

EXPRESSION VON ZELLULÄREN ONKOGENEN  
IN T-LYMPHOZYTEN DER MAUS UND  
REGULATION DER C-FOS UND C-MYC GENEXPRESSION

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Jürgen Schneider-Schaulies

aus  
Würzburg

Würzburg 1986

Eingereicht am : 1.7.86

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter : Prof. Dr. E. Wecker
2. Gutachter : Prof. Dr. F. Grummt

der Dissertation

1. Prüfer : Prof. Dr. E. Wecker
2. Prüfer : Prof. Dr. F. Grummt

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung : 12.12.86

Doktorurkunde ausgehändigt am :

Erklärung :

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation  
"Expression von zellulären Onkogenen in T-Lymphozyten der Maus  
und Regulation der c-fos und c-myc Genexpression" selbständig  
angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen  
Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher  
oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren  
vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich  
vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben  
oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

( Jürgen Schneider-Schaulies )

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. E. Wecker von September 1982 bis Juni 1986 angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. E. Wecker für die vorbildliche Anleitung und Betreuung dieser Arbeit und Frau Prof. A. Schimpl für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Instituts, besonders meinen Mitstreitern im Labor R. Knauer, R. Swoboda, I. Berberich und R. Schmitt, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die sehr gute Zusammenarbeit.

für's N

## Zusammenfassung

Mitogen stimulierte T-Lymphozyten aus Mausmilzen exprimieren die mRNA von drei zellulären Onkogenen in folgender Reihenfolge : c-fos, c-myc, c-Ha-ras. Das Maximum an c-fos spezifischer mRNA wird in gleicher Stärke und jeweils nach 1 Stunde Inkubation von nicht-proliferierenden, nur in serumhaltigem Medium gehaltenen Zellen oder von Concanavalin A (ConA) zur Proliferation stimulierten Zellen erreicht. Anschließend verschwindet die c-fos mRNA rasch. Eine c-myc Genexpression erfolgt nur in mitogen-aktivierten T-Lymphozyten aber unabhängig von ihrer Proliferationsfähigkeit. Die Kinetik und Stärke der Expression ist bei unterschiedlichen Mitogenen oder bei gleichem Mitogen aber unterschiedlichen Subpopulationen von T-Zellen verschieden. Auch die c-myc spezifische mRNA unterliegt nach Erreichen eines Optimalwertes einer Abwärtsregulation. Das c-Ha-ras Gen wird verstärkt nur in mitogen aktivierten und vor allem in proliferierenden Zellen mit Maximalwerten nach 24 - 48 Std. Inkubation exprimiert. Das Niveau der c-Ha-ras mRNA bleibt danach fast konstant.

Die natürliche Halbwertszeit der c-fos mRNA beträgt 1 Std. nach Stimulation ca. 25 Min., nach 2 Std. ca. 70 Min. Die natürliche Halbwertszeit der c-myc mRNA beträgt 2 und 6 Std. nach Stimulation mit ConA 50 Min. und fällt nach 48 Std. auf ca. 10 Min. ab.

Cycloheximid (CHI) verlängert die Halbwertszeiten der c-fos und c-myc mRNA, gleichgültig in welcher Aktivierungsphase die T-Zellen sich befinden, auf etwa 8 Std. und führt dadurch zu einer um Stunden ver-

längerten Erhaltung erhöhter mRNA Niveaus in den Lymphozyten. Dies zeigt, daß die Expression des c-fos und c-myc Gens einer starken negativen Post-Transkriptionskontrolle auf der Ebene reifer mRNA unterliegt. CHI hat dagegen nur einen geringen Effekt auf die c-Ha-ras Genexpression.

Die Transkriptionsrate des c-fos Gens und die Konzentration von c-fos Vorläufer mRNA (preRNA) sind in nicht-aktivierten T-Lymphozyten bereits genauso hoch wie 1 Std.nach Stimulation. Innerhalb einer weiteren Std.wird die Trankription des Gens dann eingestellt. Die Transkriptionsrate des c-myc Gens und die Konzentration von c-myc preRNA werden 6 Std.nach ConA-Stimulation auf das Fünffache erhöht. Ab 12 Std.nach Stimulation geht die Transkriptionsrate dann auf ein niedriges Niveau zurück.

Die beobachtete schnelle Regulation der c-fos und c-myc Genexpression beruht also auf einem Zusammenspiel von Transkriptions- und Post-Transkriptionsmechanismen, deren jeweilige Dominanz bei den beiden zellulären Onkogenen unterschiedlich ist. Die Transkriptionsraten und die mRNA-Degradation werden bei den beiden Genen unabhängig voneinander reguliert.

## Inhaltsverzeichnis :

	Seite :
1. Einleitung	1
1.1. Aktivierung von Lymphozyten	1
1.2. Signalübertragung in die Zelle	2
1.3. Onkogene und Transformation	4
1.4. Expression zellulärer Onkogene	8
1.5. Regulation der c-fos und c-myc Expression	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Chemikalien	13
2.1.2. Radioaktivität	14
2.1.3. Material für die Zellzucht	14
2.1.4. Material für die Bakterienzucht	15
2.1.5. Enzyme	15
2.1.6. Plasmide	16
2.1.7. M13-Klone	17
2.1.8. Expressionsvektoren	18
2.2. Methoden	19
2.2.1. Isolierung von Lymphozyten aus Mausmilzen	19
2.2.2. Reinigung der T-Zellen aus Milzzellen	19
2.2.3. Isolierung von Lyt2 <sup>+</sup> -T-Zellen	20
2.2.4. Neuraminidase-Behandlung	21
2.2.5. Mitogene Stimulation der Lymphozyten	21
2.2.6. Cycloheximid-Behandlung	22
2.2.7. Actinomycin D-Behandlung	22
2.2.8. <sup>3</sup> H-Thymidin-Einbau	22
2.2.9. RNA-Präparation aus Zellen	23
2.2.10. DNA-Präparation