücken, ohne die Dedifferenzierung des milchsezernierenden Epithels zu verzögern. Dies wurde auch durch Anfertigen von Totalpräparaten von Brustdrüsen von transgenen und Wildtyp-Mäusen am Tag 4 der Involution bestätigt; diese unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander (Abbildung 22).

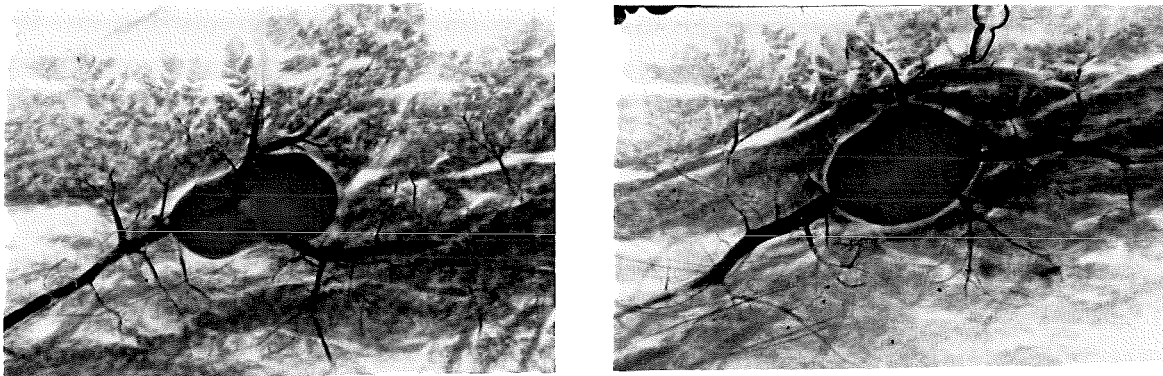


Abbildung 22. Ausschnitt aus den Totalpräparaten von Brustdrüsen am 4. Tag der Involution von Wildtyp- (links) bzw. WAP-bcl-2-transgenen Mäusen (rechts). Färbung: Karmin. Die rote, rundliche Struktur stellt den Lymphknoten dar, zu dem dunkelbraun gefärbte Blutgefäße laufen. An der Randzone erkennbar sind die bäumchenartig verzweigten Milchgänge, die von kollabierten Alveolen umgeben sind (rotbraun). Vergrößerung 30x.

### **(b) Expression involutions-assoziiierter Transkripte**

Während der postlaktationalen Involution ändert sich das Expressionsmuster bestimmter in der Brustdrüse exprimierter Gene (Strange et al., 1992). Während die Milchproteingene, beispielsweise das WAP- und das  $\beta$ -casein-Gen, herunterreguliert werden, werden bestimmte Gene induziert. Zu diesen involutions-assoziierten Transkripten gehören SGP-2, p53 und TGF- $\beta$ 1. SGP-2 (Schwefelhaltiges Glycoprotein 2), auch TRPM-2 oder Clusterin genannt, ist ein Zelloberflächenprotein, dessen Expression charakteristisch für apoptotisch zugrundegehende Epithelzellen ist (Wong et al., 1993; Wong et al., 1994). Sowohl p53 (genauer gesagt: eine mutante Form des Proteins mit Eigenschaften des Wildtyp-Proteins) als auch TGF- $\beta$ 1 (Tumor-Wachstumsfaktor  $\beta$ 1) konnten nach Überexpression in den Brustdrüsen transgener Mäuse Apoptose alveolärer Zellen auslösen (Li et al., 1996; Kordon

et al., 1995). Möglicherweise kommt diesen Genen somit kausale Bedeutung in der Regulation der Apoptose alveolärer Zellen während der Involution zu. Um festzustellen, ob die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 auf der Regulation dieser Transkripte beruht, wurde daher untersucht, ob die Kinetik ihrer Expression in den Brustdrüsen während der Involution in WAP-bcl-2-transgenen Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen verschieden ist.

Abbildung 23 zeigt die Northern Blot-Analyse von aus Brustdrüsen zu verschiedenen Zeitpunkten der Involution isolierter RNA. Zur Standardisierung wurde der Blot gegen eine GAPDH-cDNA hybridisiert. Offensichtlich nimmt die GAPDH-Expression im Laufe der Involution zu. Wie der Vergleich der auf das Gel aufgetragenen RNA-Menge nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht zeigte, reflektiert die Signalstärke innerhalb eines Zeitpunktes aber die aufgetragene RNA-Menge in den Transgen- bzw. Wildtyp-Spuren (Daten nicht gezeigt). Somit kann das jeweilige GAPDH-Signal zur Abschätzung der relativen Menge der übrigen Transkripte während ein und desselben Zeitpunktes herangezogen werden; beispielsweise ist am Tag 3 in der Transgenspur (+) etwas mehr RNA aufgetragen als in der Wildtypspur (-), am Tag 2 ist das Mengenverhältnis umgekehrt.

Das SGP-2-Transkript ist während der Laktation und des ersten Tages der Involution nicht nachweisbar. An Tag 2 kommt es allerdings zu einem starken Anstieg der Expression; bei der transgenen Maus ist die Transkriptmenge zunächst größer, um an den Folgetagen allmählich und nicht vom Wildtypen verschieden abzufallen.

TGF- $\beta$ 1 und p53 zeigen einen parallelen Verlauf, der sich zwischen den Transgenen und den Wildtypen nicht unterscheidet; beide werden ab dem ersten Tag in zunehmender Menge exprimiert.

Umgekehrt geht die Expression der  $\beta$ -casein-RNA sowohl in den transgenen als auch in den Wildtyp-Brustdrüsen von der starken Expression während der Laktation und auch noch am Tag 1 kontinuierlich zurück; lediglich während der Laktation ist die Expression in den Transgenen stärker. Eine parallelen Verlauf nimmt auch die WAP-Expression; indes fällt das Expressionsniveau steiler ab, so daß ab dem dritten Tag keine WAP-Expression mehr nachweisbar ist.

Demnach sind zwar Unterschiede in der Transkriptmenge von SGP-2 und  $\beta$ -Casein und WAP an Tag 2 bzw. 0 zwischen den Transgenen und den Wildtypen feststellbar. (Zumindest im Fall des  $\beta$ -Casein-Transkriptes könnte

dies einen individuellen Unterschied zwischen den untersuchten Tieren darstellen, da beispielsweise in Abbildung 14 ein solcher Unterschied nicht festgestellt wurde.) Das WAP-bcl-2-Transgen hat aber offensichtlich keinen Einfluß auf die weitere Kinetik der Expression der involutions-assoziierten Transkripte.

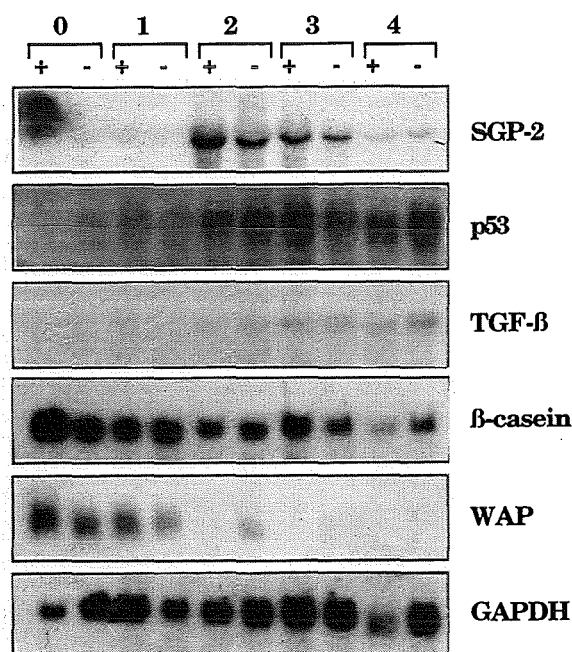


Abbildung 23. Northern Blot-Analyse der Expression der angegebenen Transkripte während der postlaktationalen Involution (Tage 0 bis 4) des Brustdrüsenepithels von WAP-bcl-2-transgenen Mäusen der Linie 1182 (+) bzw. Wildtypmäusen (-). 15 µg Gesamt-RNA aus Brustdrüsen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Membran nacheinander mit den angegebenen <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Zwischen den jeweiligen Hybridisierungen wurde die zuvor gebundene Sonde entfernt.

### (c) Inhibition p53-abhängiger Apoptose in den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Mäuse

Die Apoptose alveolärer Epithelzellen während der postlaktationalen Involution wird sehr wahrscheinlich nicht vom Tumorsuppressor-Protein p53 vermittelt (p53-unabhängige Apoptose; Li et al., 1996c). Andererseits existieren transgene Mäuse, in denen die brustdrüsen-spezifische Überexpression einer mutanten Form von p53 zur Apoptose alveolärer Brustepithelzellen am Ende der Schwangerschaft führt (Li et al., 1996a). In der im Transgen unter der Kontrolle des WAP-Promotors der Ratte stehenden p53-Mutante ist die

Aminosäure Arginin an Position 172 durch die Aminosäure Leucin ersetzt. Homologe Mutationen wurden in menschlichen Brusttumorbiopsien gefunden und zeigten *in vitro* Eigenschaften des Wildtyp-Proteins (Ory et al., 1994). Entsprechend scheint die Mutante in den Brustdrüsen der transgenen WAPp53-Mäuse Eigenschaften des Wildtypmoleküls zu besitzen, indem sie MDM-2- und p21/WAF-1-mRNA-Expression induziert und PCNA-Expression reprimiert (Li et al., 1994 und 1996a). Zudem ist, möglicherweise als Konsequenz der Induktion von Apoptosen alveolärer Zellen, das Brustdrüsenepithel am Ende der Schwangerschaft unterentwickelt, und die Tiere können nur eingeschränkt laktieren. Die WAPp53-transgenen Mäuse können daher als ein experimentelles Modell p53-abhängiger Apoptose im Brustepithel verstanden werden.

Um zu testen, ob die Expression von Bcl-2 die p53-abhängige Apoptose alveolärer Zellen zu unterdrücken vermag, wurden daher WAPp53-Mäuse mit WAP-bcl-2-Transgenen der Linie 1182 gekreuzt. Unter den Nachkommen wurde das WAP-bcl-2-Transgen per PCR mit den Primern bcl-s und bcl-as nachgewiesen (Abbildung 5); zum PCR-Nachweis des WAPp53-Transgens dienten die Primer WAPforw und p53rev, die spezifisch ein 1,2 kb-Fragment amplifizieren (Abbildung 24). Die so ermittelten weiblichen Nachkommen der F1-Generation, die einzeltransgen WAPp53 bzw. doppelt-transgen WAPp53/WAP-bcl-2 waren, wurden unter folgenden Gesichtspunkten verglichen:

- (1) Fähigkeit zur Laktation,
- (2) Ausbildung des Brustepithels, sowie
- (3) Anzahl apoptotischer Zellen im Brustepithel.

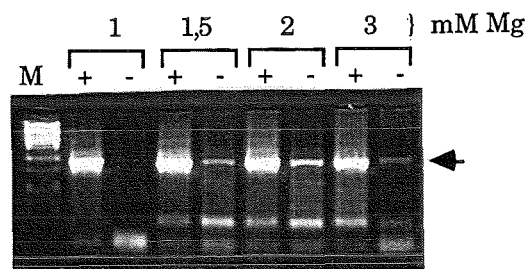


Abbildung 24. PCR-Nachweis des WAPp53-Transgens. Gezeigt ist die Etablierung der PCR mit verschiedenen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen. Bei einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 1 mM amplifizieren die Primer WAPforw und p53rev von genomischer DNA einer WAPp53-transgenen (+), nicht jedoch einer WAP-bcl-2-transgenen Maus (-) ein spezifisches 1,2 kb-Fragment (Pfeil). Für die weiteren Analysen wurde die PCR mit 1 mM  $Mg^{2+}$  durchgeführt. M: Pst I-verdaute  $\lambda$ -DNA als Größenstandard.

Zunächst wurden je ein WAPp53-einzeltransgenes bzw. ein WAPp53/WAP-bcl-2-doppelt-transgenes Weibchen mit einer männlichen Maus verpaart, um Schwangerschaft zu erzielen. Beide Weibchen schienen die 7 jeweils geworfenen Nachkommen zunächst zu säugen, was man anhand der Milch im Verdauungstrakt der Neugeborenen, die weißlich durch die Bauchdecke scheint, gut sehen konnte. Allerdings erschienen 9 Tage nach dem Werfen die Jungen in beiden Fällen unterentwickelt, was auf eine Unterversorgung mit Milch schließen läßt. Daher wurden die Muttertiere an diesem Tag getötet und die Brustdrüsen entnommen. Die Jungen wurden gewogen. Im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Alters (Gewicht gewöhnlich um 6 g) waren sie leichter. Allerdings waren die Nachkommen der WAPp53/WAP-bcl-2-transgenen Mutter mit  $4,0 \pm 0,27$  g Durchschnittsgewicht zwar nur geringfügig, gleichwohl signifikant schwerer als die der einzeltransgenen WAPp53-Mutter ( $3,66 \pm 0,25$  g;  $\alpha < 0,05$  [t-Test]). Nimmt man dies als Gradmesser der Laktation des Muttertieres, so folgt daraus, daß in beiden Tieren die Laktation gestört war, wenngleich in einem etwas geringeren Grad in der doppelt-transgenen Maus.

Die histologische Untersuchung der inguinalen Brustdrüsen beider Muttertiere erbrachte, daß in der Tat bei beiden Tieren das Brustepithel nicht vollständig ausgebildet war. Die Alveoli waren englumiger als gewöhnlich; zudem war ein beträchtlicher Anteil stromales Fettgewebe zu erkennen, das am Tag 9 der Laktation normalerweise nicht vorhanden ist (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise ergab der TUNEL-Assay (Abbildung 25), daß in den Brustdrüsen beider Tiere kaum apoptotische Zellen vorhanden waren:  $1,18 \pm 1,56$  apoptotische Zellen pro Feld (200fache Vergrößerung) bei der WAPp53/WAP-bcl-2-Transgenen im Vergleich zu  $1,05 \pm 0,84$  bei der WAPp53-Einzeltransgenen (Unterschied nicht signifikant [t-Test]; ausgezählte Felder jeweils 10).

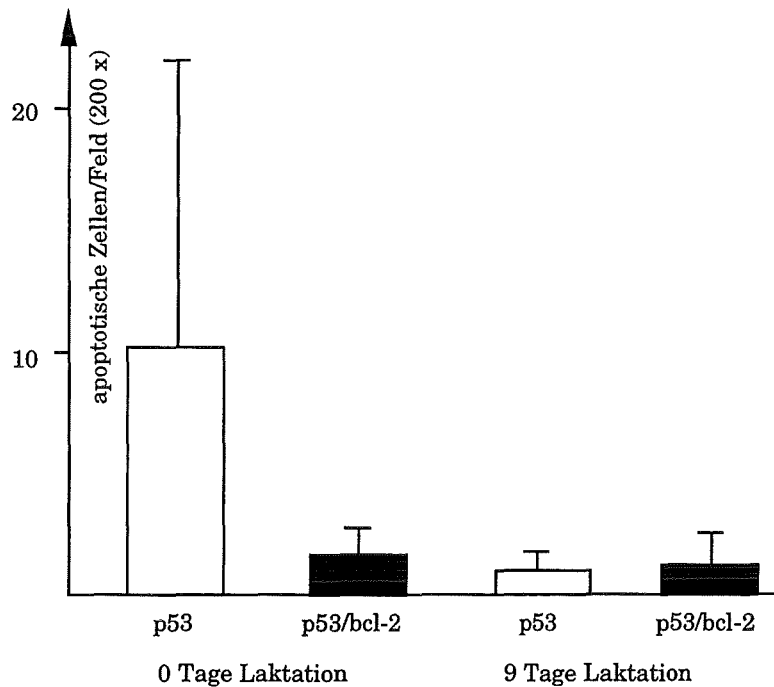


Abbildung 25. Apoptotische Zellen in den Brustdrüsen WAPp53-einzeltransgener (p53) und WAPp53/WAP-bcl-2-doppelt-transgener Mäuse. Angegeben sind die mit dem TUNEL-Verfahren detektierten Zellen pro mikroskopisches Feld (200fache Vergrößerung) am Tag des Werfens (0 Tage Laktation) bzw. 9 Tage nach dem Werfen (9 Tage Laktation). Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen.

Möglicherweise ist die Induktion der Apoptose in den Brustdrüsen WAPp53-transgener Mäuse nur auf eine bestimmte Phase während der Schwangerschaft und der frühen Laktation beschränkt. Daher wurde das Experiment mit je zwei weiteren Weibchen beider Genotypen wiederholt. Diesmal wurden die Brustdrüsen jedoch direkt am Tag des Werfens entnommen. Wie Abbildung 25 zeigt, wurde in den Brustdrüsen beider WAPp53-einzeltransgener Weibchen tatsächlich eine erhöhte Apoptoserate gefunden ( $10,3 \pm 11,8$  apoptotische Zellen pro Feld [200-fache Vergrößerung]), die in den Brustdrüsen beider doppelt-transgener Weibchen deutlich reduziert war ( $1,5 \pm 1,3$  apoptotische Zellen pro Feld [200fache Vergrößerung]). Unglücklicherweise waren alle 4 Präparate schlecht fixiert oder schlecht in Paraffin eingebettet, so daß sich in vielen Regionen Kerne vom Objekt ablösen. Da nicht klar war, wo dies gegebenenfalls den TUNEL-Assay beeinflusste, wurden je Tier zwei Dünnschnitte durch die linke inguinale Brustdrüse über die fast gesamte Schnittfläche ausgezählt (à jeweils 20 Felder in den Doppelt- bzw. 17 Felder in den Einzeltransgenen). Diese Schwierigkeit mag teilweise für die starke Streuung der Zahlenwerte verantwortlich sein, die zudem bei der

statistischen Auswertung die Anwendung eines nicht-parametrischen Verfahrens erforderlich machte. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen (WAPp53- bzw. WAPp53/WAP-bcl-2-Mäuse) erwies sich dabei als hochsignifikant ( $\alpha < 0,01$ ; U-Test). Bemerkenswerterweise traten in den Brustdrüsen beider Gruppen relativ häufig Apoptosen in duktalem Zellen auf. - Histologisch bestanden hingegen keine augenfälligen Unterschiede zwischen den Präparaten: beide Gruppen wiesen englumigere Alveoli sowie Anteile stromalen Fettgewebes auf; das Epithel erschien nicht vollständig ausdifferenziert (Daten nicht gezeigt).

Das eingekreuzte WAP-bcl-2-Transgen vermag somit die am Tag des Werfens erhöhte Apoptoserate in den Brustdrüsen WAPp53-transgener Mäuse zu reduzieren. Zwar wurde die Expression des WAPp53-Transgens in den doppelt-transgenen Mäusen nicht untersucht. Die Schwierigkeiten in der Laktation sowie das unterentwickelte Brustepithel lassen jedoch auf die Expression schließen. Demnach vermag Bcl-2-Überexpression mit p53-abhängiger Apoptose in alveolären Zellen zu interferieren.

#### **(d) Einfluß des WAP-bcl-2-Transgens auf durch ein WAP-TGF- $\beta$ 1-Transgen ausgelöste Laktationsinsuffizienz und erhöhte Apoptoserate des Brustepithels**

Weibliche transgene Mäuse, die die cDNA des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 unter der Kontrolle des WAP-Promotors in ihren Brustdrüsen überexprimieren, sind unfähig zu laktieren. Wie die histologische Untersuchung zeigte, erfolgt in den Brustdrüsen dieser Tiere normales duktales Wachstum; allerdings entwickeln sich während der Schwangerschaft keine alveolären Strukturen (Jhappan et al., 1993). Zudem wurde am Tag des Werfens eine gegenüber Wildtyptieren erhöhte Apoptoserate im unterentwickelten Brustepithel gefunden (Kordon et al., 1995). Daher wurde geprüft, ob durch Einkreuzen des WAP-bcl-2-Transgens (1) die WAP-TGF- $\beta$ 1-assoziierte erhöhte Apoptoserate aufgehoben werden kann, (2) die Entwicklung alveolärer Strukturen wieder hergestellt wird und (3) ob die Tiere wieder laktieren können.

Zu diesem Zweck wurden WAP-bcl-2-transgene Weibchen der Linie 1182 mit einem WAP-TGF- $\beta$ 1-transgenen Männchen verpaart und unter den Nachkommen diejenigen Tiere identifiziert, die entweder nur das WAP-TGF- $\beta$ 1- oder sowohl dieses als auch das WAP-bcl-2-Transgen in ihrem Genom



trugen. Das WAP-bcl-2-Transgen wurde mit dem beschriebenen PCR-Verfahren nachgewiesen. Der Nachweis des WAP-TGF- $\beta$ 1-Transgens erfolgte per Southern Blot-Analyse Asp718-geschnittener genomischer DNA. Wie Abbildung 26 zeigt, hybridisiert die radioaktiv markierte TGF- $\beta$ 1-Sonde an ein (erwartungsgemäß, vgl. Jhappan et al., 1993) 1,35 kb großes DNA-Fragment.

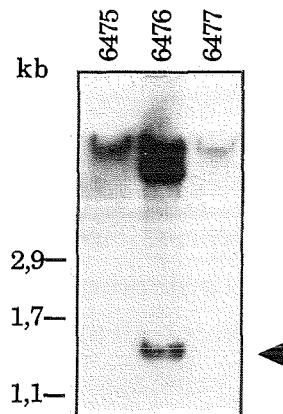
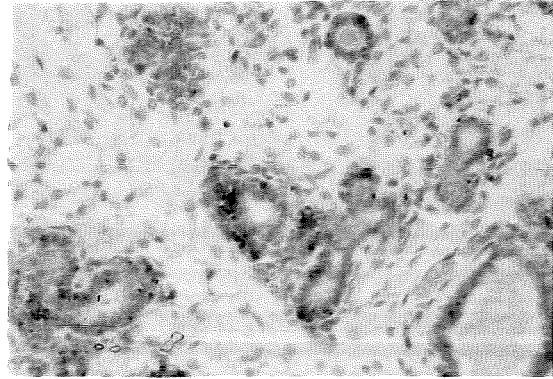
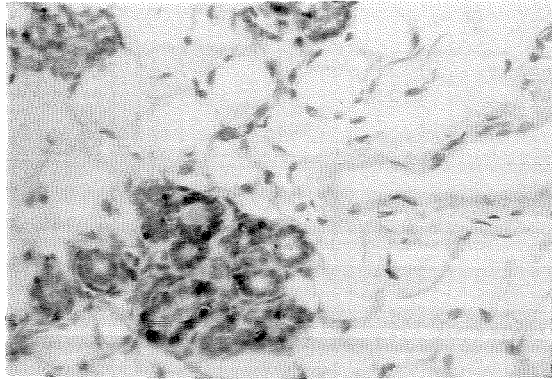


Abbildung 26. Genomischer Southern Blot zum Nachweis des WAP-TGF $\beta$ 1-Transgens. Genomische DNA der angegebenen Mäuse (Nummern) wurde nach Asp 718-Restriktion gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten bcl-2-cDNA-Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt auf die transgenspezifische 1,35 kb-Bande in der Spur des Tiers 6476.

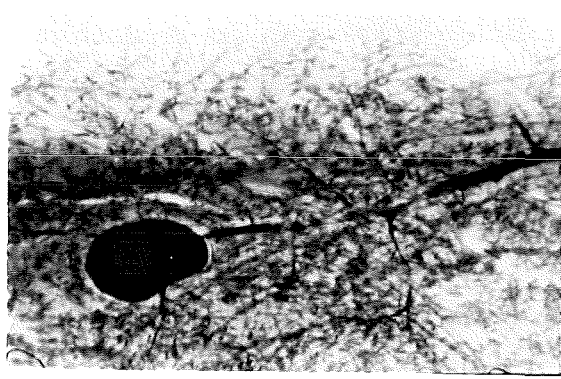
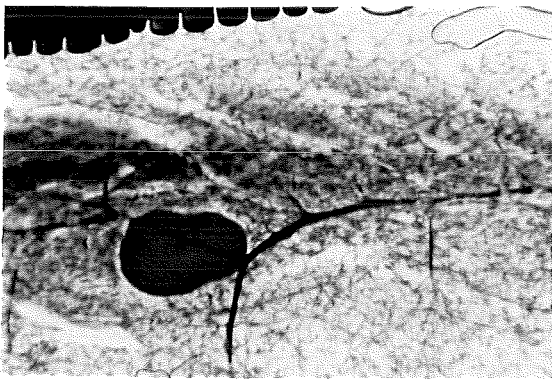
Auf diese Weise wurden 3 weibliche Tiere erhalten, die doppelt-transgen (WAP-bcl-2/WAP-TGF- $\beta$ 1) waren, sowie eines, das nur für das WAP-TGF- $\beta$ 1-Konstrukt transgen war. Diese Tiere wurden zur Erzielung eines Wurfes mit Männchen verpaart. Sodann wurde an zwei der doppelt-transgenen Weibchen untersucht, ob sie ihre Jungen zu säugen vermochten. Dem verbleibenden doppelt-transgenen sowie dem einzeltransgenen WAP-TGF- $\beta$ 1-Weibchen wurden am Tag des Werfens die inguinalen Brustdrüsen entnommen und mit dem TUNEL-Verfahren auf das Auftreten von Apoptosen untersucht.

Das Experiment erbrachte folgendes Ergebnis: Erstens waren die doppelt-transgenen Weibchen nicht in der Lage, ihre Jungen zu säugen; dies war bei jeweils insgesamt drei Würfen der Fall. Zweitens unterschieden sich die Doppelt- nicht von den Einzeltransgenen hinsichtlich der Anzahl in der Brustdrüse detektierter apoptotischer Zellen (Abbildung 27). Drittens ist in den in Abbildung 27 gezeigten Gewebeschnitten gut erkennbar, daß in den doppelt- wie auch den einzeltransgenen Weibchen das Brustdrüsenepithel in gleicher Weise unterentwickelt war: die Brustdrüsen enthielten nur wenige und zudem englumige oder gar nicht entwickelte alveoläre Strukturen. Dies wurde auch

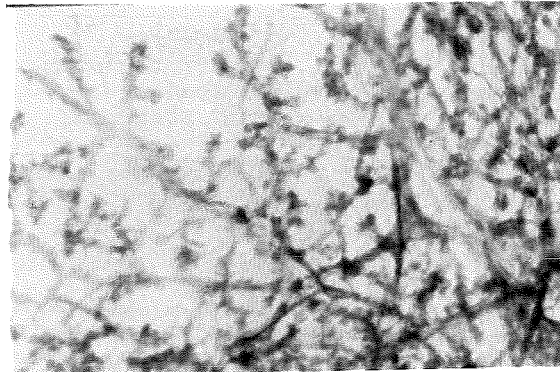
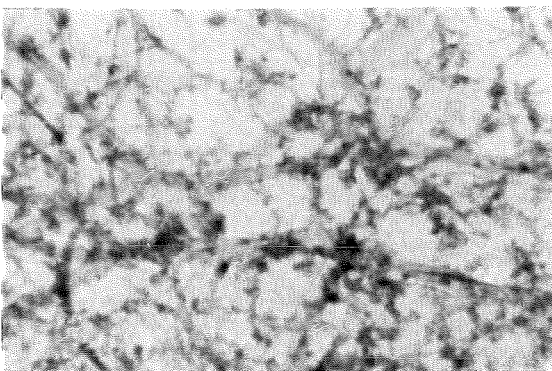
durch Anfertigen von Totalpräparaten der jeweils zweiten inguinalen Brustdrüse bestätigt (Abbildung 27b, c).



a



b



c

Abbildung 27. Histologie der Brustdrüsen von WAP-TGF- $\beta$ 1-transgenen (links) bzw. von WAP-TGF- $\beta$ 1/WAP-bcl-2-doppelt-transgenen Mäusen (rechts). Gezeigt ist in a. jeweils ein Ausschnitt des TUNEL-Assays (Vergrößerung 750x) und in b, c. jeweils ein Totalpräparat einer Brustdrüse (Vergrößerung 30x bzw. 120x); bei der großen rundlichen Struktur handelt es sich um den Lymphknoten. c zeigt einen Ausschnitt bei stärkerer Vergrößerung, der die duktaalen sowie die knötchenartigen unterentwickelten alveolären Strukturen erkennen läßt (Karmin-Färbung). Gegenfärbung in a.: Hämatoxylin; apoptotische Kerne: rotbraun.

Demzufolge vermag das eingekreuzte WAP-bcl-2-Transgen weder die erhöhte Apoptoserate, noch die wahrscheinlich zur Laktationsinsuffizienz beitragende Unterentwicklung alveolärer Strukturen in den Brustdrüsen WAP-TGF- $\beta$ 1-transgener Mäuse aufzuheben.

### 3.2.2. Experimente zur Tumorigenese

#### 3.2.2.1. Einfluß von Bcl-2 auf die Tumorigenese der Brustdrüse

##### (a) Kooperation mit c-myc in der Entstehung von Brusttumoren

Da Bcl-2-Expression in menschlichen Brusttumoren gefunden wird (vgl. Einleitung), war zunächst von Interesse, ob dies auch für Brusttumore der Maus zutrifft. Um dies zu untersuchen, wurden von Dr. A.-C. Andres (Institut für klinische und experimentelle Forschung, Universität Bern) RNA aus 3 WAPmyc- bzw. 2 WAPras-Transgen-induzierten Brusttumoren der Maus (Andres et al., 1987; Schoenenberger et al., 1988) zur Verfügung gestellt. Tatsächlich ließ sich in allen Proben per RT-PCR mit den Maus-bcl-2 $\alpha$ -spezifischen Oligonukleotid-Primern 6F und 8R bcl-2-mRNA nachweisen (Abbildung 28).

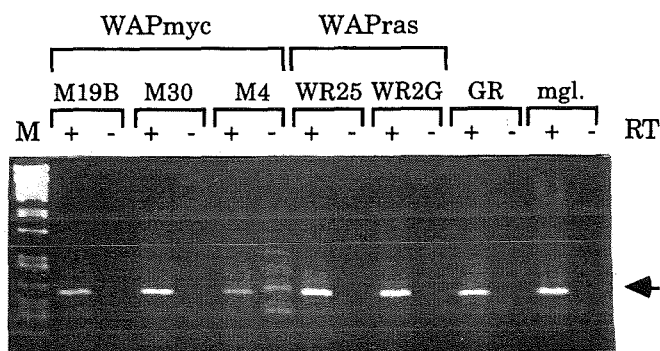


Abbildung 28. RT-PCR-Amplifikation des Maus-bcl-2-Transcripts in RNA aus Brusttumoren transgener Mäuse. 100 ng Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus den angegebenen Proben wurde mit dem Primer 8R revers transkribiert (+RT) und schließlich mit den Primern 6F und 8R amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt; der Pfeil markiert das spezifische 328 bp-Amplifikationsprodukt. Als Positivkontrolle wurde RNA aus der murinen Brusttumorzelllinie GR und aus Brustdrüsengewebe (mgl.) RT-PCR-amplifiziert; Negativkontrollen sind die jeweiligen nicht revers transkribierten Ansätze (-RT). M: Pst I-verdaute  $\lambda$ -DNA als Größenstandard.

Somit stellte sich die Frage, ob die starke Bcl-2-Überexpression in den Brustdrüsen Wap-bcl-2-transgener Mäuse die Entstehung von Tumoren begünstigt. Allerdings wurde in bis zu anderthalb Jahre alten transgenen Weibchen, die mehrere Schwangerschaften durchgemacht hatten, keine spontanen Tumore beobachtet. Daher wurde untersucht, ob Bcl-2 einen Einfluß auf die Entstehung von Brusttumoren hat, die durch transgene Überexpression eines Onkogens verursacht werden. Für dieses Experiment wurden MMTVmyc-transgene Mäuse gewählt, die das c-myc-Protoonkogen unter der Kontrolle des MMTV-LTR in ihren Brustdrüsen überexprimieren (Stewart et al., 1984). In diesen Tieren entstehen nach einer mehrmonatigen Latenzzeit klonale Brusttumore, die palpierbar und von außen mit dem Auge gut zu erkennen sind. Latenzzeit und Klonalität der entstehenden Tumore sind deutliche Hinweise, daß über die c-Myc-Expression hinausgehende genetische oder epigenetische Veränderungen zur Tumorentstehung erforderlich sind. Daher wurde untersucht, ob Bcl-2-Expression eine solche Veränderung darstellen kann, d.h. ob in Tieren, die gleichzeitig Bcl-2 und c-Myc in ihren Brustdrüsen überexprimieren, die Tumorlatenzzeit verringert ist.

Zu diesem Zweck wurden MMTVmyc- mit WAP-bcl-2-Transgenen gekreuzt. Doppelt-transgene WAP-bcl-2/MMTVmyc- bzw. einzeln-transgene MMTVmyc-Weibchen wurden mit einem PCR-Verfahren unter Zuhilfenahme für die jeweiligen Transgene spezifischer Oligonukleotid-Primerpaare identifiziert. Für das WAP-bcl-2-Transgen wurde die bereits bekannte PCR mit den Oligonukleotidprimern bcl-s und bcl-as (Abbildung 5) angewandt; zum Nachweis des MMTVmyc-Transgens dienten die Primer Myc 1 und Myc 2, die spezifisch ein 825 bp-Fragment amplifizieren (Abbildung 29).

Die WAP-bcl-2-transgenen Mäuse gingen aus DBA/2 x C57Bl6-Embryonen hervor und wurden durch Kreuzen mit DBA-2-Mäusen über mehrere Generationen in einen genetischen DBA/2-Hintergrund gebracht. Dagegen ist der genetische Hintergrund der MMTVmyc-Transgene FVB/N. In verschiedenen Inzuchtstämmen ist die Inzidenz spontaner Brusttumore oft unterschiedlich (Green, 1966). Um einen Einfluß möglicherweise unterschiedlicher Brustkrebs susceptibilitäten zu vermeiden, wurden nur aus der Kreuzung beider Transgenstämme resultierende F1-Tiere in die Untersuchung einbezogen; sie sind genetisch identisch.

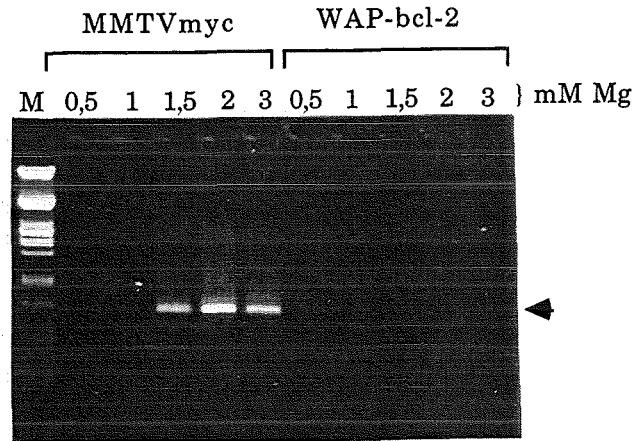


Abbildung 29. PCR-Nachweis des MMTVmyc-Transgens. Gezeigt ist die Etablierung der PCR mit verschiedenen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen. Bei einer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration zwischen 1,5 und 3 mM amplifizieren die Primer Myc 1 und Myc 2 von genomischer DNA einer MMTVmyc-transgenen, nicht jedoch einer WAP-bcl-2-transgenen Maus ein spezifisches 825 bp-Fragment (Pfeil). Für die weiteren Analysen wurde die PCR mit 2 mM Mg<sup>2+</sup> durchgeführt. M: Pst I-verdaute  $\lambda$ -DNA als Größenstandard.

Allerdings könnte das WAP-bcl-2-Transgen auf einem C57Bl6-Chromosom kartieren, welches mithin nur in den Doppelt-Transgenen vorhanden wäre und ebenfalls die Tumorentstehung beeinflussen könnte. Darüberhinaus könnte das Transgen einen weiteren Locus bei der Insertionsstelle beeinflussen, der auch mit der Tumorentstehung zu tun haben könnte. Um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, daß eine dieser möglichen Konstellationen den Ausgang des Experiments bestimmt, wurde die Kreuzung und Untersuchung der Tumorigenese mit Tieren beider Linien, WAP-bcl-2 965 und 1182, durchgeführt.

Daher stellte sich zunächst die Frage, ob das WAP-bcl-2-Transgen in Weibchen der Linie 965 ähnlich wie bei der Linie 1182 funktionell aktiv ist. Als Assay hierfür wurde an zwei aus der WAP-bcl-2 x MMTVmyc-Kreuzung hervorgegangenen weiblichen F1-Tieren, die entweder nur das WAP-bcl-2-Transgen in ihrem Genom trugen oder Wildtyp waren, untersucht, ob das transgene Bcl-2 die involutions-assoziierte Apoptose alveolärer Epithelzellen zu unterdrücken vermag. Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, war dies am dritten Tag der Involution in ähnlichem Ausmaße der Fall wie bei Weibchen der Linie

1182: während das Wildtypweibchen  $155,8 \pm 57$  apoptotische Kerne pro Feld (200fache Vergrößerung) aufwies, war diese Zahl beim WAP-bcl-2-transgenen mit  $43,2 \pm 38,5$  deutlich vermindert ( $\alpha < 0,0001$ ; t-Test).

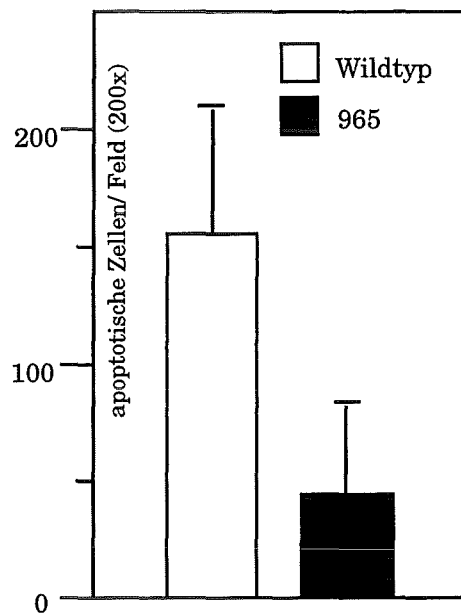


Abbildung 30. Anzahl apoptotischer Zellen in den Brustdrüsen einer WAP-bcl-2-transgenen Maus der Linie 965 (schwarze Balken) und einer gleichaltrigen Wildtypkontrollmaus (weiße Balken) am Tag 3 der postlaktationalen Involution. Apoptotische Kerne wurden auf Dünnschnitten mit dem TUNEL-Verfahren spezifisch angefärbt. Angegeben ist ihre Anzahl pro mikroskopisches Beobachtungsfeld in einer 200fachen Vergrößerung. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.

Weiterhin mußte für das Experiment noch beachtet werden, daß das WAP-bcl-2-Transgen am stärksten während der Laktation exprimiert wird. Daher wurden (gleichaltrige) doppelt- bzw. einzeltransgene Weibchen permanent mit Männchen zusammen gehalten; auf die Weise wurde erreicht, daß die Tiere etwa alle drei Wochen schwanger wurden. Die Tiere wurden vom Zeitpunkt ihrer Verpaarung an einmal wöchentlich auf Anwesenheit sicht- und palpierbarer Tumore untersucht.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 31 graphisch dargestellt.

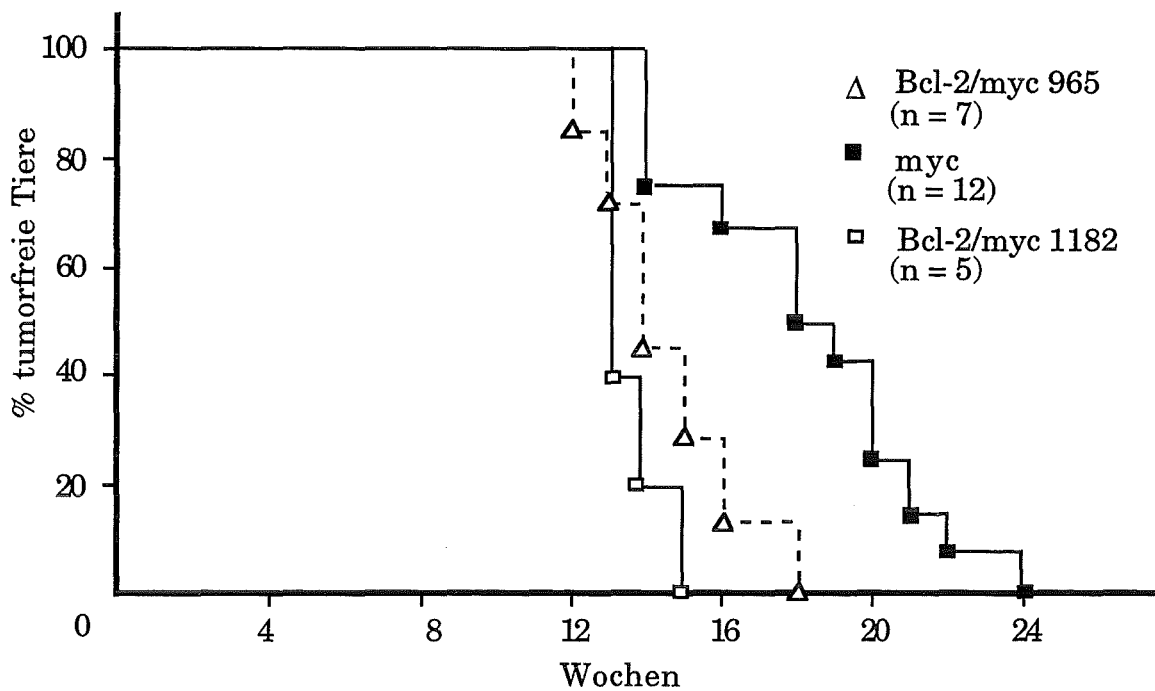


Abbildung 31. Verlauf der Tumorentstehung in weiblichen doppelt-transgenen (WAP-bcl-2/MMTVmyc) Tieren der Linien 1182 (Bcl-2/myc 1182; Dreiecke) bzw. 965 (Bcl-2/myc 965; offene Vierecke) sowie in einzeltransgenen MMTVmyc-Weibchen (myc; schwarze Vierecke). Aufgetragen ist der Prozentsatz tumorfreier Tiere über ihrem Lebensalter in Wochen. Da die Tiere nur einmal wöchentlich auf Tumore untersucht wurden, sind nur ganzzahlige Alterswerte angegeben.

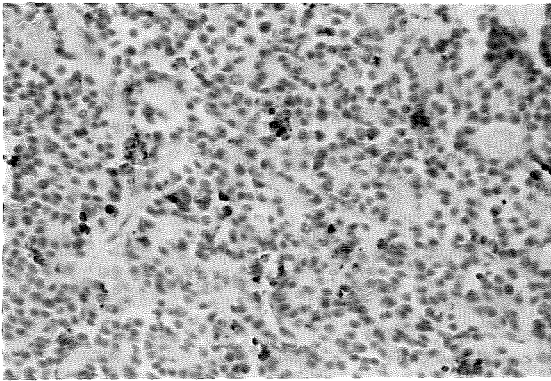
Aufgetragen ist hier der zu einem bestimmten Zeitpunkt noch tumorfreie Prozentsatz doppelt-transgener (WAP-bcl-2/MMTVmyc) Tiere beider WAP-bcl-2-Linien sowie einzeltransgener MMTVmyc-Mäuse. Deutlich erkennbar, setzt die Tumorentstehung in beiden Gruppen doppelt-transgener Tiere früher ein und nimmt einen steileren Verlauf. Doppelt-transgene Tiere entwickelten bereits nach 12 bzw. 13 Wochen Tumore während dies bei einzeltransgenen frühestens nach 14 Wochen der Fall war. Bereits nach 15 Wochen hatten alle doppelt-transgenen Tiere der Linie 1182 Tumoren; bei den Einzel-Transgenen MMTVmyc-Mäusen war dies zu diesem Zeitpunkt lediglich bei einem Viertel der Tiere der Fall, und erst nach 24 Wochen hatten alle Tiere Tumore. Bei den doppelt-transgenen Tieren der Linie 965 war der Verlauf der Tumorentstehung nicht ganz so steil wie bei Linie 1182; hier war erst nach 18 Wochen kein Tier mehr tumorfrei, allerdings war dies bei den einzeltransgenen MMTVmyc-Mäusen zu dieser Zeit immer noch die Hälfte der Tiere. Die mittlere Latenzzeit war mit  $13,6 \pm 0,9$  bzw.  $14,6 \pm 2$  bei den Linie 1182-

bzw. Linie 965- Doppelt-Transgenen signifikant gegenüber den MMTVmyc-Einzeltransgenen verkürzt ( $18,3 \pm 3,3$  Wochen.  $\alpha < 0,02$ ; t-Test).

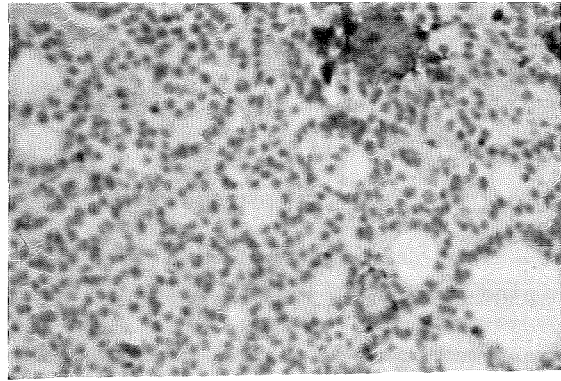
Die Tiere wurden getötet und seziiert, sobald einzelne Tumore eine Größe von etwa 1 cm Durchmesser erreichten. Zu dieser Zeit war die Anzahl makroskopisch erkennbarer Tumore in beiden Gruppen identisch ( $2,36 \pm 1,43$  in den doppelt-transgenen gegenüber  $2,4 \pm 1,65$  in den einzeltransgenen Tieren). Die Wachstumsgeschwindigkeit der gebildeten Tumore ist nicht gemessen worden. Dies erschien nicht sinnvoll, da die Tiere sich zum Zeitpunkt der Tumordetektion in unterschiedlichen Phasen der Schwangerschaft befanden, was die Transgenexpression in den Tumoren und ihr Wachstum möglicherweise beeinflusst; weitere Komplikationen bestanden in der unterschiedlichen Lage der Tumore, sowie der Beobachtung, daß manche nicht solide waren, sondern mit nekrotischer Flüssigkeit gefüllte Blasen darstellten.

Die entstandenen Tumore unterschieden sich in ihrer Histologie; neben gut differenzierten Karzinomen, die sich durch tubuläre oder alveoläre Strukturen auszeichneten, war bei anderen Tumoren eine an das Ursprungsgewebe gemahnende Differenzierung nicht zu erkennen. Dieses Spektrum möglicher histologischer Formen war zwischen doppelt- und einzeltransgenen Mäusen nicht unterschiedlich. Abbildung 32 gibt einen Eindruck hiervon. Gezeigt sind TUNEL-Assays, die gleichzeitig die Präsenz zahlreicher apoptotischer Zellen in den Tumoren demonstrieren. Die verschiedenen Tumortypen unterschieden sich in der Anzahl apoptotischer Zellen pro mikroskopisches Feld; allerdings variierten die einzelnen Regionen innerhalb eines Tumors mitunter stark. Generell bestand der Eindruck, daß ähnlich differenzierte Tumore in doppelt-transgenen Tieren eine geringere Anzahl apoptotischer Zellen aufwiesen. Angesichts der geringen Anzahl untersuchter Tumorproben und der doch großen Variabilität innerhalb der einzelnen Proben wurde auf eine Quantifizierung verzichtet.

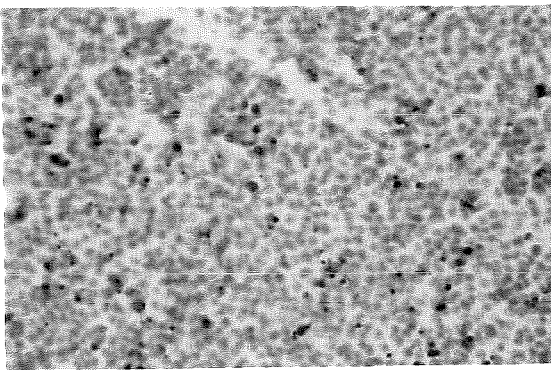




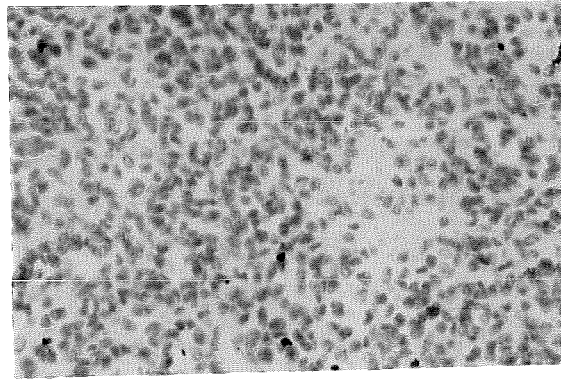
a



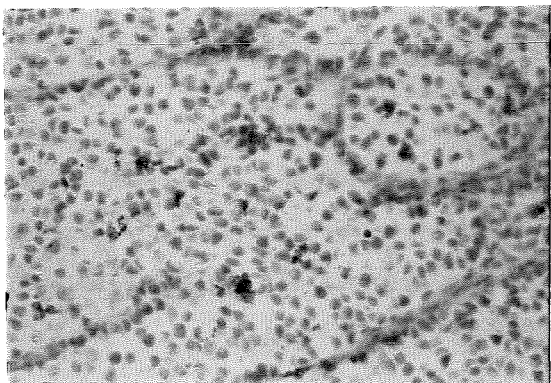
b



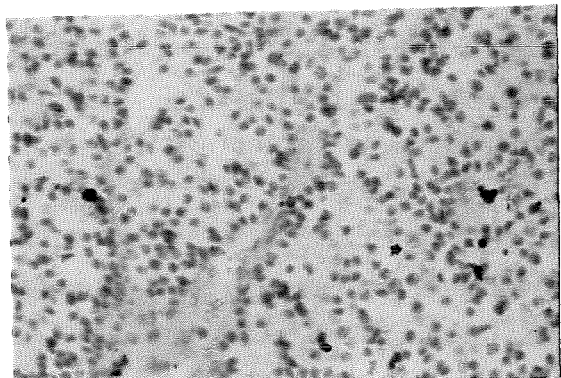
c



d



e



f

Abbildung 32. TUNEL-Assays an Brust-Tumoren von MMTVmyc-transgenen (a, c, e) bzw. WAP-bcl-2/MMTVmyc-doppelt-transgenen Mäusen (b, d, f) am Tag des Werfens. Apoptotische Kerne sind rotbraun gefärbt; Gegenfärbung: Hämatoxylin. Vergrößerung 500x.

Die Promotoren beider Transgene sind möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Zelltypen aktiv. Während für MMTV-getriebene Transgene frühe, laktationsunabhängige Expression, auch in duktalem Epithelzellen der Brust, beschrieben wurde, vermittelt der WAP-Promotor schwangerschafts- und laktationsabhängige Expression, die auf alveoläre Epithelzellen beschränkt ist (vergleiche die Diskussion in Kordon et al., 1996). Weiterhin interferierte das MMTVmyc-Transgen mit der Laktation, und Bcl-2-Expression vermochte dies nicht aufzuheben - sowohl doppelt- als auch einzeltransgene Weibchen konnten ihre Jungen nicht säugen. Die mithin verkürzte Laktationsphase könnte das Zeitfenster der Koexpression beider Transgene noch weiter verkleinern. Ferner könnte die c-Myc-Expression zur Herunterregulierung des WAP-bcl-2-Transgens führen. Daher wurde geprüft, ob in den Tumoren der WAP-bcl-2/MMTVmyc-doppelttransgenen Mäuse tatsächlich transgenes Bcl-2 exprimiert wurde. Wie aus der in Abbildung 33 gezeigten Western Blot-Analyse hervorgeht, exprimierten alle auf diese Weise untersuchten Tumore das menschliche, somit vom WAP-bcl-2-transgen herrührende Bcl-2-Protein. Unter der Annahme, transgenes c-Myc werde in den Tumoren exprimiert, zeigt dies, daß MMTVmyc- und WAP-bcl-2-Expression einander nicht ausschließen; vermutlich entstanden die Tumore aus einem Zelltyp, der beide Transgene exprimiert.

Bcl-2-Expression hat somit einen kooperativen, in der verkürzten Latenzzeit meßbaren Effekt auf die c-Myc-induzierte Mammakarzinogenese der Maus.

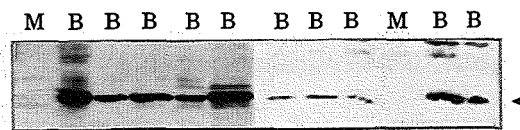


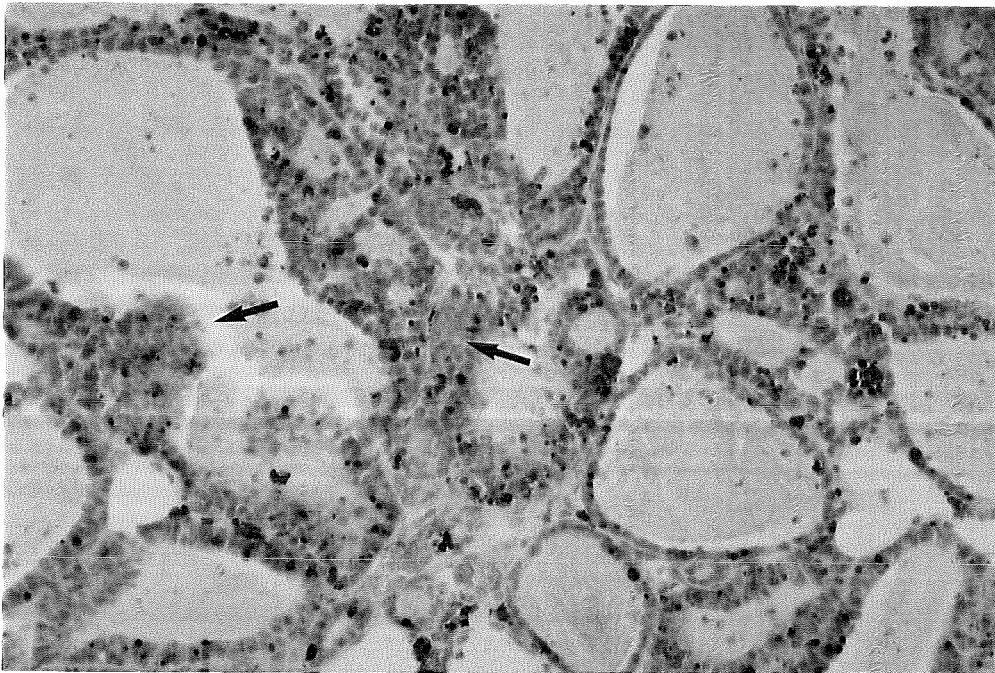
Abbildung 33. Expression des WAP-bcl-2-Transgens in den Tumoren doppelt-transgener WAP-bcl-2/MMTVmyc-Mäuse. Jeweils 50 µg aus Tumormaterial isoliertes Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Bcl-2-Protein mit dem Antikörper 124 nachgewiesen (Pfeil). B: Tumore doppelt-transgener Mäuse; M: Tumore einzeltransgener MMTVmyc-Mäuse.

### **(b) C-Myc-Überexpression führt zu Apoptosen im Brustepithel: partielle Inhibition durch Bcl-2**

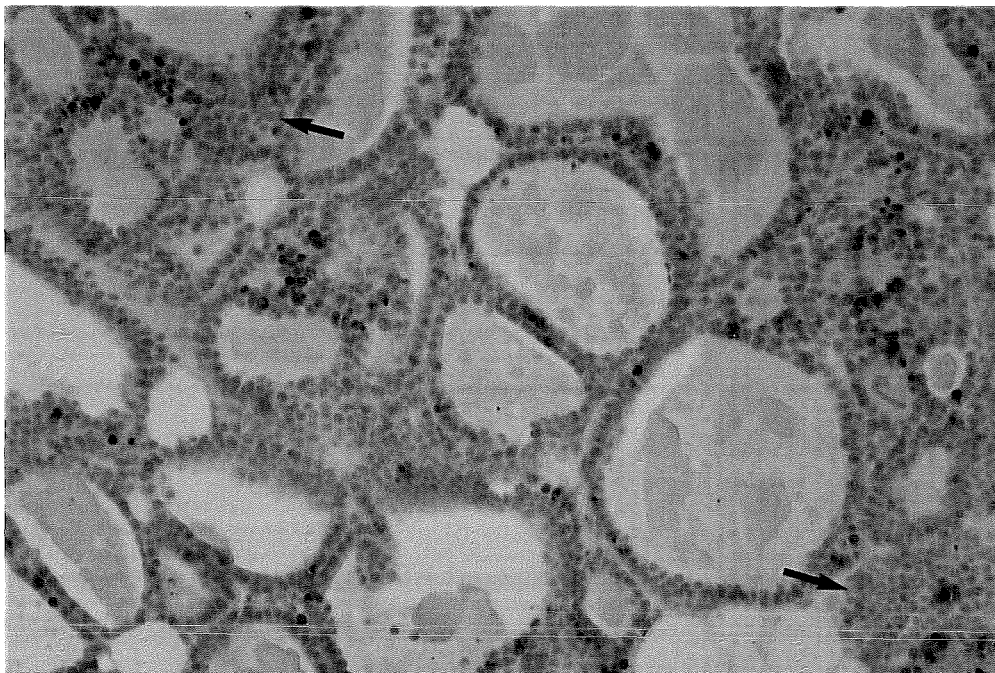
In vitro war gefunden worden, daß c-Myc neben seiner die Proliferation stimulierenden Wirkung auch Apoptose auslösen kann (Evan et al., 1992). Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob dies in vivo in der Brustdrüse ebenfalls zutrifft. Wie aus der TUNEL-Analyse der zwei inguinalen Brustdrüsen eines MMTVmyc-transgenen Weibchens, das am Tage der Sektion (zum erstenmal) geworfen hatte, hervorgeht, verursacht c-Myc-Expression in hohem Ausmaß Apoptose. Abbildung 34a zeigt einen repräsentativen Bereich, der neben der typischen alveolären Differenzierung auch mehrschichtige, "hyperproliferative" Regionen aufweist, wie sie in der normalen Brustdrüse nicht angetroffen werden. Es ist gut zu erkennen, daß in beiden Bereichen gleichermaßen ein hoher Prozentsatz an Zellen apoptotisch zugrundegeht. Die Anzahl apoptotischer Kerne ist mit  $437,9 \pm 74,9$  pro Feld (200fache Vergrößerung) gegenüber dem Spitzenwert normaler Brustdrüsen während der Involution um mehr als das Doppelte erhöht.

Das histologische Bild der Brustdrüse einer doppelt-transgenen WAP-bcl-2/MMTVmyc-Maus (Abbildung 34b) gleicht dem der einzeltransgenen; dagegen ist die Häufigkeit apoptotischer Kerne mit  $180,7 \pm 91,6$  pro Feld (200fache Vergrößerung) deutlich vermindert ( $\alpha < 0,0001$ ; t-Test) (Abbildung 35). Gleichwohl liegt ihre Zahl noch leicht über dem Wildtypwert am dritten Tag der Involution.

Bcl-2-Überexpression vermag also die durch c-Myc-Expression in der Brustdrüse ausgelöste Apoptose partiell zu inhibieren. Wofern die Induktion von Apoptosen zur Latenzzeit c-Myc-induzierter Brusttumore beiträgt, könnte hierin der Wirkungsmechanismus der Kooperation des WAP-bcl-2-Transgens mit c-Myc in der Tumorigenese begründet liegen.



a



b

Abbildung 34. TUNEL-Assay an Brustdrüsenewebe einer MMTVmyc-transgenen (a) bzw. einer WAP-bcl-2/MMTVmyc-doppelt-transgenen Maus (b) am Tag des Werfens. Apoptotische Kerne sind rotbraun gefärbt; Gegenfärbung: Hämatoxylin. Vergrößerung 750x. Pfeile zeigen auf atypische, "hyperproliferative" Bereiche.

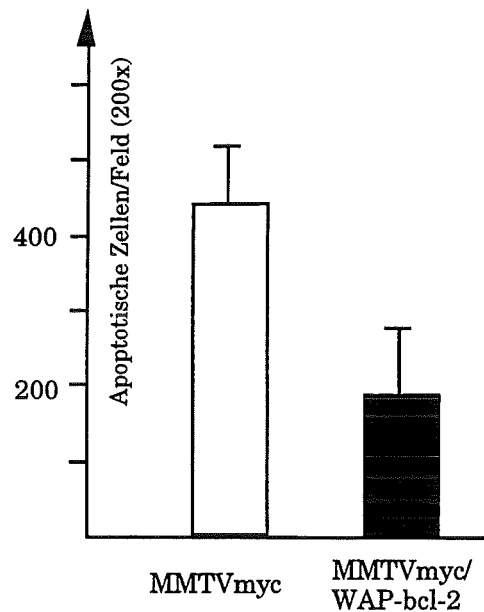


Abbildung 35. Anzahl apoptotischer Zellen in der Brustdrüse einer MMTVmyc-transgenen Maus (weißer Balken) und einer WAP-bcl-2/MMTVmyc-transgenen Maus (schwarze Balken) am Tag des Werfens. Apoptotische Kerne wurden auf Dünnschnitten mit dem TUNEL-Verfahren spezifisch angefärbt. Angegeben ist ihre Anzahl pro mikroskopisches Beobachtungsfeld in einer 200fachen Vergrößerung. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.

### 3.2.2.2. Experimente mit ubi-bcl-2-transgenen Mäusen

#### (a) Ubiquitäre Bcl-2-Überexpression führt nicht zu histologischen Veränderungen der Organe adulter Tiere

Interessanterweise weicht die Vererbung des Transgens bei den ubi-bcl-2-transgenen Mäusen der Linie 2266 vom erwarteten mendelschen Verteilungsmuster ab: lediglich 10 % der Nachkommen (Verpaarung mit DBA/2-Mäusen) waren transgen (Tabelle 3). Da dies sowohl die F1- als auch die F2-Generation betrifft, kann der Grund hierfür nicht darin bestehen, daß das weibliche Gründertier bezüglich der Transgenität seiner Keimzellen möglicherweise ein Mosaik war. Auffallend war zudem, daß die transgenen Nachkommen im Alter bis zu fünf Wochen wesentlich kleiner waren als ihre nicht-transgenen Geschwister. Nicht ganz so ausgeprägt erschien dies bei transgenen Tieren der Linie 2272, bei der der Erbgang auch der mendelschen Verteilung entsprach, indem sowohl in der ersten als auch in der zweiten

Filialgeneration die heterozygot transgenen Eltern das Transgen an 50 % ihrer Nachkommen weitergaben (Tabelle 3). Aufgrund der geringen Zahl transgener Nachkommen bei Linie 2266 beschränken sich die durchgeführten Experimente auf Tiere der Linie 2272.

Tabelle 3. Transgene Nachkommen in der F1-bzw. F2-Generation der ubi-bcl-2-transgenen Mäuse

ubi-bcl-2-Linie	F1	transgen (davon ♀)	F2	transgen (davon ♀)
2266	40	4 (3)	23	2 (1)
2272	14	7 (5)	21	12 (8)

In Kapitel 3.1.3.b. wurde gezeigt, daß die transgene Bcl-2-Expression in ubi-bcl-2 2272-Tieren annähernd ubiquitär ist. Daher wurde histopathologisch untersucht, ob die Transgenexpression zu Veränderungen in bestimmten Organen führt. Die untersuchten Gewebe (Gehirn, Dünndarm, Herz, Niere, Leber, Milz, Haut, Uterus) von 3 transgenen Mäusen wichen histologisch nicht von den entsprechenden Geweben dreier Wildtyp-Kontrollmäuse ab. Für die Ausführung dieser Untersuchungen danke ich Dr. V. Komitowski (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Demnach führt Bcl-2-Überexpression zwar zu Verzögerungen in der körperlichen Entwicklung in jungen Mäusen (Linie 2266), nicht jedoch zu histologischen Veränderungen im adulten Tier (Linie 2272).

#### **(b) Einfluß des ubi-bcl-2-Transgens auf die Entstehung intestinaler Tumore**

Bcl-2-(Über-) Expression wurde in allen Progressionsstadien kolorektaler Tumore des Menschen beschrieben. Anhand der ubi-bcl-2-transgenen Mäuse, die transgenes Bcl-2 u. A. im gesamten Darmtrakt exprimieren, wurde daher untersucht, ob die Expression von Bcl-2 die Bildung intestinaler Tumore begünstigt. Die Induktion von Darmtumoren erfolgte durch Einkreuzen eines Min-Allels des Mausehomologen des menschlichen APC-Gens (Su et al., 1992).

Das beim Menschen auf Chromosom 5q liegende APC (Adenomatöse Polyposis Coli)-Gen ist in spontanen kolorektalen Tumoren häufig deletiert;

seine Keimbahnmutation ist in Familiärer Adenomatöser Polyposis involviert. Heterozygote Träger von APC-Mutationen entwickeln in der zweiten Lebensdekade hunderte von Dickdarmpolypen, die bei Nichtbehandlung sich im weiteren Verlauf zu Karzinomen entwickeln können (Übersicht in Kinzler und Vogelstein, 1996). Das APC-Gen kodiert für ein 300 kDa-Protein, das als Homodimer mit verschiedenen u.A. an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligten Proteinen des Cytoskeletts interagiert.

Das Min ("multiple intestinal neoplasia")-Allel des murinen APC-Homologs trägt eine Mutation im Nukleotid 2549, durch die das für die Aminosäure Leucin kodierende Codon TTG in das Stop-Codon TAG konvertiert wird (Su et al., 1992). Heterozygote Träger des Allels entwickeln eine Vielzahl intestinaler Tumore entlang des gesamten Darmtraktes. Es wurde ein Modifikator-Lokus beschrieben, der in verschiedenen Mausstämmen zu unterschiedlicher Inzidenz Min-induzierter Darmtumore führt (Dietrich et al., 1993). Die im folgenden Experiment verwendeten heterozygoten Min/+ Mäuse sind hinsichtlich ihres genetischen Hintergrundes C57Bl6; im Alter von 60 Tagen werden die Tiere anaemisch und in einem Alter zwischen 120 und 150 Tagen sterben sie schließlich an der Folge multipler intestinaler Tumore (Moser et al., 1990).

C57Bl6 Min/+ Mäuse wurden mit hinsichtlich des Transgens heterozygoten ubi-bcl-2-Mäusen der Linie 2272 gekreuzt. Um in der Nachkommenschaft das Min-Allel zu identifizieren, wurde ein von Dietrich et al. (1993) beschriebenes Allel-spezifisches PCR-Verfahren angewandt. Das Nukleotid am 3'-Ende des Oligonukleotid-Primers MAPC-MT ist komplementär zur Nonsense-Mutation im Min-Allel. Unter den gewählten Bedingungen amplifiziert MAPC-MT zusammen mit dem antisense-Primer MAPC-15 ein 327 bp-Produkt spezifisch vom Min-, nicht jedoch vom Wildtyp-Maus-APC-Allel (Abbildung 36). Als interne Kontrolle wurde die PCR in Anwesenheit des weiter 5'-wärts bindenden Oligonukleotid-Primers MAPC-9 durchgeführt, der zusammen mit MAPC-15 von beiden Allelen ein 618 bp-Produkt amplifiziert.

Auf diese Weise wurden 8 Tiere identifiziert, die heterozygot für Min, aber nicht ubi-bcl-2-transgen waren, sowie 10 Tiere, die sowohl Min- als auch Transgenträger waren (im folgenden als Min- bzw. Min/bcl-2-Mäuse bezeichnet).

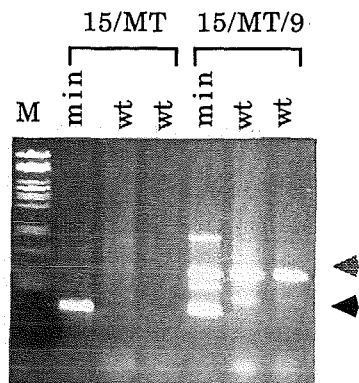


Abbildung 36. PCR-Amplifikation genomischer DNA einer Min/+-Maus (min) bzw. zweier Wildtyp-Kontrollmäuse (wt). Die jeweils verwendete Primerkombination ist über den Spuren angegeben. Schwarzer Pfeil: Das mit den Primern MAPC-15 und MAPC-MT spezifisch vom Min-Allel amplifizierte 327 bp-Produkt. Grauer Pfeil: Das bei zusätzlicher Anwesenheit des Primers MAPC-9 amplifizierte 618 bp-Produkt (interne Kontrolle). M: Pst I-geschnittene  $\lambda$ -DNA (Größenstandard).

Die Tiere wurden im Alter von 135 Tagen getötet. Der gesamte Darmtrakt wurde entnommen, longitudinal aufgeschnitten, gewaschen und fixiert. Die anschließende Auszählung der Tumore unter dem Operationsmikroskop erfolgte als Blindversuch, d.h. beim Zählen waren die Genotypen nicht bekannt.

Bemerkenswerterweise wirkten die Tiere zum Zeitpunkt ihrer Sektion äußerlich gesund, wenngleich die helle Färbung haarloser Körperpartien die beginnende Anaemie verriet. Die Därme aller Tiere enthielten eine mehr oder weniger große Anzahl Tumore unterschiedlicher Größe. Auf eine Klassifizierung wurde verzichtet.

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, unterschieden sich Min- und Min/bcl-2-Mäuse nicht signifikant in der Gesamtzahl intestinaler Tumore.

Tabelle 4. Häufigkeit intestinaler Tumore in Min- bzw. Min/bcl-2-Mäusen

Genotyp:		Min	Min/bcl-2	$\alpha^*$
Anzahl Tumore:	gesamt:	47,8 $\pm$ 21,0	55,4 $\pm$ 18,6	<0,5
	Dünndarm:	46,8 $\pm$ 21,5	53,5 $\pm$ 18,6	<0,5
	Dickdarm:	1,0 $\pm$ 0,76	1,9 $\pm$ 0,74	<0,05

\* Irrtumswahrscheinlichkeit, mit t-Test berechnet



Erst die getrennte Betrachtung der im Dick- bzw. Dünndarm ermittelten Tumorzahlen erbrachte einen auffälligen Unterschied: während die Tumorzahl im Dünndarm zwischen beiden Gruppen unterschiedslos war, enthielten die Dickdärme der Min/bcl-2-Mäuse im Durchschnitt doppelt so viele Tumore wie die der nichttransgenen Min-Träger. Eine graphische Darstellung der Dickdarmtumoranzahl in den beiden Gruppen von Tieren gibt Abbildung 37. Demzufolge erhöht Bcl-2-Expression die Inzidenz kolorektaler Tumore, während die Entwicklung von Tumoren des Dünndarmes nicht begünstigt wird.

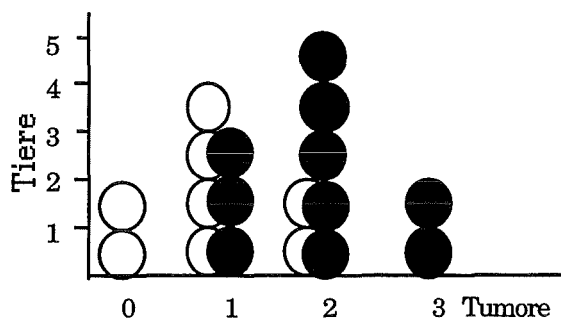


Abbildung 37: Anzahl der Tiere, die 0, 1, 2 oder 3 Dickdarmtumore aufwiesen. Weiße Kreise: Min-Mäuse; schwarze Kreise: Min/bcl-2-Mäuse.

### 3.2.2.3. Einfluß suprabasaler Bcl-2-Expression auf die Zwei-Stufen-Karzinogenese der Haut in iv-bcl-2-transgenen Mäusen

Die ektopische Expression von Bcl-2 in der suprabasalen Hautschicht führte nicht zu histologischen Veränderungen in der Haut iv-bcl-2-transgener Mäuse. (Die histopathologische Untersuchung wurde von Dr. V. Komitowski [Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg] ausgeführt.) Da menschliche Basalzellkarzinome der Haut häufig Bcl-2 exprimieren, wurde der Frage nachgegangen, ob sich die Bcl-2-Expression auf die Tumorbildung der Haut auswirkt.

An der Maus wurde das Konzept der Zwei-Stufen-Karzinogenese der Haut etabliert (Berenblum, 1954). Dieses separiert die Tumorentstehung in zwei Schritte, nämlich (1) die Tumor-Initiation durch einmalige Applikation einer karzinogenen Substanz, die in der gewählten Dosis noch nicht zur Entstehung von Tumoren führt, sowie (2) die Promotion durch Applikation selbst nicht karzinogener Substanzen, die schließlich zur Tumorentstehung führt. Bei einer experimentellen Standardisierung dieses Konzepts (Verma und Boutwell, 1980) werden Tumore durch einmalige Gabe des mutagenen Karzinogens DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracen) auf die Rückenhaut der Maus initiiert; Promotion erfolgt durch über Wochen hinweg regelmäßige Applikation des Phorbolesters TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat). Generell entstehen etwa 7 Wochen nach der Initiation Papillome. Ein Teil derselben bildet sich nach Abbruch der TPA-Behandlung wieder zurück (reversible Papillome); zu späteren Zeitpunkten können sich sowohl aus reversiblen als auch aus persistenten Papillomen Karzinome bilden (Fürstenberger und Kopp-Schneider, 1995).

Die Reversibilität der Papillome könnte mit der Induktion von Apoptosen zu tun haben. Daher sollte im folgenden Experiment die Zwei-Stufen-Karzinogenese der Haut an iv-bcl-2-transgenen Mäusen mit derjenigen an Wildtypmäusen verglichen werden hinsichtlich folgender Parameter: (1) Inzidenz der Bildung von Papillomen, (2) Reversibilität der gebildeten Papillome, (3) Inzidenz der Bildung von Karzinomen. Dieses Experiment wurde in enger Zusammenarbeit mit Dr. G. Fürstenberger (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) durchgeführt.

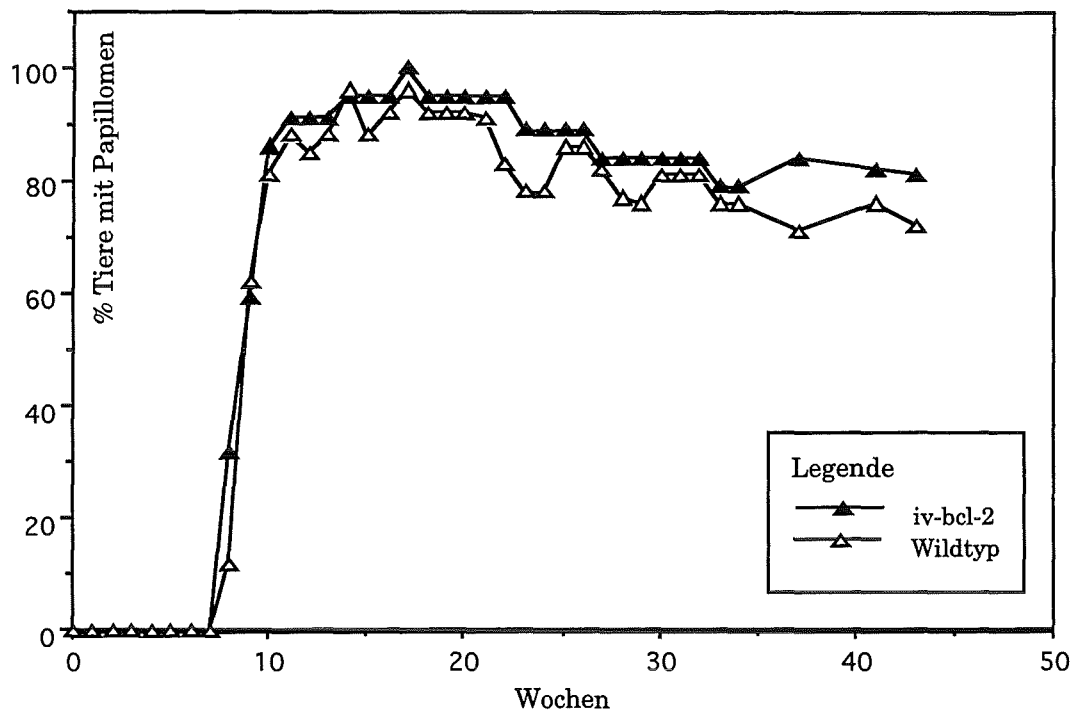
Da für das Experiment eine größere Anzahl gleichaltriger iv-bcl-2-transgener bzw. von Wildtypmäusen benötigt wurde, wurden heterozygote iv-bcl-2-Männchen mit hormonell superovulierten B6D2F1-Hybridweibchen verpaart. Aus diesen Kreuzungen gingen 22 transgene (davon 11 männliche Tiere) sowie 25 nichttransgene (12 männliche Tiere) Nachkommen hervor. Diese Tiere wurden getrenntgeschlechtlich gehalten; Geschwister des selben Geschlechts wurden unabhängig von ihrem Genotyp zusammen in Käfigen gehalten. Im Alter von 6 Wochen erfolgte Applikation von 0,1 mmol DMBA auf die zuvor rasierte Rückenhaut; ab der Folgewoche wurde den Tieren zweimal wöchentlich (montags und freitags) 10 nmol TPA auf die Rückenhaut appliziert über einen Zeitraum von 15 Wochen. Die Tiere wurden wöchentlich auf die Anwesenheit von Tumoren untersucht.

In Abbildung 38 ist sowohl die Kinetik des Auftretens von Papillomen sowie der durchschnittlichen Anzahl an Papillomen pro Tier während des 43wöchigen Versuchszeitraums dargestellt. Hinsichtlich beider Parameter unterschieden sich die beiden Gruppen (transgen vs. nichttransgen) nicht signifikant voneinander. (Die statistische Auswertung des Versuchs erfolgte durch die Statistikabteilung am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg.) Ab der 7. Woche entwickelten sowohl transgene als auch nichttransgene Tiere Papillome. Sowohl die Zahl der Papillome pro Tier als auch der Prozentsatz der Tiere mit Papillomen erreichte zwischen der 15. und 20. Woche ein Maximum. In beiden Gruppen bildeten sich die Papillome danach wieder teilweise zurück, um ab der 25. Woche in ihrer durchschnittlichen Anzahl je Tier in etwa konstant zu bleiben; demnach waren in beiden Gruppen etwa 70 % der gebildeten Papillome reversibel \*. Zwischen der 20. und 25. Woche erscheint die Reversibilität der Papillome in den iv-bcl-2-transgenen Mäusen tendenziell etwas geringer. Die gebildeten Papillome unterschieden sich in ihrer Histologie nicht zwischen den beiden Gruppen (Dr. V. Komitowski, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Während der gesamten Versuchsdauer traten in beiden Gruppen jeweils an zwei Tieren einzelne Karzinome auf; diese sind anhand ihres invasiven Wachstums und der späteren Kraterbildung leicht von den gestielt wachsenden Papillomen unterscheidbar.

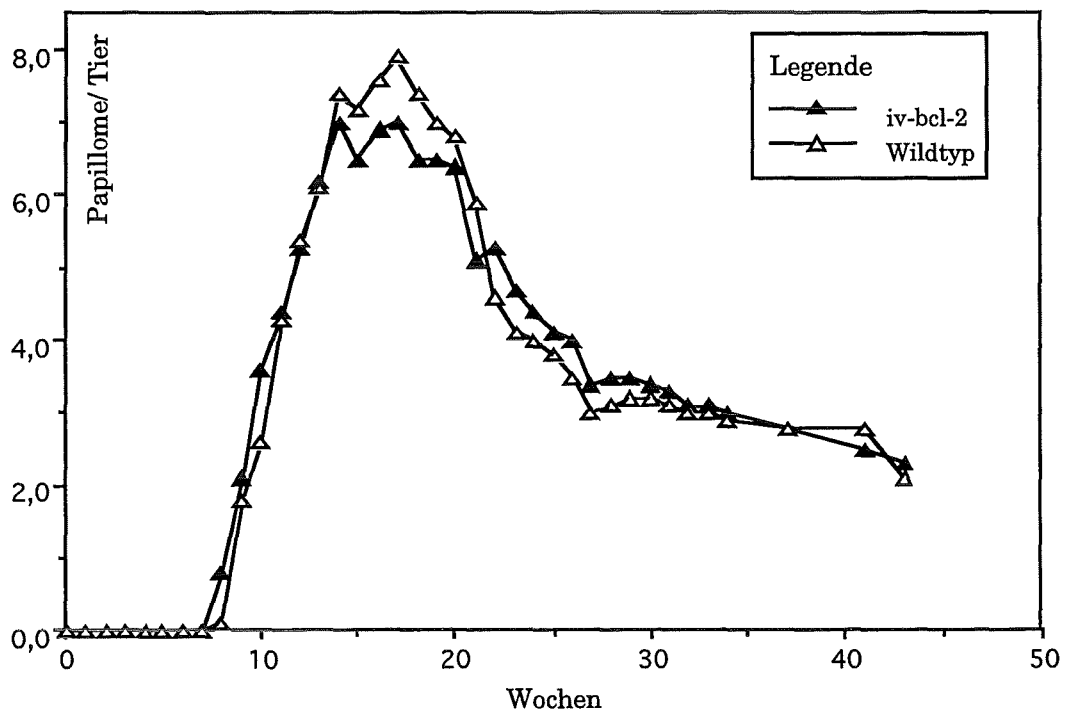
Somit beeinflusste das iv-bcl-2-Transgen weder das Entstehen von Papillomen und Karzinomen noch die Reversibilität der gebildeten Papillome. Die einzigen festgestellten Unterschiede betreffen eine beschleunigte Bildung und eine ebenfalls höhere Reversibilität von Papillomen bei männlichen Tieren unabhängig vom Transgen-Status (Daten nicht gezeigt).

---

\* Auf den Anteil tumortragender Tiere wirkte sich dies jedoch nur geringfügig aus. Stärkere Auswirkungen auf die Kinetik hatte es, wenn ein tumorfreies Tier erkrankte und getötet werden mußte; dadurch stieg der prozentuale Anteil tumortragender Tiere an, was an zwei Stellen bei den Wildtypen in Abbildung 37a (Woche 25 und Woche 30) zu erkennen ist.



a



b

Abbildung 38. a. Prozentsatz der Tiere mit Papillomen über den Versuchszeitraum. b. Durchschnittliche Zahl der Papillome pro Tier über den Versuchszeitraum. Schwarze Dreiecke: iv-bcl-2-transgene Mäuse; weiße Dreiecke: nichttransgene Tiere.

## 4. Diskussion

### 4.1. Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Mauslinien geschaffen, die das Anti-Apoptose-Protein Bcl-2 in ihren Brustdrüsen, in verschiedenen Organen, sowie in suprabasalen Zellen der Haut exprimieren. Erreicht wurde dies durch die Wahl spezifischer, die Transgene kontrollierende Promotoren, nämlich des WAP-Promotors für die brustdrüsenspezifische, des Promotors des Ubiquitin C-Gens für die ubiquitäre sowie des Promotors des Involucrin-Gens für die Expression in der Haut. Interessanterweise trat in einer der WAP-bcl-2-transgenen Mauslinien (965) ektopische Expression im Gehirn und in der iv-bcl-2-transgenen Mauslinie 3446 in Leber und Milz auf. Ektopische Transgenexpression ist nichts ungewöhnliches und kann möglicherweise durch die Integration des Transgens in die Nähe des Enhancers eines im "ektopischen" Gewebe exprimierten Gens erklärt werden. Bemerkenswerterweise berichteten auch Andres et al. (1987) von ektopischer Expression eines WAP-Promotor-getriebenen Transgens im Gehirn, die allerdings im Unterschied zur Expression in Linie WAP-bcl-2 965 laktationsabhängig war; zudem tritt diese Expression in Linie 965 auch im Gehirn männlicher Tiere auf. Somit ist nicht klar, ob die ektopische Expression zweier verschiedener WAP-Transgene im Gehirn auf eine Gemeinsamkeit in der Regulation des Promotors hinweist oder zufällig erzielt worden ist. Die ektopische Expression des WAP-bcl-2- bzw. des iv-bcl-2-Transgens eröffnet die Möglichkeit, den Einfluß von Bcl-2 auch auf die betreffenden Organe zu studieren; die exprimierenden Zelltypen wurden indes noch nicht identifiziert.

Weiterhin auffällig ist, daß eine der ubi-bcl-2-transgenen und 6 aus 7 der iv-bcl-2-transgenen Mäuse das Transgen nicht an ihre Nachkommenschaft weitervererbten. Den Gründen hierfür wurde nicht nachgegangen. Es ist möglich, daß alle diese Tiere hinsichtlich der Integration des Transgens Keimbahnmosaik waren oder Mosaik, die in ihrer Keimbahn das Transgen nicht trugen. Dies ist denkbar unter der Annahme, daß die Transgen-DNA erst nach ein oder mehreren Teilungen des injizierten Mausembryos ins Genom integrierte. Allerdings ist unwahrscheinlich, daß dies in 6 unabhängigen Tieren erfolgt sein sollte. Ebenso ist unwahrscheinlich, daß Transgenexpression sich auf die frühe Entwicklung in utero lethal auswirkt,

da sonst nach der Reimplantation der injizierten Mausembryonen schwerlich hätten transgenen Mäuse entstehen können. Eher könnten transgen-tragende Gameten oder Gametogonien in ihrer Fertilität bzw. Viabilität eingeschränkt sein, entweder infolge früher Transgenexpression oder Transgenintegration in einen für die Funktion oder die Entwicklung der Keimzellen relevanten Genlokus. Die Erzeugung transgener Gründertiere würde hiervon noch nicht beeinflusst.

Die Effekte der Transgenexpression auf die Brustdrüse sowie auf die Tumorigenese in Brust, Haut und Darm werden in den nächsten Kapiteln behandelt. Besonders bemerkenswert ist, daß weder ubiquitäre Expression von Bcl-2 noch Expression in der Haut zu auffälligen phänotypischen Aberrationen führte. Gerade in den ubi-bcl-2-transgenen Tieren würde man angesichts der Bedeutung programmierter Zelltode während der Entwicklung Effekte des Transgens erwarten. Möglicherweise hängt hiermit das geringere Wachstum von Tieren der Linie 2266 zusammen. Es wäre daher interessant, in dieser Mauslinie die Expression des Transgens während der Entwicklung zu untersuchen. Im Adulten würde man zumindest in denjenigen Geweben Veränderungen erwarten, in denen bereits anhand anderer Bcl-2-transgener Mäuse Effekte festgestellt worden sind, beispielweise in Milz (McDonnell et al., 1989) und Gehirn (Martinou et al., 1994). Es ist unwahrscheinlich, daß die verwendete bcl-2-cDNA eine inaktivierende Mutation aufweist, da mit einem spezifischen Antikörper nachweisbares Protein gebildet wird. Zudem führt in der Linie 2266 das Transgen offenbar zu phänotypischen, indes noch unverstandenen Konsequenzen. Weiterhin wurde die gleiche cDNA auch für das WAP-bcl-2-Konstrukt verwendet, wo das gebildete Protein klar anti-apoptotische Wirkung aufweist. Wahrscheinlicher ist, daß das Transgen zwar in den selben Geweben wie in den bereits publizierten Bcl-2-transgenen Mäusen, jedoch in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird. Zudem könnte die Stärke der Expression von Bedeutung sein, insbesondere unter der Annahme, daß Bcl-2 mit homologen Proteinen interagiert und eventuell pro-apoptotische Homologe "austitriert" (siehe 4.2.2.). Wie aus dem Vergleich der Expression in Brustdrüse bzw. Haut zwischen ubi-bcl-2- und WAP-bcl-2- bzw. iv-bcl-2-transgenen Mäusen hervorgeht, vermitteln die gewebespezifischen Promotoren weit stärkere Expression.

Allerdings führte auch in iv-bcl-2-transgenen Mäusen die starke Transgenexpression nicht zu strukturellen Veränderungen der Haut. Dies ist besonders überraschend, da die Hautdifferenzierung starke Parallelen zur

Apoptose aufweist. In beiden Fällen kommt es zur Vernetzung von Proteinen durch eine Transglutaminase: in Keratinocyten handelt es sich dabei um eine spezielle, nur in verhornenden Epithelien vorkommende Keratinocyten-Transglutaminase (vgl. die Einleitung in: Melino et al., 1994). Infolge ihrer Wirkung stellt der abgestoßene Korneocyt ein ähnlich den apoptotischen Körperchen gegen mechanische und chemische Einwirkungen resistentes Gebilde dar. Zudem kommt es im Zuge der Keratinocytenreifung in den suprabasalen Lagen zur DNA-Fragmentierung und schließlich zum Verlust des Zellkerns (McCall & Cohen, 1991; Gavrieli et al., 1992). Diese Parallelen zur Apoptose sind konsistent mit einer möglichen, die Hautdifferenzierung inhibierenden Funktion von Bcl-2, da dieses nur in der basalen Zellage exprimiert wird, nicht dagegen in den suprabasalen, verhornden Schichten. Daß transgene Bcl-2-Expression in den suprabasalen Hautschichten nicht zu Störungen der Differenzierung führt, weist somit darauf hin, daß die Ähnlichkeit zwischen Keratinocyten-differenzierung und Apoptose entweder bloß formaler Natur (bzw. von Bcl-2 nicht beeinflussbar) sind oder daß das "Differenzierungsprogramm" in den suprabasalen Hautschichten bereits irreversibel aktiviert wurde.

#### **4.2. Experimente mit WAP-bcl-2-transgenen Mäusen**

Die Überexpression von Bcl-2 in den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Mäuse resultierte in einer Inhibition des apoptotischen Absterbens alveolärer Zellen, das (a) während der postlaktationalen Involution, (b) durch ein WAPp53-Transgen und (c) durch ein MMTVmyc-Transgen induziert wurde. Während das WAP-bcl-2-Transgen auf die Wirkungen eines eingekreuzten WAP-TGF $\beta$ 1-Transgens keinen Effekt ausübte, beschleunigte es die Bildung MMTVmyc-Transgen-induzierter Brusttumore. Damit stellen die WAP-bcl-2-transgenen Mäuse ein weiteres transgenes Tiermodell dar, in dem die Überexpression von Bcl-2 zu phänotypischen Konsequenzen führte. Bislang war dies in vivo für das Absterben lymphoider Zellen (McDonnell et al., 1989), von Neuronen des Zentralnervensystems (Martinou et al., 1994), von Hepatocyten (Lacronique et al., 1996) und von retinalen Photorezeptoren (Chen et al., 1996a) gezeigt worden. Außer über das Vermögen von Bcl-2, in verschiedenen Kontexten Apoptose unterdrücken zu können, erlauben derartige Studien auch weitergehende Schlußfolgerungen bezüglich der

Biologie der betreffenden Organsysteme. Im Falle der Brustdrüse betrifft dies Zusammenhänge zwischen der Apoptose alveolärer Zellen und der Genexpression sowie der histologischen Differenzierung der Brustdrüse während der postlaktationalen Involution; die Tumorigenese betreffende Aspekte werden gesondert behandelt.

#### 4.2.1. Eine methodische Vorbemerkung

Apoptosen wurden in der vorliegenden Arbeit durchweg mit dem TUNEL-Verfahren detektiert, dem letztlich die apoptose-assoziierte Fragmentierung des Chromatins zugrundeliegt. Bemerkenswerterweise berichteten Gavrielli et al. (1992) in ihrer erstmaligen Beschreibung des Verfahrens, daß in der Brustdrüse der Maus während der Involution keine TUNEL-positiven Zellen feststellbar waren. Inzwischen wird das TUNEL-Verfahren beim Studium der Brustdrüseninvolution standardmäßig angewandt (siehe beispielsweise: Feng et al., 1995; Heermeier et al., 1996); dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten käuflichen Kit liegen gar Dünnschnitte durch Brustdrüsengewebe als Positivkontrolle zur Etablierung des Assays bei. Es ist nicht klar, aus welchem Grund die DNA-Fragmentierung zunächst übersehen wurde (möglicherweise führt eine verschieden lange Proteinase K-Behandlung zu unterschiedlichen Zugänglichkeiten des Chromatins für das Tdt-Enzym). Gleichwohl zeigt dies auf, daß die Methode hinsichtlich ihrer Tauglichkeit kritisch zu prüfen ist.

Die Anfärbung von Zellkernen hing in den durchgeführten TUNEL-Assays von der Anwesenheit des Enzyms Tdt ab; bei Weglassen desselben blieben nicht nur Kerne des Brustdrüsenepithels ungefärbt sondern auch Kerne im auf den Schnitten stets getroffenen Lymphknoten. Dieser diente sonst stets als interne Positivkontrolle. Angefärbte Kerne hatten häufig apoptotische Morphologie; allerdings wurden auch "gesund" erscheinende Kerne angefärbt, die sich wahrscheinlich noch in der initialen Phase der Apoptose befanden. Demnach wäre die DNA-Fragmentierung ein frühes Ereignis der Apoptose alveolärer Zellen.

Die anhand der Brustdrüsen von Wildtyp-Mäusen gefundene Kinetik des Auftretens apoptotischer Zellen stimmt in ihrem Verlauf mit den TUNEL-basierten Daten in Heermeier et al. (1996) überein, wenngleich in dieser Studie keine Zahlen angegeben sind: die Zahl apoptotischer Zellen erreicht am dritten



Tag der Involution ihren Höchstwert, um dann wieder zurückzugehen. Quarrie et al. (1995) kommen, ausgehend von dem dem TUNEL-Assay ähnlichen ISEL-Verfahren zu einem ähnlichen Ergebnis, wenngleich sie den höchsten Wert der Anzahl apoptotischer Zellen am vierten Tag der Involution markieren. Allerdings wurden Brustdrüsen des dritten Tages offenbar nicht analysiert. Dagegen finden, auf einer rein morphologischen Beschreibung der Zellen basierend, Walker et al. (1989) den Höchstwert der Zahl apoptotischer Zellen bereits am zweiten Tag der Involution. Die Diskrepanzen zwischen derartigen Studien könnten mit den z.T. unterschiedlichen Laktationsdauern, Wurfgrößen oder Mausstämmen zusammenhängen.

Demzufolge reflektiert der TUNEL-Assay, wie er in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, offensichtlich tatsächlich die Zahl apoptotischer Zellen, insbesondere was die Vergleichbarkeit mit anderen Studien anbelangt\*. Da zwischen den Brustdrüsen von transgenen und von Wildtypmäusen während der Involution keine histologischen Unterschiede bestanden, wurden der Einfachheit halber die TUNEL-gefärbten Kerne pro mikroskopisches Feld (und nicht bezogen auf die Gesamtzahl an Kernen) gezählt. Daher sind die Zahlenwerte des gleichen Involutionstages miteinander vergleichbar, zwischen verschiedenen Tagen aufgrund der unterschiedlichen Zelldichten auf den Gewebeschnitten jedoch nur unter diesem Vorbehalt.

#### **4.2.2. Bcl-2-homologe Proteine sind in der Apoptose alveolärer Zellen beteiligt**

In den Brustdrüsen transgener WAP-bcl-2-Mäuse der Linie 1182 war an den Tagen 2 und 3 der Involution die Zahl apoptotischer Zellen deutlich reduziert im Vergleich zu Wildtypbrustdrüsen. Dies korreliert gut mit der starken Transgen-Expression in diesem Zeitraum. Dagegen ist die Zahl apoptotischer Zellen am Tag 4, einhergehend mit dem Rückgang der Expression des Transgens, höher als beim Wildtyp. Dies zeigt, daß die Inhibition tatsächlich durch die Transgen-Expression zustandekommt, und nicht aufgrund der Insertion des Transgens in ein endogenes Gen, das in die Involution oder Apoptose involviert ist. Ein weiteres Indiz hierfür ist die vergleichbare Inhibition, wie sie in der unabhängigen Linie WAP-bcl-2 965 am Tag 3 der Involution beobachtet wurde.

---

\* Es sei darauf hingewiesen, daß eine Modifikation des Verfahrens an Gefrierschnitten zu etwas aberranten Resultaten führte (Herzer, 1996).

In der laktierenden Brustdrüse war endogene Bcl-2-Expression weder per Northern Blot (von Gesamt-RNA) noch mit dem Western Blot nachweisbar. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit immunhistologischen Befunden in Pullan et al. (1996). Die in der vorliegenden Arbeit mit dem empfindlichen RT-PCR-Verfahren nachgewiesene Bcl-2-Expression in der Brustdrüse liegt daher unter der Nachweisgrenze der übrigen angewandten Verfahren und rührt möglicherweise von Lymphocyten im Lymphknoten der Brustdrüse her, die Bcl-2 exprimieren (Pezzella et al., 1990). Auch während der Involution läßt sich bcl-2-mRNA mit dem Northern Blot nicht nachweisen (Herzer, 1996). Die Brustdrüse stellt somit während Laktation und früher Involution einen "reinen" Hintergrund dar, vor dem die transgene Bcl-2-Überexpression isoliert betrachtet werden kann.

Bcl-2-homologe Proteine kontrollieren die Apoptose durch das Mengenverhältnis pro- und anti-apoptotisch wirkender Formen (Übersicht in Farrow und Brown, 1996). Zu jenen zählen Bax, Bak, Bad und Bcl-x<sub>s</sub>, zu diesen Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2. Die molekulare Grundlage dieses Zusammenwirkens stellt wahrscheinlich das Vermögen dieser Proteine dar, vermittels ihrer konservierten BH1-, BH2- und BH3-Regionen Homodimere oder selektiv miteinander Heterodimere zu bilden. Bcl-2 vermag beispielsweise mit Bax zu dimerisieren. Die Existenz mutanter Formen von Bcl-2, die zwar noch homo-, nicht jedoch mit Bax mehr heterodimerisieren können (Yin et al., 1994), legt ein Modell nahe, wonach Bax-Bax-Homodimere aktiv Apoptose induzieren; Bcl-2 würde demnach durch kompetitive Spaltung dieses Komplexes Bax in seiner Funktion blockieren. Auf Hefekolonien wirkte Bax-Expression wachstumshemmend, möglicherweise aufgrund einer lethalen Wirkung (Sato et al., 1994). Koexpression von Bcl-2 hob dies auf; zusätzlich wurde Dimerisierung beider Moleküle nachgewiesen. In dieser Studie wurde zudem gefunden, daß Bcl-2 mit Bcl-x<sub>s</sub> zu dimerisieren vermag, und ein Modell wurde vorgeschlagen, wonach Bcl-x<sub>s</sub> durch Interaktion mit Bcl-2 von diesem gebundenes Bax wieder freisetzen kann und auf diese Weise Apoptose induziert.

Nimmt man diese Interpretationen ernst, so weist die Inhibition der involutions-assoziierten Apoptose alveolärer Zellen durch transgenes Bcl-2 indirekt darauf hin, daß pro-apoptotisch wirkende Bcl-2-Homologe eine entscheidende Rolle in der Brustdrüsen-Involution spielen. In der Tat fanden Heermeier et al. (1996), daß während der ersten drei Tage der Involution Bax, Bcl-x<sub>s</sub> und Bcl-x<sub>L</sub> hochreguliert werden. Dabei ändert sich das molare

Verhältnis zwischen *bcl-x<sub>S</sub>*- und *bcl-x<sub>L</sub>*-mRNA zugunsten der ersteren. Zudem wiesen einige der Bax-exprimierenden Zellen apoptotische Morphologie auf. War diese Studie bloß korrelativ, so legt die in der vorliegenden Arbeit gefundene inhibitorische Wirkung von Bcl-2 die kausale Bedeutung der Bax und Bcl-x<sub>S</sub>-Expression für die involutions-assoziierte Apoptose alveolärer Zellen nahe.

Allerdings wird diese Schlußfolgerung problematisiert durch die Identifizierung mutanter Formen von Bcl-x<sub>L</sub>, die nicht mehr mit Bak (und vermutlich anderen pro-apoptotischen Bcl-2-Homologen) zu interagieren vermochten, gleichwohl aber das Vermögen besaßen, Apoptose zu reprimieren (Cheng et al., 1996). Dies deutet darauf hin, daß anti-apoptotisch wirkende Bcl-2-Homologe dominant, und nicht über die die Inaktivierung pro-apoptotischer Formen funktionieren könnten. Indes ist die Allgemeingültigkeit dieses in einem Sindbis-Virus-induzierten Apoptose-Assay gewonnenen Befundes nicht sicher, zumal es sich um eine spezielle Eigenschaft des Bcl-x<sub>L</sub>-Moleküls handeln könnte, die auf Bcl-2 nicht zutrifft. Als ein weiteres Argument für eine dominante, nicht von pro-apoptotischen Homologen abhängige Wirkung von Bcl-2 könnte die Singularität des *ced-9*-Gens in *Caenorhabditis elegans* dienen. Allerdings existieren genetische Hinweise auf zwei Formen des *ced-9*-Genprodukts, deren eine pro-apoptotisch wirksam ist (Hengartner und Horvitz, 1994b).

Unabhängig davon, welche Interpretation bezüglich der Dominanz und Wechselwirkung der Bcl-2-Homologen sich letztlich als zutreffend erweisen wird, können Bcl-2 und Bax in verschiedenen Kontexten dimerisieren (Oltvai et al., 1993; Sato et al., 1994), und es ist wahrscheinlich, daß dies auch während der Involution in alveolären Zellen des Brustepithels WAP-*bcl-2*-transgener Mäuse geschieht.

#### **4.2.3. Bcl-2 hat keinen Einfluß auf die Expression involutions-assoziiierter Transkripte**

Es ist unbekannt, auf welche Weise Bcl-2 die Apoptose unterdrückt. Daher wurde untersucht, ob Bcl-2-Überexpression in der Brustdrüse die Expression von Genen verändert, die während der Involution induziert werden und möglicherweise in ursächlichem Zusammenhang mit der Apoptose alveolärer Zellen stehen (Strange et al., 1992). Dies trifft insbesondere auf das TGF- $\beta$ 1-

und das p53-Gen zu, da deren Überexpression in den Brustdrüsen transgener Mäuse in alveolären Zellen Apoptose verursacht (Kordon et al., 1995; Li et al., 1996a). Das in den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Mäuse unveränderte Expressionsmuster beider mRNAs spricht dafür, daß Bcl-2 nicht modulierend auf ihre Expression einwirkt und, falls sie überhaupt von Bedeutung für die Apoptose alveolärer Zellen sind, ihnen in seiner inhibitorischen Wirkung nachgeschaltet ist.

Beide Gene werden ab dem zweiten Tag der Involution induziert, könnten in der Involution also durchaus eine Rolle spielen. Allerdings wurde inzwischen gezeigt, daß die Brustdrüseninvolution in p53<sup>-/-</sup>-Mäusen grob unverändert abläuft (Li et al., 1996b). Andererseits wurde dies bei der durch Kastration ausgelösten Regression der Prostata ursprünglich auch geglaubt (Berges et al., 1993), und erst eine detailliertere Analyse erbrachte, daß das apoptotische Absterben der Prostata-Epithelzellen in p53<sup>-/-</sup>-Mäusen in Wahrheit mit einer etwas verzögerten Kinetik abläuft (Colombel et al., 1995).

Zusätzlich wurde das Expressionsmuster des SGP-2-Gens verglichen. Dieses auch "clusterin" oder TRPM-2 genannte Gen wird nicht nur während der Brustdrüseninvolution induziert (Strange et al., 1992) sondern auch während der kastrations-induzierten Regression der Prostata sowie in verschiedenen Geweben und Tumorzellen, die apoptotisch absterben (Wong et al., 1993; Wong et al., 1994). Abgesehen von der zunächst stärkeren Expression am zweiten Tag der Involution ist die Kinetik der Expression in den WAP-bcl-2-Transgenen gegenüber Wildtypmäusen unverändert. Im Unterschied zu Strange et al. (1992) wurde in der vorliegenden Arbeit starke Induktion erst ab dem zweiten Tag der Involution detektiert; diese Diskrepanz könnte in den schon besprochenen methodischen Unterschieden begründet liegen. In Übereinstimmung mit einer möglichen Rolle bei der involutions-assoziierten Apoptose ist die Expression von SGP-2-mRNA am stärksten während der Phase maximaler Zelltode in der Involution; anschließend wird das Gen rasch wieder herunter reguliert. Über die Funktion von SGP-2 während der Apoptose ist wenig bekannt; möglicherweise spielt das Protein, das an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Tung und Fritz, 1985), eine Rolle bei der Inhibition der Komplement-vermittelten Zellyse (Jenne und Tschopp, 1989). Allerdings ist nicht bekannt, welcher Zelltyp SGP-2 während der Involution exprimiert. Falls dies tatsächlich alveoläre Zellen sind, so wäre die stärkere Expression in den Transgenen am Tag 2 hiermit konsistent, da in den Wildtypen zu diesem Zeitpunkt die exprimierenden Zellen bereits durch Apoptose deletiert werden.

In geringerem Ausmaß ist die Expression auch noch am Tag 3 der Involution stärker, während am vierten Tag die Signale auf dem Northern Blot gleich stark sind.

Offensichtlich übt Bcl-2 demnach seine anti-apoptotische Wirkung aus, ohne die SGP-2-Expression zu beeinflussen. Interessanterweise sind sowohl SGP-2 als auch TGF- $\beta$ 1 mutmaßliche AP-1-regulierte Gene (Kim et al., 1990; Wong et al., 1994). Die Induktion eines AP-1-Komplexes aus c-Fos und JunD ist ein frühes Ereignis bei der Brustdrüsen-Involution und spielt möglicherweise eine kritische Rolle bei der Kontrolle der Apoptose alveolärer Zellen (Marti et al., 1994). Somit legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, daß Bcl-2 die Apoptose alveolärer Zellen weder durch die Modulation der Expression AP-1-abhängiger Gene noch durch Veränderungen der Expression der AP-1-Transkriptionsfaktoren supprimiert. Tatsächlich ist die involutions-assoziierte Induktion von JunD-mRNA in WAP-bcl-2-transgenen Mäusen nicht verändert (Herzer, 1996).

#### **4.2.4. Separierung von Apoptose und Differenzierung**

Falls das Genexpressionsmuster den Differenzierungszustand einer Zelle widerspiegelt, so deutet die im Vergleich zu Wildtypmäusen unveränderte Expression der oben besprochenen involutions-assoziierten Transkripte in den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Mäuse darauf hin, daß Bcl-2 die (De-)Differenzierung alveolärer Zellen während der Involution nicht beeinflusst. Dies wird weiterhin durch die Beobachtung bestätigt, daß der Rückgang der Transkriptmenge der Milchprotein-Gene WAP und  $\beta$ -Casein in den transgenen sich nicht von dem in Wildtyp-Brustdrüsen unterscheidet. Die Expression beider Gene ist charakteristisch für die Laktation, d.h. die terminale Differenzierung alveolärer Zellen; der Rückgang der Expression ist für die Involution typisch (vgl. beispielsweise Strange et al., 1992). Auch im histologischen Bild unterschieden sich die Brustdrüsen transgener Mäuse nicht von denen der Wildtypkontrollen: am Tag 3 der Involution wurden die Alveoli englumiger und der Anteil fibro-adipösen Stromas am Gesamtgewebe nahm zu; am vierten Tag waren die Alveoli kollabiert zu Strängen und Gruppen von Zellen inmitten stromalen Gewebes.

Hierin sind die WAP-bcl-2-transgenen Mäuse einzigartig und unterscheiden sich fundamental von anderen transgenen Mäusen, in denen

die postlaktationale Regression des Brustepithels verzögert oder inhibiert wird. Dabei handelt es sich um Mäuse, die hGH (menschliches Wachstumshormon) oder TGF $\alpha$  (Tumorstromafaktor  $\alpha$ ) als Transgene in ihren Brustdrüsen überexprimieren (Andres et al., 1991; Bhini et al., 1991; Sandgren et al., 1995). In beiden Fällen wird nach Beendigung der Laktation die Differenzierung des milchproduzierenden Epithels beibehalten, was sowohl histologisch als auch hinsichtlich der beibehaltenen WAP- oder  $\beta$ -Casein-Expression evident ist\*. Man könnte dies so verstehen, daß diese Transgene den Effekt laktotroper Hormone imitieren, die ebenfalls die Apoptose alveolärer Zellen verhindern können und die Differenzierung des Epithels aufrecht erhalten (Feng et al., 1995). Somit sind die transgenen WAP-bcl-2-Mäuse die einzigen, in denen die Apoptose alveolärer Zellen von den die Involution begleitenden histologischen Veränderungen der Brustdrüse separiert wird. Die letzteren sind wahrscheinlich eine Konsequenz proteolytischer Umbauprozesse an der extrazellulären Matrix (ECM), die in vitro die dreidimensionale Organisation von Brustepithelzellen steuert (Talhok et al., 1992; Boudreau et al., 1996).

Dies steht im Widerspruch zu der Annahme, die proteolytische Degradation der die alveolären Zellen vom stromalen Gewebe trennenden ECM/Basalmembran sei das Schlüsselereignis, das während der Involution zur Apoptose alveolärer Zellen führt (Pullan et al., 1996). Tatsächlich hängt das Überleben epithelialer Brustzellen in vitro kritisch von der Gegenwart einer ECM und einer korrekten dreidimensionalen Organisation des Gewebes ab (Boudreau et al., 1995; Boudreau et al., 1996; Pullan et al., 1996). Interessanterweise reguliert in vitro Kontakt mit der Basalmembran die Bcl-2-Expression epithelialer Zellen aus Brustgewebe herunter; entsprechend könnte während der Schwangerschaft die Bcl-2-Expression herunter reguliert werden, indem die zunehmende alveoläre Differenzierung die Epithelzellen in intimen Kontakt zur Basalmembran bringt (Pullan et al., 1996). Sonach würde die Basalmembran während der Laktation einen Bcl-2-unabhängigen Überlebensstimulus darstellen. Die durch die postlaktationale Degradation der Basalmembran ausgelöste Apoptose alveolärer Zellen wäre, gemäß den Befunden an WAP-bcl-2-transgenen Mäusen, gleichwohl durch Bcl-2 inhibierbar.

---

\* In einer weiteren transgenen Mauslinie führt die Überexpression von IGF-1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1) zu inkompletter Involution; allerdings wurde die Milchprotein-Genexpression nicht untersucht, und die gezeigten histologischen Bilder lassen keine Schlüsse zu (Hadsell et al., 1996).

Allerdings fanden Lund et al. (1996), daß die Involution in zwei Phasen unterteilt werden kann: eine initiale Phase (bis Tag 3), die durch das apoptotische Absterben alveolärer Zellen charakterisiert ist, und eine folgende, in der die Alveoli kollabieren und die Basalmembran proteolytisch zerstört wird. Dies ist konsistent mit der Separierung des apoptotischen Absterbens alveolärer Zellen von den involutions-assoziierten Umbauprozessen im Brustepithel, wie sie sich in den WAP-bcl-2-transgenen Mäusen manifestiert. Somit kann die Degradation der Basalmembran experimentell zwar Apoptose von Brustepithelzellen auslösen; in vivo ist die Degradation indes ein sekundäres Ereignis, das mit der Apoptose nicht in ursächlicher Beziehung steht.

Möglicherweise ist die Degradation der extrazellulären Matrix aber für die am Tag 4 in den Brustdrüsen der WAP-bcl-2-transgenen Mäuse beobachtete erhöhte Apoptoserate verantwortlich. Es ist anzunehmen, daß von der verminderten Apoptoserate der Vortage herrührend eine erhöhte Anzahl alveolärer Zellen persistiert. Das Kollabieren der Alveoli am Tag 4 der Involution läßt auf die Degradation der Basallamina schließen. Zudem wird die Bcl-2-Expression herunter reguliert. Auf diese Weise könnte der nun gleichzeitig fehlende Überlebensstimulus von seiten der Basalmembran die Apoptose induzieren, was mit den in vitro-Daten von Boudreau et al. (1995 und 1996) konsistent wäre. Letztlich würde dies erklären, warum die zyklische Expression von Bcl-2 in den Brustdrüsen der WAP-bcl-2-transgenen Mäuse nicht langfristig zur Anreicherung epithelialer Zellen führt\* .

Es ist übrigens keineswegs selbverständlich, daß Bcl-2-Überexpression auf die Differenzierung des Brustepithels keinen Einfluß nimmt. So führte Bcl-2-Überexpression in epithelialen Brustzellen in vitro zu einer epithelial-mesenchymalen Konversion und schließlich zur Ausformung dreidimensionaler Strukturen (Lu et al., 1995). Überexpression von Bcl-2 in einer dopaminergen neuronalen Zelllinie führte zur Ausbildung neuritischer Ausläufer (Oh et al., 1996). Zwar führten weder Bcl-2- noch Bcl-x<sub>L</sub>-, dagegen aber Überexpression des ebenfalls anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2-Homologs A1 zur Differenzierung einer prämyeloiden Zelllinie (Lin et al., 1996; Rodel und Link, 1996). Diese Befunde führen zu einem Konzept, wonach die Inhibition der Apoptose bestimmte Differenzierungswege erlaubt, die unter gegebenen

---

\* Anhand von Totalpräparaten wurden jedenfalls keine auffälligen Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Brustdrüsen nach mehreren Laktationsphasen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Umständen sonst in den Suizid der betreffenden Zelle münden würden. Möglicherweise können auf diese Weise die bloß korrelativen Studien verstanden werden, die Bcl-2-Expression in fötalem Gewebe mit einer möglichen morphogenetischen Bedeutung in Verbindung brachten (LeBrun et al., 1993; Nathan et al., 1994).

#### **4.2.5. Spielt TGF- $\beta$ 1 eine Rolle in der involutions-assoziierten Apoptose alveolärer Zellen?**

Die frühe Induktion von TGF- $\beta$ 1 während der Involution (Strange et al., 1992; Atwood et al., 1995; diese Arbeit) ist konsistent mit einer möglichen Rolle des Wachstumsfaktors in der Apoptose alveolärer Zellen. Einen weiteren Hinweis geben transgene Mäuse, bei denen die Expression von TGF- $\beta$ 1 unter der Kontrolle eines WAP-Promotors zur Apoptose alveolärer Zellen führt (Jhappan et al., 1993; Kordon et al., 1995). Die Brustdrüsen dieser Tiere zeigen eine normale Ausbildung duktaler Strukturen, mit dem Ende der Schwangerschaft jedoch eine beträchtlich verminderte Zahl an Alveoli. Da die alveolären Epithelzellen in den Brustdrüsen dieser Mäuse die Milchproteine WAP und  $\beta$ -Casein zu synthetisieren vermögen, ist die Unfähigkeit der Tiere zu laktieren wahrscheinlich an die verminderte Zahl alveolärer Strukturen geknüpft, mithin ein Resultat der Apoptose-Induktion durch das Transgen.\*

Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß ein eingekreuztes WAP-bcl-2-Transgen weder die Laktationsinsuffizienz noch die erhöhte Apoptoserate in den alveolären Zellen des Brustepithels WAP-TGF- $\beta$ 1-transgener Mäuse aufheben kann. Die in den alveolären Zellen beobachtete Apoptose ist sehr wahrscheinlich eine direkte Konsequenz der TGF- $\beta$ 1-Überexpression; beispielsweise vermochte TGF- $\beta$ 1 in vitro u.A. auch in epithelialen Zellen der Prostata Apoptose auszulösen (Martikianen et al., 1990; weitere Referenzen in: Kordon et al., 1995). Somit ist Bcl-2 offenbar nicht in der Lage, den vom TGF- $\beta$ 1-Rezeptor zur Apoptose führenden Signalweg zu unterbrechen. Da Bcl-2 während der Involution mit der Apoptose alveolärer Zellen interferiert, ohne die Kinetik der TGF- $\beta$ 1-Expression zu beeinflussen, folgt hieraus, daß TGF- $\beta$ 1

---

\* Interessanterweise führt die Expression von TGF- $\beta$ 1 unter der Kontrolle des MMTV-Promotors zu einem entgegengesetzten Phänotyp: mangelhafte Bildung ductaler, während der Schwangerschaft aber normale Bildung alveolärer Strukturen und Fähigkeit zu laktieren (Pierce et al., 1993).



nicht kausal in die involutions-assoziierte Apoptose der alveolären Zellen involviert sein kann.

Allerdings könnte das Unvermögen von Bcl-2, TGF- $\beta$ 1-induzierte Apoptose zu unterdrücken, auch von der Konzentration von TGF- $\beta$ 1 abhängen; möglicherweise ist die WAP-Promotor-getriebene Expression des Wachstumsfaktors weit stärker als die endogene während der Involution. Überhaupt könnte die Apoptose nur eine indirekte Konsequenz der starken Überexpression eines Proteins sein. So führt die brustdrüsen-spezifische Überexpression überraschend vieler Transgene zur Apoptose alveolärer Zellen, so daß man dahinter auch einen unspezifischen Effekt vermuten könnte (vgl. beispielsweise Bortner & Rosenberg, 1995; Li et al., 1996a; Li et al., 1996c). Indes ist beispielsweise p53- oder c-Myc-induzierte Apoptose im Unterschied zur TGF- $\beta$ 1-induzierten durch Bcl-2 inhibierbar.

Es wurde darüberhinaus auch nicht geprüft, ob das WAP-bcl-2-Transgen überhaupt in den Brustdrüsen WAP-TGF- $\beta$ 1-transgener Mäuse exprimiert wird. Beispielsweise ist die per Northern- und Western Blot nachweisbare Menge des endogenen WAP-Transcripts bzw. -Proteins in den Brustdrüsen WAP-TGF- $\beta$ 1-transgener Mäuse dramatisch reduziert (Jhappan et al., 1993), und man könnte eine ähnliche Herunterregulierung des WAP-bcl-2-Transgens annehmen. Andererseits exprimieren die wenigen ausgebildeten Alveoli immunhistochemisch nachweisbares WAP-Protein weitgehend normal (Jhappan et al., 1993), so daß die verminderte Transcript- bzw. Proteinmenge in Brustdrüsenextrakten wahrscheinlich die geringere Zahl alveolärer Strukturen reflektiert. Inhibition eines WAP-getriebenen Transgens würde auch zu dem Paradox führen, daß die Expression des TGF- $\beta$ 1-Transgens seine eigene Expression wiederum reprimiert. Allerdings könnte auf diese Weise, im Sinne einer negativen Rückkopplung, das Expressionsniveau tatsächlich geringfügig vermindert werden.

#### **4.2.6. Inhibition p53-abhängiger Apoptose alveolärer Zellen durch Bcl-2**

In WAPp53-transgenen Mäusen wurde eine erhöhte Apoptoserate im alveolären Brustepithel mit dem Ende der Schwangerschaft sowie eine verminderte Fähigkeit zu laktieren (gemessen am Untergewicht der Nachkommen) beschrieben (Li et al., 1994). In diesen Transgenen wird, unter Kontrolle des WAP-Promotors der Ratte, ein p53-Minigen in den Brustdrüsen

überexprimiert, das für eine mutierte Form von p53 kodiert. Dennoch weist dieses charakteristische Eigenschaften des Wildtyp-Proteins auf.

Das Wildtyp-p53-Protein (Übersicht in Gottlieb und Oren, 1996) vermag einerseits an ein bestimmtes Sequenzmotiv der DNA im Promotorbereich bestimmter Zielgene zu binden und diese zu transaktivieren. Dies wurde beispielsweise gezeigt für das Gen des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen p21/WAF-1 sowie für das pro-apoptotische Bcl-2-Homolog Bax. Beide Gene spiegeln die zweifache Wirkung von p53 auf Zellen wider, nämlich einerseits mit der Proliferation zu interferieren, andererseits, z.B. nach  $\gamma$ -strahleninduzierter DNA-Schädigung, Apoptose zu induzieren.

In den Brustdrüsen WAp53-transgener Mäuse ist das Expressionsniveau von WAF-1 gegenüber Wildtyp-Kontrollen erhöht; zudem ist die Apoptoserate alveolärer Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung sowie am Tag 2 der Laktation erhöht (Li et al., 1994; Li et al., 1996a). Damit können diese Mäuse als ein Modell für p53-abhängige Apoptose alveolärer Epithelzellen der Brustdrüse verstanden werden. Da nach Einkreuzen eines WAP-bcl-2-Transgens in doppelt-transgenen WAp53/WAP-bcl-2-Mäusen die Apoptoserate alveolärer Zellen drastisch gegenüber einzeltransgenen WAp53-Mäusen reduziert war, ist Bcl-2 offensichtlich in der Lage, p53-abhängige Apoptose alveolärer Zellen zu unterdrücken. Unterstützt wird diese Interpretation weiterhin durch den Befund der Inhibition c-Myc-induzierter Apoptose alveolärer Zellen (siehe unten); die p53-Abhängigkeit der c-Myc-induzierten Apoptose ist in Fibroblasten gezeigt worden (Hermeking und Eick, 1994). Allerdings könnte Bcl-2 auch in einen mutmaßlichen Signalweg zwischen c-Myc und p53 eingreifen.

Da, wie oben diskutiert, p53 wahrscheinlich nicht in die Apoptose alveolärer Zellen während der Involution involviert ist, vermag Bcl-2 in vivo somit mit p53-abhängigen und -unabhängigen Apoptose-Wegen zu interferieren.

Möglicherweise ist diese Inhibition in beiden Fällen direkt über die Interaktion von Bcl-2 mit dem möglicherweise induzierten Protein Bax zu erklären. Die Expression von Bax wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft. Indes kann die Apoptose-Induktion durch p53 von dessen Transaktivierungsvermögen separiert werden. So wurde eine p53-Mutante beschrieben, die zwar transaktivieren und den Zellzyklus p53-negativer Zellen blockieren kann, aber nicht mehr in der Lage ist, Apoptose auszulösen (Rowen et al., 1996). In der gleichen Studie wurde zudem gezeigt, daß Expression des

Wildtyp-p53-Proteins in p53-negativen Zellen (SAOS-2) zwar zu Apoptose und erhöhter WAF-1-, nicht jedoch zu erhöhter Bax-Expression führte. Umgekehrt konnte eine transcriptionell inaktive p53-Mutante zwar nicht mehr p21/WAF-1, gleichwohl aber Apoptose induzieren (Chen et al., 1996b).

Schwierig zu deuten ist die Beobachtung, daß in den Brustdrüsen WAPp53-transgener Mäuse am Tag 9 der Laktation praktisch keine apoptotischen Zellen zu detektieren waren. Möglicherweise wird das WAPp53-Transgen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr (stark genug) exprimiert. Es könnte allerdings auch sein, daß zu diesem Zeitpunkt bereits alle p53-sensitiven oder transgen-exprimierenden Zellen durch Apoptose deletiert worden waren und nur noch "transgen-insensitive" Zellen persistierten. In diesem Fall wäre nach mehreren Laktationsperioden eine Anreicherung solcher Zellen zu erwarten, was - wie auch die transgene p53-Expression am Tag 9 der Laktation - experimentell geprüft werden könnte.

Jedenfalls war somit ein möglicher Effekt von Bcl-2 am Tag 9 nicht meßbar. Das etwas höhere Gewicht der Nachkommen des doppelt-transgenen Weibchens läßt zwar eine teilweise aufgehobene Laktationsinsuffizienz vermuten. Allerdings gibt es schon zwischen den Würfen verschiedener einzeltransgener WAPp53-Muttertiere eine Variabilität in der gleichen Größenordnung, so daß ein Schluß nicht gezogen werden kann (Li et al., 1994).

Wie bei den WAP-TGF- $\beta$ 1-Transgenen besteht bei den WAPp53-transgenen Mäusen eine weitere experimentelle Schwierigkeit darin, daß die Expression des endogenen WAP-Gens gegenüber Kontrollen vermindert ist; da hier, am Tag 1 der Laktation, aber das eingekreuzte WAP-bcl-2-Transgen sich phänotypisch in einer reduzierten Zahl apoptotischer Zellen auswirkte, kann ausgeschlossen werden, daß seine Expression reprimiert wurde. Umgekehrt besteht wenig Anlaß, anzunehmen, Bcl-2 unterdrücke die WAPp53-induzierte Apoptose durch Repression dieses Transgens, da Bcl-2 während der Involution keinen Effekt auf die Expression des endogenen WAP-Gens hat.

#### **4.2.7. Partielle Inhibition c-Myc-induzierter Apoptose**

Das c-Myc-Protein spielt in der Kontrolle des Zellwachstums eine Doppelrolle (Übersicht in Evan und Littlewood, 1993). Einerseits in der Lage, die Zellproliferation zu stimulieren, kann es andererseits unter bestimmten Umständen Apoptose auslösen. Für beide Eigenschaften ist die Dimerisierung

mit einem Partnerprotein, Max, über ihre bHLH-LZ-Dimerisierungsdomänen notwendig. Das Myc-Max-Heterodimer bildet einen Transkriptionsfaktor, der an spezifische DNA-Sequenzmotive zu binden und Gene zu aktivieren vermag. Während Max ein langlebiges, ubiquitär und konstitutiv exprimiertes Protein darstellt, ist c-Myc sehr kurzlebig und seine Expression streng reguliert. In quieszenten Fibroblasten führt Serum-Zugabe zur raschen Induktion von c-Myc, dessen Expression dann (i.U. zu anderen "Immediate early"-Genen) aufrecht erhalten bleibt. Umgekehrt bringt ektopische c-Myc-Expression Zellen in den Zellzyklus. Entzieht man allerdings konstitutiv c-Myc exprimierenden Fibroblasten das Serum, so löst dies Apoptose aus. - Wie beide Eigenschaften von c-Myc mit der onkogenen Wirkung des Proteins möglicherweise zusammenhängen, soll weiter unten diskutiert werden.

In MMTVmyc-transgenen Mäusen war bislang lediglich die tumorigene Wirkung von c-Myc auf Zellen der Brustdrüse beschrieben (Stewart et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit wurde darüberhinaus beobachtet, daß in Brustdrüsen dieser Tiere eine hohe Anzahl an Zellen apoptotisch zugrundegeht. Konsistent mit den erwähnten In-vitro-Experimenten handelt es sich dabei vermutlich um einen direkten Effekt der Transgen-Expression in diesen Zellen. Die beobachtete Zahl apoptotischer Zellen (pro mikroskopisches Feld) liegt sogar höher als am dritten Tag der Involution bei Wildtyp-Mäusen.

Diese hohe Anzahl apoptotischer Zellen war in den Brustdrüsen doppelt-transgener WAP-bcl-2/MMTVmyc-Mäuse deutlich reduziert. Da in vitro Bcl-2 die c-Myc-induzierte Apoptose inhibieren konnte (Bissonnette et al., 1992; Fanidi et al., 1992), ist die Unterdrückung der Apoptosen im Brustepithel der doppelt-transgenen Mäuse wahrscheinlich die direkte Wirkung der Bcl-2-Überexpression\*. Zudem zeigt dies, daß beide Transgene offenbar im selben Zelltyp exprimiert werden.

Diese Koexpression ist keinesfalls selbstverständlich, da beide Transgene von verschiedenen Promotoren kontrolliert werden. So wird der MMTV-LTR durch Glucocorticoide und Progesteron gesteuert, der WAP-Promoter dagegen von Prolactin, Glucocorticoiden und Insulin (siehe die Diskussion in Kordon et al., 1995). Beispielsweise führte MMTV-LTR-getriebene TGF- $\beta$ 1-Expression nicht zur beschriebenen Inhibition der Entwicklung lobulo-alveolärer

---

\* Es gibt wenig Veranlassung anzunehmen, die Inhibition komme über die Repression des MMTVmyc-Transgens zustande. Erstens beeinflusste Bcl-2 die Expression keines der bislang untersuchten Gene. Zweitens würde dies der Tumorentstehung in den Doppelt-Transgenen entgegenwirken; tatsächlich wurde indessen eine beschleunigende Wirkung von Bcl-2 auf die c-Myc-induzierte Tumorentstehung gefunden.

Strukturen sondern zur Hemmung des duktales Wachstums (Pierce et al., 1993). Dies legt nahe, daß der MMTV-Promotor eher in duktales als in alveolären Zellen aktiv ist. In den MMTVmyc-transgenen Mäusen löste Transgen-Expression allerdings klar in alveolären Zellen Apoptose aus, was mit der Koexpression beider Transgene in den WAP-bcl-2/MMMTVmyc-Doppelt-Transgenen konsistent ist. Eine weitere Evidenz liefert die transgene Bcl-2-Expression in den MMTVmyc-Transgen-induzierten Tumoren (siehe unten).

Interessanterweise ist die Hemmung c-Myc-induzierter Apoptose durch Bcl-2 im Brustepithel nicht vollständig. Dies könnte darauf hindeuten, daß nicht in allen das MMTVmyc-Transgen exprimierenden Zellen auch das WAP-bcl-2-Transgen aktiv ist. Möglicherweise reflektiert dies allerdings auch eine Eigenschaft von Bcl-2, die bei genauer Betrachtung in den meisten publizierten in vitro-Experimenten offenkundig wird: offenbar unterdrückt Bcl-2 Apoptose nicht dauerhaft, sondern wirkt im Wesentlichen verzögernd (vgl. die Überlebenskurven in Hockenberry et al., 1990; Bissonnette et al., 1992). Besonders erhellend ist dies in der Studie von Yin & Schimke (1996) dargelegt, in der gefunden wurde, daß Aphodicolin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen durch (induzierbare) Bcl-2-Expression nur verzögert und letztlich das klonogene Überleben behandelte Zellen nicht verbessert wird.

### **4.3. Apoptose und Tumorigenese**

#### **4.3.1. Onkogenkooperation zwischen Bcl-2 und c-Myc in der Mammarkarzinogenese**

Die Entstehung eines Tumors ist ein Mehrschrittprozeß, in den die Aktivierung mehrerer Proto-Onkogene bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen involviert ist (vgl. Fearon und Vogelstein, 1990). Besonders deutlich kommt dies in transgenen Mäusen zum Ausdruck, die ein Onkogen in einem bestimmten Gewebe exprimieren (Übersicht in Adams und Cory, 1991). Zwar ist mit der Expression des Onkogens in den meisten Zellen dieses Gewebes ein erster Schritt in Richtung Tumorentstehung bereits getan; gleichwohl entstehen, von einer Ausnahme abgesehen (Muller et al., 1988), Tumore nur vereinzelt und erst nach dem Verstreichen einer gewissen

Latenzzeit. Mithin sind weitere Schritte nötig, da sonst das gesamte Gewebe sofort "transformiert" sein müßte.

In den MMTVmyc-transgenen Mäusen bedurfte es zur Entstehung einzelner Brusttumore eines Zeitraumes von über 14 Wochen; die meisten Tiere entwickelten Tumore erst nach 18 Wochen. Für diese Latenzzeit könnten intrinsische Eigenschaften des Transgens und seines Zielgewebes mitverantwortlich sein.

Erstens unterliegt die Aktivität des MMTV-Promotors hormonellen Einflüssen. Starke Transgenexpression ist somit an Schwangerschaft und Laktation gebunden. Tatsächlich ist die zur Tumorentstehung nötige Latenzzeit in Tieren, die niemals schwanger wurden, beträchtlich verlängert (Daten nicht gezeigt); solche Tiere wurden daher in die Analyse nicht eingeschlossen. Darüberhinaus könnten die hormonellen Einflüsse während der Schwangerschaft die Brustepithelzellen zu einem für die Tumorenstehung besonders anfälligen Differenzierungsstadium führen; diese promovierende Wirkung wäre demnach nur transient vorhanden und an die Schwangerschaft gebunden.

Zweitens könnten während der postlaktationalen Involution über die Induktion von Apoptosen zusammen mit normalen alveolären Zellen auch präneoplastische oder Tumor-Zellen deletiert werden. Dafür, daß die Brustdrüseninvolution tatsächlich einen derartigen Schutzmechanismus gegen die Tumorbildung darstellt, spricht, daß die Inhibition der Involution durch transgenes hGH (humanes Wachstumshormon) zu beschleunigter Brusttumorentstehung in WAP-ras-transgenen Mäusen führte (Andres et al., 1991). Hier ist anzumerken, daß MMTVmyc-Transgene nicht zu laktieren vermögen, die Involution somit vermutlich direkt nach dem Werfen einsetzt.

Drittens induzierte das MMTVmyc-Transgen selbst in hohem Ausmaß Apoptose im Brustepithel. Es ist zu erwarten, daß dies der Tumorentstehung entgegenwirkt, indem die Wahrscheinlichkeit geringer wird, daß Transgen-exprimierende Zelle im Epithel persistieren.

In doppelt-transgenen WAP-bcl-2/MMTVmyc-Mäusen war die Tumorbildung beschleunigt. Somit können Bcl-2 und c-Myc in der Tumorigenese der Brust kooperieren. Der kooperative Effekt der Bcl-2-Koexpression ist indes nicht so stark ausgeprägt wie beispielweise zwischen Ha-ras und c-myc, wo die mittlere Latenzzeit gegenüber MMTVmyc-Einzeltransgenen um etwa 40 Wochen und auch die minimale Latenzzeit um etwa 12 Wochen reduziert wurde (Sinn et al., 1987). Dagegen lag der früheste

Zeitpunkt der Tumorbildung in WAP-bcl-2/MMTVmyc-doppelt-Transgenen nur 2 Wochen vor dem der Einzeltransgene; die mittlere Latenzzeit war um 4 Wochen reduziert. Allerdings erfolgte die Tumorentwicklung in den MMTVmyc-Transgenen in der vorliegenden Arbeit weitaus rascher, als von Stewart et al. (1984) bzw. von Sinn et al. (1987) beschrieben: 18 Wochen mittlere Latenzzeit vs. 46 Wochen in diesen früheren Arbeiten. Dies könnte im verschiedenen und zudem gemischten genetischen Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere begründet liegen. Darüberhinaus machen diese frühen Publikationen keine Angaben über die Zahl oder Frequenz der Schwangerschaften im Zeitraum bis zur Tumordetektion. Somit fällt schon rein rechnerisch jeder mögliche Beitrag des WAP-bcl-2-Transgens geringer aus. Ein wesentlicher Unterschied ist zudem, daß das MMTV-Haras-Transgen selbst zu einer sehr frühen Tumorentstehung führte; dagegen wurden in WAP-bcl-2-transgenen, weiblichen Mäusen innerhalb von anderthalb Jahren Alter keine spontanen Brusttumore beobachtet.

Eine weitere Komplikation der vorliegenden Arbeit bestand in in der Kreuzung transgener Mäuse, deren Transgene von unterschiedlichen Promotoren gesteuert werden (vgl. die Diskussion im vorigen Kapitel). Sowohl die Unterdrückung c-Myc-induzierter Apoptose als auch die Bcl-2-Expression in den Tumoren doppelt-transgener Weibchen zeigt, daß es mit Sicherheit ein zeitliches Fenster gab, in dem beide Transgene im selben Zelltyp koexprimiert wurden und aus dem dann ein Tumor entstand.

Zwar konnte das WAP-bcl-2-Transgen die Unfähigkeit der MMTVmyc-Mäuse zu laktieren nicht beheben. Allerdings ist anzunehmen, daß Bcl-2 auch in doppelt-transgenen Mäusen die involutions-assoziierte Apoptose zu unterdrücken vermag (die somit unmittelbar nach dem Werfen einsetzt). Zudem vermochte transgenes Bcl-2 die c-Myc-induzierte Apoptose partiell zu unterdrücken. Somit interferiert Bcl-2 mit zwei der drei angegebenen möglichen Ursachen der Tumoraltenz in den MMTVmyc-transgenen Mäusen, und zwar durch seine Eigenschaft, Apoptose zu unterdrücken. Vermutlich ist also die Inhibition der Apoptose die mechanistische Basis der Kooperation von Bcl-2 und c-Myc in der Entstehung von Brusttumoren in den transgenen Mäusen. Verallgemeinernd kann gefolgert werden, daß die Ausschaltung des Apoptoseprogramms einen Schritt in der c-Myc-induzierten Karzinogenese der Brust darstellt. Da aber auch in den doppelt-transgenen Mäusen nicht das gesamte Brustepithel "transformiert" ist, ist dieser "zweite" Schritt nicht ausreichend. Indes könnte dies auch mit der nur partiellen Inhibition der c-

Myc-induzierten Apoptose von Brustepithelzellen durch Bcl-2 zusammenhängen.

Auch die synergistische Wirkung von TGF $\alpha$  und c-Myc in der Brusttumorigenese transgener Mäuse wurde mit der Inhibition c-Myc-induzierter Apoptose durch TGF $\alpha$  begründet (Amundadottir et al., 1996). Allerdings wurden in dieser Studie nur Tumore verglichen und kein normales bzw. präneoplastisches Brustdrüsengewebe. Zudem führt die Expression von TGF $\alpha$  bereits per se zur Entstehung von Brusttumoren in transgenen Mäusen (Sandgren et al., 1995; Amundadottir et al., 1996), läßt also im Unterschied zu den WAP-bcl-2-transgenen Mäusen nicht das Studium der isolierten Wirkung der Apoptose-Inhibition zu.

Die Kooperation zwischen Bcl-2 und c-Myc in der Mammakarzinogenese gemahnt stark an die synergistische Wirkung beider Proteine in der Entstehung von Lymphomen der Maus. Auch hier war durch Kreuzung transgener Mäuse, die Bcl-2 bzw. c-Myc in ihren B-Zellen überexprimieren (bcl-2-Ig- bzw. E $\mu$ -myc-transgene Mäuse) beschleunigte Tumorentstehung beobachtet worden (Marin et al., 1995). Die durch Bcl-2 unterdrückte Apoptose betraf zwei Aspekte: verlängertes Überleben maturer B-Zellen der Milz (McDonnell et al., 1989) sowie Inhibition der c-Myc-induzierten Apoptose in aus der Milz isolierten B-Zellen (Marin et al., 1995). Der erste Aspekt würde in WAP-bcl-2-transgenen Mäusen in etwa der verzögerten Apoptose alveolärer Zellen während der Involution entsprechen; der zweite Aspekt wäre der partiellen Suppression c-Myc-induzierter Apoptose in WAP-bcl-2/MMTVmyc-Mäusen analog. Ein wichtiger Unterschied besteht allerdings darin, daß die Bcl-2-Expression in den bcl-2-Ig-transgenen Mäusen konstitutiv, und nicht wie in den WAP-bcl-2-Transgenen hormonellen Schwankungen unterworfen, ist. In den Brustdrüsen WAP-bcl-2-transgener Mäuse kommt es langfristig nicht zu augenfälligen Veränderungen in der Brustdrüse, wie anhand von Totalpräparaten festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt); wahrscheinlich hängt dies mit der höheren Apoptoserate am Tag 4 der Involution zusammen, wobei quasi die an den Tagen zuvor "vergessenen" Apoptosen nachgeholt werden. Dagegen reichert sich in den bcl-2-Ig-Transgenen eine polyklonale B-Zell-Population an, aus der schließlich nach über einjähriger Latenzzeit Lymphome hervorgehen (McDonnell und Korsmeyer, 1991).



#### 4.3.2. Möglicher Beitrag von Bcl-2 zur Karzinogenese von Haut bzw. Dickdarm

Ist nun die Induktion der Apoptose und die somit zur Tumorentstehung nötige Apoptose-Inhibition eine spezifische Eigenschaft des c-Myc-Proteins? Der negative Ausgang des Hautkarzinogenese-Experiments an den iv-bcl-2-transgenen Mäusen scheint darauf hinzudeuten. Weder unterschieden sich der Prozentsatz transgener von dem nicht-transgener Tiere, die Papillome aufwiesen, noch die Anzahl von Papillomen pro Tier zwischen den beiden Gruppen. Die einzigen Unterschiede bestanden zwischen männlichen und weiblichen Tieren, und zwar unabhängig davon, ob sie Transgen-Träger waren. Neben hormonellen Unterschieden zwischen den Geschlechtern könnte dies den trivialen Grund haben, daß zusammen in einem Käfig gehaltene männliche Mäuse sich häufig verbeißen. Die resultierenden Hautwunden könnten einerseits durch ihre tumorpromovierende Wirkung anfänglich zur Papillombildung beitragen; andererseits verursachen die Verbeißungen wahrscheinlich auch mit der Zeit den Verlust gebildeter Papillome.

Es ist allerdings durchaus möglich, daß feinere Effekte des Transgens von unterschiedlichen Tumor-Suszeptibilitäten der Tiere verdeckt worden sind. Zur schnellen Erzielung einer ausreichend großen Gruppe transgener bzw. nicht-transgener Tiere waren männliche iv-bcl-2-transgene Mäuse mit superovulierten weiblichen B6D2F1-Hybridmäusen verpaart worden. Somit sind die im Experiment eingesetzten Nachkommen genetisch nicht identisch und weisen zufallsmäßig unterschiedliche Anteile des DBA/2- und des C57Bl6-Genoms auf. Da beide Mausstämme sich stark in ihrer Tumorsuszeptibilität im 2-Stufen-Karzinogeneseprotokoll unterscheiden (DiGiovanni, 1995), könnte dies in der zufallsmäßigen An- oder Abwesenheit eines Suszeptibilitätsgens in den im Experiment eingesetzten Tieren resultieren. In zukünftigen Experimenten muß das Initiations-Promotions-Protokoll daher an genetisch homogenen Tieren durchgeführt werden.

Eine mehr prinzipielle Schwierigkeit des experimentellen Ansatzes könnte im initiierten Zelltyp liegen. Möglicherweise sind dies basale Zellen, die ohnehin starke endogene Bcl-2-Expression aufweisen (Rodriguezvillanueva et al., 1995), und weniger die suprabasalen Zellagen, für die der Involucrin-Promotor spezifisch ist (Carroll et al., 1993). Somit ist es schwierig, aus dem 2-Stufen-Karzinogenese-Protokoll der Haut eine Folgerung zu ziehen. Es wäre allerdings interessant, in zukünftigen Experimenten (beispielsweise durch

Einkreuzen eines Transgens, das in suprabasalen Zellen spezifisch zur Expression eines Onkogens führt) Tumore direkt in suprabasalen Hautschichten zu induzieren.

Ähnlichen Einschränkungen unterliegt das Darmkarzinogenese-Experiment. Hier zeigten Min/Bcl-2-Mäuse gegenüber Min-Kontrollmäusen im gesamten Darmbereich keine erhöhte Tumorzinzidenz. Erst bei gesonderter Betrachtung des Dickdarmbereiches trat in Min/Bcl-2-Mäusen eine gegenüber Kontrollen erhöhte Zahl an Tumoren zutage. Dieses Ergebnis ist statistisch zwar signifikant; gleichwohl bedarf es zur Erhärtung noch größerer Tierzahlen\*. Nimmt man den gefundenen Unterschied ernst, so könnte er darauf hindeuten, daß durch die APC-Mutation im Dünndarm ein Zelltyp initiiert wird, der entweder bereits endogen Bcl-2 oder aber kein Transgen exprimiert; im Dickdarm könnte dagegen ein transgen-exprimierender Zelltyp, der endogen kein Bcl-2 exprimiert, initiiert worden sein. Dies wäre mit dem gefundenen Unterschied konsistent unter der Prämisse, daß Bcl-2-Expression tatsächlich die Tumorentstehung begünstigen würde - was allerdings erst zu prüfen wäre. In der Tat korrelierten Merrit et al. (1995) die unterschiedliche Tumorsuszeptibilität von Dick- und Dünndarm der Maus mit der unterschiedlichen Bcl-2-Expression und Apoptoseresistenz der initiierten Zelltypen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es leider nicht, die Transgenexpression immunhistochemisch nachzuweisen. Somit kann gegenwärtig aus dem Experiment kein Schluß gezogen werden.

Interessanterweise führte Transfektion humaner kolorektaler Zellen, deren APC-Gene mutiert waren, mit einem Wildtyp-APC-cDNA-Expressionsvektor zur Apoptose, was auf eine Rolle von APC in der Apoptose hindeutet (Morin et al., 1996). Mithin könnte auch die in Min-Mäusen vorkommende Mutation des APC-Homologs einen zur Apoptose führenden Signalweg unterbrechen und auf diese Weise zur Tumorentstehung beitragen. Dies würde einen möglichen Effekt des ubi-bcl-2-Transgens wahrscheinlich verdecken. Andererseits stimmte dies mit der Annahme überein, wonach die Inhibition der Apoptose die Tumorentstehung begünstigt.

Auf diese Weise wird es allerdings schwierig zu verstehen, weshalb Darmtumore des Menschen häufig Bcl-2 exprimieren (Hague et al., 1994; Bronner et al., 1995; Sinicrope et al., 1995). Dies könnte in einem initiierten

---

\* Man kann durch Probieren leicht feststellen, daß der Unterschied nicht mehr signifikant wäre, wenn nur eines der Min-Tiere 3 Dickdarmtumore aufgewiesen hätte. Es kann im Nachhinein nicht ausgeschlossen werden, daß tatsächlich ein kleinerer Tumor übersehen werden konnte.

Zelltyp begründet liegen, der endogen Bcl-2 exprimiert. Oder aber die anti-apoptotische Wirkung von APC-Mutationen könnte über die Induktion von Bcl-2 funktionieren (bzw. Wildtyp-APC würde die Bcl-2-Expression unterdrücken). Für die funktionale Bedeutung von Bcl-2 in kolorektalen Tumoren spricht die chromosomale Lokalisation des bcl-2-Gens auf Chromosom 18q21. In der weiteren Progression kolorektaler Tumore ist dieser Bereich häufig deletiert; er trägt u. A. den DCC-Tumorsuppressorgenlokus (Fearon und Vogelstein, 1990). Umgekehrt finden sich in späteren Progressionsstadien häufig zugleich p53-Mutationen. Deren anti-apoptotischer Effekt könnte den Verlust von Bcl-2 ausgleichen. Zwar wurde eine inverse Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und p53-Status kolorektaler Tumore gefunden (Merritt et al, 1995; Sinicrope et al., 1995). Untersuchungen zur 18q21-Deletion und Bcl-2-Expression in Dickdarmtumoren wurden allerdings bislang noch nicht publiziert.

#### **4.3.4. Weitere experimentelle Hinweise auf eine Rolle der Apoptose-Inhibition in der Tumorigenese**

Unter den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen weist die gefundene Kooperation zwischen Bcl-2 und c-Myc in der Brusttumorigenese direkt auf die mögliche Bedeutung der Apoptose-Inhibition für die Tumorentstehung hin. In die gleiche Richtung gehen die oben besprochenen Experimente, in denen Bcl-2 und c-Myc in der Lymphomagenese und TGF $\alpha$  und Bcl-2 in der Tumorigenese der Brust synergistisch zusammenwirken. Der häufige Verlust von Wildtyp-p53-Funktionen in Tumoren des Menschen sowie die häufig angetroffene Bcl-2-Expression lassen vermuten, daß der kooperative Effekt der Apoptose-Inhibition nicht lediglich eine Spezialität c-Myc-induzierter Tumore darstellt. Experimentelle Studien sind indes bis heute spärlich geblieben. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden derartige Experimente initiiert. In Kollaboration mit Dr. Priscilla Furth (University of Maryland Medical School, Baltimore, USA) soll durch Kreuzung der Einfluß des WAP-bcl-2-Transgens auf die Apoptose und Karzinogenese des Brustepithels in WAP-SV40-Tag-transgenen Mäusen studiert werden. WAP-SV40-Tag-transgenen Mäuse entwickeln nach langer Latenz Brusttumore (Tzeng et al., 1993); da das Transgen in den Brustdrüsen dieser Tiere gleichzeitig Apoptose induziert (Li et al., 1996c) könnte dies für die Tumorlatenz (mit-)verantwortlich sein und durch Bcl-2-Überexpression

komplementiert werden. Analog werden in Kollaboration mit Dr. Jeffrey Rosen (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA) Experimente durchgeführt, die den Einfluß des WAP-bcl-2-Transgens auf die DMBA-induzierte Brustkarzinogenese in Mäusen ermitteln sollen, die ein WAPp53-Transgen (Li et al., 1996a) tragen oder Wildtyp sind. Zwar bestätigen vorläufige Ergebnisse die Vermutung (P. Furth, persönliche Mitteilung), doch stehen die Endergebnisse beider Experimente noch aus.

Ein besonders klares Experiment publizierten Howes et al. (1994). Retinale Expression des SV40-Groß-T-Antigens (SV40-Tag) führte in transgenen Mäusen zur Entstehung von Retinoblastomen. Die zelltransformierende Wirkung von SV40-Tag hängt mit der Bindung und wahrscheinlich Inaktivierung des Retinoblastom-Tumorsuszeptibilitäts-Proteins (pRb) und des p53-Proteins zusammen. Retinale Expression des E7-Proteins aus HPV-16 (humanes Papillomvirus 16), welches nur pRb, nicht jedoch p53 inaktiviert, führte dagegen, anstatt zur Tumorbildung, zur Apoptose retinaler Photorezeptoren. Interessanterweise führte Expression von HPV-16-E7 in der Retina von p53<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht zur Degeneration der Photorezeptoren, sondern zur Entstehung von Retinoblastomen. Dieses Experiment zeigt somit, daß die Inaktivierung von pRb nur dann onkogenes Potential hat, wenn gleichzeitig ein p53-abhängiger Apoptose-Mechanismus inaktiviert wird.

In einer neueren Arbeit führte transgene Expression des Bcl-2-Homologs Bcl-x<sub>L</sub> in pankreatischen  $\beta$ -Zellen zur Inhibition p53-unabhängiger Apoptose und zur Beschleunigung des Entstehens SV40-Tag-induzierter Insulinome (Naik et al., 1996). Dieses experimentelle System gestattete eine detailliertere Analyse der Tumorprogression. Es zeigte sich, daß die Inzidenz kleinerer Tumore nicht verändert war. Dagegen erhöhte die Inhibition der Apoptose die Inzidenz größerer, vaskularisierter Tumore.

Dies wirft die Frage auf, auf welcher Stufe der Tumorprogression sich die Inhibition der Apoptose beschleunigend auswirkt. In den SV40-Tag-induzierten Insulinomen sind dies offenbar späte Schritte der Progression. Wofern APC-Mutationen ein Anfangsstadium kolorektaler Tumorprogression markieren und einen Apoptose-Weg unterbrechen (Morin et al., 1996), würde die Apoptose-Inhibition sich offenbar günstig auf die Frühphase der Tumorentstehung auswirken; spätere p53-Mutationen legen allerdings nahe, daß auch in späteren Progressionsstufen diese Inhibition von Bedeutung sein könnte. In den c-Myc-induzierten Brusttumoren MMTVmyc-transgener

Mäuse ist Apoptose offenbar ein frühes Ereignis, das der Tumorentstehung vorausgeht. Mithin dürfte sich die Unterdrückung von Apoptosen bereits während der Tumorentstehung auswirken. Rechnerische Simulationen des Tumorwachstums ergeben tatsächlich, daß gerade die Frühphase der Tumorentstehung empfindlich gegenüber veränderten Apoptose-Inzidenzen ist (Berman und Moore, 1992).

Auch in der Metastasierung spielt die Unterdrückung von Apoptosen vermutlich eine Rolle. Bereits in frühen Experimenten, die von Sub-Zelllinien eines metastatischen Melanoms der Maus mit unterschiedlichem Metastasierungspotential ausgingen, zeigte sich, daß bereits einen Tag nach der intravenösen Injektion von (markierten) Tumorzellen niedrigen Metastasierungspotentials in syngene Mäuse keine lebenden Tumorzellen in den Lungen der Tiere mehr nachweisbar waren; dagegen überlebten im gleichen Zeitraum ca. 14 Prozent der injizierten Zellen hohen Metastasierungspotentials (Aukerman et al., 1986). Zwar wurde hier nicht bestimmt, ob die nichtüberlebenden Zellen apoptotisch abstarben, doch weisen bereits diese frühen Arbeiten darauf hin, daß die Ineffizienz der Metastasierung (Übersicht in Weiss, 1990) möglicherweise mit dem Absterben der Tumorzellen zusammenhängt. - Konsistent hiermit erwies sich die Expression des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, dessen Expression in menschlichen Melanomen mit der Metastasierung korreliert worden ist (Albeda et al., 1991), in vitro als essentiell für das Überleben einer Melanom-Zelllinie in einem Kollagengel; blockierte man die Adhäsion durch anti- $\alpha_v$ -Integrin-Antikörper, so führte dies zur Apoptose (Montgomery et al., 1994). - Die Sektion der WAP-bcl-2/MMTVmyc-transgenen Mäuse erbrachte allerdings keine Hinweise auf (makroskopisch sichtbare) Metastasen; dies könnte damit zusammenhängen, daß die Tumore in diesen Transgenen sehr schnell wuchsen und die Tiere recht bald nach der Detektion eines Tumors getötet wurden; Transplantationsexperimente könnten Aufschluß über das metastatische Potential dieser Tumore geben.

Ausschaltung eines Apoptose-Mechanismus kann darüberhinaus auch Ursache der Resistenz von Tumoren gegenüber Bestrahlung (Stephens et al., 1991) oder Chemotherapie (Hickman, 1992) sein. Beispielsweise führte Transfektion einer humanen Lymphomzelllinie mit einem bcl-2-cDNA-Expressionsvektor zur Resistenz gegenüber Thymidylat-Synthase-Inhibitoren; diese Resistenz beruhte nicht auf "klassischen" Resistenzmechanismen (Änderungen der zellulären Pharmakodynamik, Transport der Drogen in die

Zelle etc.), sondern war assoziiert mit einer niedrigeren Apoptoserate (Fisher et al., 1993). Auch das Auftreten therapie-resistenter Prostatakarzinomzellen wurde mit der Expression von Bcl-2 in Verbindung gebracht (McDonnell et al., 1992). Tatsächlich führte Transfektion der androgen-abhängigen Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP mit einem bcl-2-cDNA-Expressionsvektor zur Resistenz gegenüber Androgen-Depletion *in vitro*; die aus der Injektion der transfizierten Zellen in Nacktmäuse resultierenden Tumore wuchsen schneller und im Unterschied zu nicht-transfizierten Kontrollzellen auch in kastrierten männlichen Tieren (Raffo et al., 1995) \*.

#### 4.3.5. Ausblick: Spekulationen und Folgerungen

Inhibition der Apoptose könnte auf drei Weisen zur Tumorentstehung beitragen. Zunächst durch eine Verschiebung der Gewebshomöostase in Richtung höherer Zellzahlen. Dann durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit, tumorigene Mutationen zu akkumulieren, die durch eine längere Lebensdauer der Zellen resultieren würde. Die vorliegende Arbeit legt jedoch nahe, daß die Induktion von Apoptose eine intrinsische Eigenschaft oder Konsequenz der zellulären Entartung darstellt. Somit würden im Lauf der Tumorentstehung notwendig Zellen selektioniert, in denen die Apoptose außerkraft gesetzt ist. Demnach kann Apoptose einen Schutzmechanismus gegen die Tumorbildung darstellen, und zwar auf mehreren Stufen der Tumorprogression. Die anti-apoptotischen Mechanismen der frühen Progression könnten in späteren Stufen unwirksam sein, da dort eventuell andere Stimuli zur Apoptose führen; dies würde weitere kompensatorische Mechanismen erfordern. (Ein Beispiel ist die erwähnte frühe Bcl-2-Expression kolorektaler Karzinome, die in späteren Stadien verloren geht und durch gleichzeitig entstandene p53-Mutationen kompensiert werden könnte.) Das Umgehen dieses Schutzmechanismus kann prinzipiell auf mehreren Wegen erfolgen. Erstens in der Weise einer Unterbrechung einer spezifischen zur Apoptose führenden Signalkette. Zweitens in der Aktivierung eines die Apoptose unterdrückenden Signalwegs. Drittens könnte der Apoptose-Mechanismus selbst mutiert sein. Dies würde das Risiko zu höherer Malignität führender Veränderungen erhöhen, wofern die darin involvierten Progressions-Schritte Apoptose-sensitiv

---

\* Es läge auf der Hand zu prüfen, ob LNCaP-Zellen Bcl-2 exprimieren und ob Androgen-Depletion oder Anti-Androgene das endogene Bcl-2-Gen herunter regulieren.

sind. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß therapeutische Maßnahmen, die verschiedene Angriffspunkte gleichzeitig angehen (Kombinationstherapie), einen Zelltyp selektionieren, in dem der Apoptosemechanismus selbst außer Kraft gesetzt ist. Damit stiege die Wahrscheinlichkeit weiterer maligner Entartung. Andererseits bedeutete dies, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit die zur Apoptose führenden Signalwege noch funktionieren würden, die Tumorzellen, im Unterschied zu nicht-malignen Zellen, demnach "bereit" oder "empfänglich" dafür wären, apoptotisch zugrunde zu gehen. Dies weist den Weg zu subtileren Therapieformen, die darauf abzielen, den mutierten Apoptosemechanismus wieder herzustellen, um die Apoptose-Suszeptibilität von Tumorzellen dann auszunutzen. Ein Ansatz bestand bislang darin, durch viralen Gentransfer eine bcl-x<sub>s</sub>-cDNA in Tumorzellen zu exprimieren (Clarke et al., 1995). Tatsächlich löste dies selektiv in Tumorzellen, und nicht in normalen Zellen, Apoptose aus.

## 5. Literatur

Abe-Dohmae, S., Harada, N., Yamada, K. & Tanaka, R. (1993) bcl-2 gene is highly expressed during neurogenesis in the central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 191, 915-921.

Adams, J.M. & Cory, S. (1991) Transgenic models of tumor development. *Science*, 1161-1166.

Albeda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M. & Buck, C.A. (1991) Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the  $\beta_3$  subunit with tumor progression. *Cancer Res.*, 50, 6757-6764.

Alnemri, E.S., Robertson, N.M., Fernandes, T.F., Croce, C.M. & Litwack, G. (1992) Overexpressed full-length human BCL2 extends the survival of baculovirus-infected Sf9 insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 7295-7299.

Amundadottir, L.T., Nass, S.J., Berchem, G.J., Johnson, M.D. & Dickson, R.B. (1996) Cooperation of TGF $\alpha$  and c-Myc in mouse mammary tumorigenesis: coordinated stimulation of growth and suppression of apoptosis. *Oncogene*, 13, 757-765.

Andres, A.C., Schönenberger, C.-A., Groner, B., Hennighausen, L., LeMeur, M. & Gerlinger, P. (1987) Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: Tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 1299-1303.

Andres, A.C., Bchini, O., Schubaur, B., Dolder, B., LeMeur, M. & Gerlinger, P. (1991) H-ras induced transformation of mammary epithelium is favoured by increased oncogene expression or by inhibition of mammary regression. *Oncogene*, 6, 771-779.

Andres, A.C., Zuercher, G., Djonov, V., Flueck, M. & Ziemiecki, A. (1995) Protein tyrosine kinase expression during the estrous cycle and carcinogenesis of the mammary gland. *Int. J. Cancer*, 63, 288-296.



Atwood, C.S., Ikeda, M & Vonderhaar, B.K. (1995) Involution of mouse mammary glands in whole organ culture: a model for studying programmed cell death. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 207, 860-867.

Aukerman, S.L., Price, J.E. & Fidler, I.J. (1986) Different deficiencies in the prevention of tumorigenic-low-metastatic murine K-1735b melanoma cells from producing metastasis. *JNCI*, 77, 915-924.

Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBridge, O.W., Epstein, A.L. & Korsmeyer, S.J. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around J<sub>H</sub> on Chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, 41, 899-906.

Bchini, O., Andres, A.C., Schubaur, B., Mehtali, M., Le Meur, M., Lathe, R. & Gerlinger, P. (1991) Precocious mammary gland development and milk protein synthesis in transgenic mice ubiquitously expressing human growth hormone. *Endocrinology*, 128, 539-546.

Berman, J.J. & Moore, G.W. (1992) The role of cell death in the growth of preneoplastic lesions: a Monte Carlo simulation model. *Cell Proliferation*, 25, 549-557.

Berenblum, I. (1954) A speculative review: the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res.*, 14, 471-477.

Berges, R.R., Furuya, Y., Remington, L., English, H.F., Jacks, T. & Isaacs, J.T. (1993) Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of glandular cells induced by androgen ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8910-8914.

Bertin, J., Mendrysa, S.M., LaCount, D.J., Gaur, S., Krebs, J.F., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J. & Friesen, P.D. (1996) Apoptotic suppression by baculovirus p35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J. Virology*, 70, 6251-6259.

- Bissonnette, R.P., Echeverri, F., Mahboubi, A. & Green, D.R. (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, 359, 552-554.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, G.B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74, 597-608.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E. & Cidlowski, J.A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biol.*, 5, 21-26.
- Bortner, D.M. & Rosenberg, M.P. (1995) Overexpression of cyclin A in the mammary glands of transgenic mice results in the induction of nuclear abnormalities and increased apoptosis. *Cell Growth Differ.*, 6, 1579-1589.
- Boudreau, N., Sympton, C.J., Werb, Z. & Bissell, M.J. (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, 267, 891-893.
- Boudreau, N., Werb, Z. & Bissell, M.J. (1996) Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 3509-3513.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E. & Palmiter, R.D. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 836-840.
- Bronner, M. P., Culin, C., Reed, J. C. & Furth, E. E. (1995) The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am. J. Pathol.*, 146, 20-26.
- Burdon, T., Sankaran, L., Wall, R.J., Spencer, M. & Hennighausen, L. (1991) Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. *J. Biol. Chem.*, 266, 6909-6914.

Carroll, J.M., Albers, K.M., Garlick, J.A., Harrington, R. & Taichman, L.B. (1993) Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 10270-10274.

Castle, V. P., Heidelberger, K. P., Bromberg, J., Ou, X., Dok, M. & Nunez, G. (1993) Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2 in neuroblastoma is associated with nonfavorable histology and N-myc amplification. *Am. J. Pathol.*, 143, 1543-1550.

Chen, C.J. & Faller, D.V. (1995) Direction of p21ras-generated signals towards cell growth or apoptosis is determined by protein kinase C and Bcl-2. *Oncogene*, 11, 1487-1498.

Chen, J., Flannery, J.G., LaVail, M.M., Steinberg, R.H., Xu, J. & Simon, M.I. (1996a) bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 7042-7047.

Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L. & Prives, C. (1996b) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes & Dev.*, 10: 2438-2451.

Cheng, E., H.-Y., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Hardwick, J.M. (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-x<sub>L</sub>. *Nature*, 379, 554-556.

Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G. & Dixit, V.M. (1996) Molecular ordering of the cell death pathway. *J. Biol. Chem.*, 271, 4573-4576.

Chirgwin, J.J., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5294-5299.

Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I. & Guild, B.C. (1995a) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, 374, 733-736.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. & Lutz, R.J. (1995b) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.*, 14, 5589-5596.

Choi, T., Huang, M., Gorman, C. & Jaenisch, R. (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 3070-3074.

Clarke, M. F., Apel, I. J., Benedict, M. A., Eipers, P. G., Sumantran, V., González-García, M., Doedens, M., Fukunaga, N., Davidson, B., Dick, J. E., Minn, A. J., Boise, L. H., Thompson, C. B., Wicha M. & Nunez, G. (1995) A recombinant bcl-x<sub>S</sub> adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 11024-11028.

Cleary, M.L. & Sklar, J. (1985) Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 7439-7443.

Cohen, J.J. (1993) Apoptosis. *Immunol. Today*, 14, 126-130.

Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K. M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C.A., Korsmeyer, S. & Buttyan, R. (1993) Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein Bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am. J. Pathol.*, 143, 390-400.

Colombel, M., Radvanyi, F., Blanche, M., Abbou, C., Buttyan, R., Donehower, L.A., Chopin, D. & Thiery, J.P. (1995) Androgen suppressed apoptosis is modified in p53 deficient mice. *Oncogene*, 10, 1269-1274.

Cosulich, S.C., Green, S. & Clarke, P.R. (1996) Bcl-2 regulates activation of apoptotic proteases in a cell-free system. *Curr. Biology*, 6, 997-1005.

Crish, J.F., Howard, J.M., Zaim, T.M., Murthy, S. & Eckert, R.L. (1993) Tissue-specific and differentiation-appropriate expression of the human involucrin gene in transgenic mice: an abnormal epidermal phenotype. *Differentiation*, 53, 191-200.

Dietrich, W.F., Lande, E.S., Smith, J.S., Moser, A.R., Gould, K.A., Luongo, C., Borenstein, N. & Dove, W.F. (1993) Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell*, 75, 631-639.

DiGiovanni, J. (1995) Genetic factors controlling responsiveness to skin tumor promotion in mice. *Growth Factors and Tumor Promotion* (eds.: McClain, R.M., Slaga, T.J., LeBouef, R., Pitot, H.), 195-212. Willey-Liss, New York.

Eliopoulos, A. G., Kerr, D. J., Herod, J., Hodgkins, L., Krajewski, S., Reed, J. C. & Young, L. S. (1995) The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene*, 11, 1217-1228.

Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. & Hancock, D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69, 119-128.

Evan, G.I. & Littlewood, T.D. (1993) The role of c-myc in cell growth. *Curr. Op. Gen. Dev.*, 3, 44-49.

Fanidi, A., Harrington, E. & Evan, G.I. (1992) Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, 359, 554-556.

Farrow, S.N. & Brown, R. (1996) New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Gen. and Dev.*, 6, 45-49.

Fearon, E.R. & Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.

Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132, 6-13.

Feng, Z., Marti, A., Jehn, B., Altermatt, H.J., Chicaiza, G. and Jaggi, R. (1995) Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J. Cell Biol.*, 131, 1095-1103.

Fernandez-Sarabia, M. & Bischoff, J.R. (1993) Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature*, 366, 274f.

Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M.P., Tarcsa, E. & Piacentini, M. (1989) Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Letters*, 245, 150-154.

Fisher, T.C., Milner, A.E., Gregory, C.D., Jackman, A.L., Aherne, G.W., Hartley, J.A., Dive, C. & Hickman, J.A. (1993) bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.*, 53, 3321-3326.

Fürstenberger, G. & Kopp-Schneider, A. (1995) Malignant progression of papillomas induced by the initiation-promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis*, 16, 61-69.

Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.

Gee, J. M. W., Robertson, J. F. R., Ellis, I. O., Willsher, P., McClelland, R. A., Hoyle, H. B., Kyme, S. R., Finlay, P., Blamey, R. W. & Nicholson, R. I. (1994) Immunocytochemical localization of Bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int. J. Cancer*, 59, 619-628.

Gentile, V., Thomazy, V., Piacentini, M., Fesus, L. & Davies, P.J.A. (1992) Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: Effects on cellular morphology and adhesion. *J. Cell Biol.*, 119, 463-474.

Gibson, L., Holmgren, S.P., Huang, D.C.S., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J. & Cory, S. (1996) bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*, 13, 665-675.

Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Nunez, G. (1994) bcl-xL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, 120, 3033-3042.

Gottlieb, M.T. & Oren, M. (1996) p53 in growth control and neoplasia. *Biochem. Biophys. Acta*, 1287, 77-102.

Green, E.L. (Editor) *Biology of the laboratory mouse* (Second Edition, 1966). McGraw-Hill, New York.

Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. and Herrlich, P. (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65, 13-24.

Hadsell, D.L., Greenberg, N.M., Fligger, J.M., Baumrucker, C.R. & Rosen, J.M. (1996) Targeted expression of des(1-3) human insulin-like growth factor I in transgenic mice influences mammary gland development and IGF-binding protein expression. *Endocrinology*, 137, 321-330.

Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M. & Paraskeva, C. (1994) Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene*, 9, 3367-3370.

Haldar, S., Jena, M. & Croce, C.M. (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4507-4511.

Haldar, S., Chintapalli, J. & Croce, C.M. (1996) Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 56, 1253-1255.

Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V., Culhane, A.C. & Williams, G.T. (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, 236, 1-26.

Heermeier, K., Benedict, M., Li, M., Furth, P., Nunez, G. & Hennighausen, L. (1996) Bax and Bcl-xs are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells. *Mechanisms of Development*, 56, 197-207.

Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356, 494-499.

Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994a) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogen *bcl-2*. *Cell*, 76, 665-676.

Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994b) Activation of *c. elegans* cell death protein by an amino-acid substitution in a domain conserved in *Bcl-2*. *Nature*, 369, 318-320.

Hermeking, H. & Eick, D. (1994) Mediation of *c-Myc*-induced apoptosis by *p53*. *Science*, 265, 2091-2093.

Herzer, U. (1996) Einfluß des Protoonkogens *Bcl-2* auf die Regression der Brustdrüse in *WAP-bcl-2* transgenen Mäusen. Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.

Hickman, J.A. (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11, 121-139.

Hockenberry, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J. (1990) *Bcl-2* is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334-336.

Hockenberry, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. & Korsmeyer, S.J. (1991) *Bcl-2* expression is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 6961-6965.

Hockenberry, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993) *Bcl-2* functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75, 241-251.



Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E. (1986). Manipulating the mouse embryo. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Howes, K.A., Ransom, N., Papermaster, D.S., Lasudry, J.G.H., Albert, D.M. & Windle, J.J. (1994) Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes & Dev.*, 8, 1300-1310.

Humphreys, R., Krajewska, M., Krnacik, S., Jäger, R., Weiher, H., Krajewski, S., Reed, J.C. & Rosen, J.M. (1996) Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development*, im Druck.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.-I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66, 233-243.

Jacobson, M.D., Burne, J.F., King, M.P., Miyashita, T., Reed, J.C. & Raff, M.C. (1993) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, 361, 365-368.

Jacobson, M.D., Burne, J.F. & Raff, M.C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.*, 13, 1899-1910.

Jaenisch, R. (1988) Transgenic animals. *Science*, 240, 1468-1474.

Jenne, D.E. & Tschopp, J. (1989) Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: Identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 7123-7127.

Jhappan, C., Geiser, A.G., Kordon, E.C., Bagheri, D., Hennighausen, L., Roberts, A.B., Smith, G.H. & Merlino, G. (1993) Targeting expression of a transforming growth factor  $\beta$ 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J.*, 12, 1835-1845.

Jiang, S., Sato, Y., Kuwao, S. & Kameya, T. (1995) Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J. Pathol.*, 177, 135-138.

Kamada, S., Shimono, A., Shinto, Y., Tsujimura, T., Takahashi, T., Noda, T., Kitumara, Y., Kondoh, H. & Tsujimoto Y. (1995) bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: Accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.*, 55, 354-359.

Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D. & Barr, P.J. (1995) Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, 374, 736-739.

Kim, S.-J., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K.Y., Sporn, M.B., Karin, M. & Roberts, A.B. (1990) Autoinduction of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 1492-1497.

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-170.

Kordon, E.C., McKnight, R.A., Jhappan, C., Hennighausen, L., Merlino, G. & Smith, G.H. (1995) Ectopic TGF $\beta$ 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population. *Dev. Biol.*, 168, 47-61.

Kumar, S. (1994) ICE-like proteases in apoptosis. *TIBS*, 20, 198-202.

Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Benoit, V., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V. & Kahn, A. (1996) Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nature Medicine*, 2, 80-86.

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

LeBrun, D.P., Warnke, R. & Cleary, M.L. (1993) Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am. J. Pathol.*, 142, 743-753.

Leek, R. D., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Gatter, K. C. & Harris, A. L. (1994) bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *British J. Cancer*, 69, 135-139.

Li, B., Kittrell, F.S., Medina, D. & Rosen, J.M. (1996a) Delay of dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in transgenic mice by apoptosis induced by an unusual mutant p53 protein. *Mol. Carcinog.*, 14, 75-83.

Li, M., Hu, J., Heermeier, K., Hennighausen, L. & Furth, P. (1996b) Apoptosis and remodeling of mammary gland tissue during involution proceeds through p53-independent pathways. *Cell Growth Differ.*, 7, 13-20.

Li, M., Hu, J., Heermeier, K., Hennighausen, L. & Furth, P.A. (1996c) Expression of a viral oncoprotein during mammary gland development alters cell fate and function: Induction of p53-independent apoptosis is followed by impaired milk protein production in surviving cells. *Cell Growth Differ.*, 7, 3-11.

Lin, E.Y., Orlofsky, A., Wang, H.-G., Reed, J.C. & Prystowsky, M.B. (1996) A1, a bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*, 87, 983-992.

Liu, Y., Hernandez, A.M., Shibata, D. & Cortopassi, G.A. (1994) BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 8910-8914.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157.

Lu, Q.-L., Poulson, R., Wong, L. & Hanby, A.M. (1993) Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J. Pathol.*, 169, 431-437.

Lu, P.J., Lu, Q.L., Rughetti, A. & Taylor-Papadimitriou (1995) bcl-2 overexpression inhibits cell death and promotes the morphogenesis, but not tumorigenesis of human mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 129, 1363-1378.

Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K. & Werb, Z. (1996) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development*, 122, 181-193.

Marin, M.C., Hsu, B., Stephens, L.C., Brisbay, S. & McDonnell, T.J. (1995) The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Exp. Cell Res.*, 217, 240-247.

Marti, A., Jehn, B., Costello, E., Keon, N., Ke, G., Martin, F. & Jaggi, R. (1994) Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene*, 9, 1213-1223.

Martikianen, P., Kyprianou, N. & Isaacs, J. (1990) Effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology*, 127, 2963-2968.

Martinou, J.C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J.K., Rodriguez, I., Frankowsky, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C. & Huarte, J. (1994) Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 13, 1017-1030.

McCall, C.A. & Cohen, J.J. (1991) Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J. Invest. Dermatol.*, 97, 111-114.

McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. & Korsmeyer, S.J. (1989) bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular hyperproliferation. *Cell*, 57, 79-88.

McDonnell, T.J. & Korsmeyer, S.J. (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature*, 349, 254-256.

McDonnell, T. J., Troncoso, P., Brisbay, S.M., Logothetis, C., Chung, L. W. K., Hsieh, J., Tu, S. & Campbell, M. L. (1992) Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.*, 52, 6940-6944.

Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piredda, Candi, E., Gentile, V., Davies, P.J.A. & Piacentini, M. (1994) Tissue transglutaminase and apoptosis: Sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol. cell. Biol.*, 14, 6584-6596.

Merritt, A.J., Potten, C.S., Watson, A.J.M., Loh, D.Y., Nakayama, K.-i., Nakayama, K. & Hickman, J.A. (1995) Differential expression of bcl-2 in intestinal neoplasia. *J. Cell Sci.*, 108, 2261-2271.

Merry, D.E., Veis, D.J., Hickey, W.F. & Korsmeyer, S.J. (1994) bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development*, 120, 301-311.

Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A.S., Dyer, M.J.S., Mason, D.Y. & Greaves, M.F. (1992) Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 1819-1825.

Moralesducret, C. R. J., Vanderijn, M., Lebrun, D. P. & Smoller, B. R. (1995) bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Archives Dermatol.*, 131, 909-912.

Morin, P.J., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1996) Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 7950-7954.

Moser, A.R., Pitot, H. & Dove, W.F. (1990) A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*, 247, 322-324.

Montgomery, A.M.P., Reisfeld, R.A. & Cheresch, D.A. (1994) Integrin  $\alpha_v\beta_3$  rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 8856-8860.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.-L., Ng, S.C. & Fesik, S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381, 335-341.

Muller, W.J., Sinn, E., Wallace, R., Pattengale, P.K. & Leder, P. (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*, 54, 105-115.

Naik, P., Karrim, J. & Hanahan, D. (1996) The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes & Dev.*, 10, 2105-2116.

Nakagawa, K., Yamamura, K., Maeda, S. & Ichihashi, M. (1994) Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer*, 74, 1720-1724.

Nakayama, K., Nakayama, K.-Y., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H. & Loh, D.Y. (1994) Targeted disruption of Bcl-2 $\alpha\beta$  in mice: Occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3700-3704.

Nathan, B., Anbazhagan, R., Clarkson, P., Bartkova, J. & Gusterson, B. (1994) Expression of Bcl-2 in the developing human fetal and infant breast. *Histopathology*, 24, 73-76.

Negrini, M., Silini, E., Kozak, C., Tsujimoto, Y. & Croce, C.M. (1987) Molecular analysis of mbcl-2: Structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*, 49, 455-463.

Newmeyer, D.D., Farschon, D.M. & Reed, J.C. (1994) Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, 79, 353-364.

Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J. & Shore, G.C. (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.*, 268, 25265-25268.

Nunez, G., Seto, M., Seremetis, S., Ferrero, D., Grignani, F., Korsmeyer, S.J. & Dalla-Favera, R. (1989) Growth- and tumor-promoting effects of deregulated BCL2 in human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 4589-4593.

Öfner, D., Riehemann, K., Maier, H., Riedmann, B., Nehoda, H., Tötsch, M., Böcker, W., Jasani, B. & Schmid, K. W. (1995) Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *British J. Cancer*, 72, 981-985.

Oh, Y.J., Swarzenski, B.C. & O'Malley, K.L. (1996) Overexpression of Bcl-2 in a murine dopaminergic neuronal cell line leads to neurite outgrowth. *Neurosci. Letters*, 202, 161-164.

Ory, K., Legros, Y., Auguin, C. & Soussi, T. (1994) Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO*, 13, 3496-3504.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74, 609-619.

Pezzella, F., Tse, A.G.D., Cordell, J.L., Pulford, K.A.F., Gatter, K.C. & Mason, D.Y. (1990) Expression of the bcl-2 oncogene product is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am. J. Pathol.*, 137, 225-232.

Pierce Jr., D.F., Johnson, M.D., Matsui, Y., Robinson, S.D., Gold, L.I., Purchio, A.F., Daniel, C.W., Hogan, B.L.M. & Moses, H.L. (1993) Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF- $\beta$ 1. *Genes & Dev.*, 7, 2308-2317.

Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J.A., Dive, C. & Streuli, C.H. (1996) Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J. Cell Science*, 109, 631-642.

Quarrie, L.H., Addey, C.V.P. & Wilde, C.J. (1995) Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling. *Cell Tissue Res.*, 281, 413-419.

Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356, 397-399.

Raffo, A.J., Perlman, H., Chen, M.-W., Day, M.L., Streitman, J.S. & Buttyan, R. (1995) Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res.*, 55, 4438-4445.

Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. & Pickup, D.J. (1992) Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell*, 69, 597-604.

Robinson, G.W., McKnight, R.A., Smith, G.H. & Hennighausen, L. (1995) Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development*, 121, 2079-2090.

Rodel, J.E. & Link, D.C. (1996) Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood*, 87, 858-864.

Rodriguezvillanueva, J., Colome, M. I., Brisbay, S. and McDonnell, T. J. (1995) The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. *Pathol. Res. and Practice*, 191, 391-398.



Rowan, S., Ludwig, R.L., Haupt, Y., Bates, S., Lu, X., Oren, M. & Vousden, K.H. (1996) Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J.*, 15, 827-838.

Rechsteiner, M. (1987) Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Ann. Ev. Cell Biol.*, 3, 1-30.

Reed J.C., Cuddy, M., Slabiak, T., Croce, C.M. & Nowell, P.C. (1988) Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature*, 336, 259-261.

Rudolph, B., Saffrich, R., Zwicker, J., Henglein, B., Müller, R., Ansorge, W. & Eilers, M. (1996) Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO J.*, 15, 3065-3076.

Sandgren, E.P., Schroeder, J.A., Qui, T.H., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. & Lee, D.C. (1995) Inhibition of mammary gland involution is associated with transforming growth factor  $\alpha$  but not c-myc-induced tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res.*, 55, 3915-3927.

Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.-G. & Reed, J.C. (1994) Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-Hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 9238-9242.

Schoenenberger, C.-A., Andres, A.-C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M. & Gerlinger, P. (1988) Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO*, 7, 169-175.

Schorpp, M., Jäger, R., Schellander, K., Schenkel, J., Wagner, E.F., Weiher, H. & Angel, P. (1996) The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res.*, 24, 1787-1788.

Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Dröge, W. & Krammer, P.H. (1994) Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.*, 127, 15-20.

Schwartz, L.M. & Osborne, B.A. (1993) Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today*, 14, 582-590.

Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1996) Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene*, 13, 21-29.

Sierra, A., Lloveras, B., Castellsague, X., Moreno, L., Garcia-Ramirez, M. & Fabra, A. (1995) Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, 60, 54-60.

Sinicrope, F. A., Ruan, S. B., Cleary, K. R., Stephens, L. C., Lee, J. J. & Levin, B. (1995) bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 55, 237-241.

Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R. & Leder, P. (1987) Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell*, 49, 465-475.

Stephens, L.C., Ang, K.K., Schultheiss, T.E., Milas, L. & Meyn, R.E. (1991) Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat. Res.*, 127, 308-316.

Stewart, T.A., Pattengale, P.K. & Leder, P. (1984) Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell*, 38, 627-637.

Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A. & Friis, R.R. (1992) Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development*, 115, 49-58.

Su, L.-K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A. & Dove, W.F. (1992) Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*, 256, 668-670.

Takahashi, A. & Earnshaw, W.C. (1996) ICE-related proteases in apoptosis. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 6, 50-55.

Talhok, R.S., Bissell, M.J. & Werb, Z. (1992) Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J. Cell Biol.*, 118, 1271-1282.

Tanaka, S., Saito, K. & Reed, J.C. (1993) Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. *J. Biol. Chem.*, 268, 10920-10926.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.

Tsujimoto, Y. & Croce, C.M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 5214-5218.

Tung, P.S. & Fritz, I.B. (1985) Immunolocalization of clusterin in: the ram testis, the rat testis and excurrent ducts. *Biol. Reprod.*, 33, 177-186.

Tzeng, Y.J., Guhl, E., Graessmann, M. & Graessmann, A. (1993) Breast cancer formation in transgenic animals induced by the whey acidic protein SV40 T antigen (WAP-SV-T) hybrid gene. *Oncogene*, 8, 1965-1971.

Ucker, D.S. (1991) Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *The New Biologist*, 3, 103-109.

Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440-442.

Vaux, D.L., Weissman, I.L. & Kim, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 258, 1955-1957.

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R. & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75, 229-240.

Veis Novack, D. & Korsmeyer, S.J. (1994) Bcl-2 oncoprotein expression during murine development. *Am. J. Pathol.*, 145, 61-73.

Verhaegh, M. E. J. M., Sanders, C. J. G., Arends, J. W. & Neumann, H. A. M. (1995) Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *British J. Dermatol.*, 132, 740-744.

Verma, A.K. & Boutwell, R.K. (1980) Effects of dose and duration of treatment with the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1, 271-276.

Walker, N.I., Bennett, R.E. & Kerr, J.F.R. (1989) Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am. J. Anat.*, 185, 19-32.

Wang, H.-G., Miyashita, T., Takayama, S., Sato, T., Torigoe, T., Krajewski, S., Tanaka, S., Hovey, L., III, Troppmair, J., Rapp, U.R. & Reed, J.C. (1994) Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene*, 9, 2751-2756.

Wang, H.-G., Millan, J.A., Cox, A.D., Der, C.J., Rapp, U.R., Beck, T., Zha, H. & Reed, J.C. (1995) R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a Bcl-2 suppressible mechanism. *J. Cell Biol.*, 129, 1103-1114.

Wang, H.-G., Takayama, S., Rapp, U.R. & Reed, J.C. (1996) Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 7063-7068.

Wang, T. T. Y. & Phang, J. M. (1995) Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 55, 2487-2489.

Weiss, L. (1990) Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.*, 54, 159-211.

Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A. & Vuust, J. (1985) The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO*, 4, 755-759.

- Wong, P., Pineault, J., Lakins, J., Taillefer, D., Leger, J., Wang, C. & Tenniswood, M. (1993) Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 268, 5021-5031.
- Wong, P., Taillefer, D., Lakins, J., Pineault, J., Chader, G. & Tenniswood, M. (1994) Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.*, 221, 917-925.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995a) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 80, 285-291.
- Yang, T., Kozopas, K.M. & Craig, R.W. (1995b) The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.*, 128, 1173-1184.
- Yin, X.-M., Oltvai, Z.N. & Korsmeyer, S.J. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369, 321-323.
- Yin, D.X. & Schimke, R.T. (1996) Bcl-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in HeLa cells. *Cancer Res.*, 55, 4922-4928.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1993) The *c. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell*, 75, 641-652.
- Yunis, J.J., Oken, M.M., Kaplan, M.E., Ensrud, K.M., Howe, R.R. and Theologides, A. (1982) Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 307, 1231-1236.
- Zamzami, B.N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, 183, 1533-1544.

---

Zhong, L.T., Sarafian, T. Kane, D.J., Charles, A.C., Mah, S.P., Edwards, R.H. & Bredesen, D.E. (1993) *bcl-2* inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 4533-4537.

Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L.Z., Leber, B. & Andrews, D.W. (1996) *Bcl-2* mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.*, 15, 4130-4141.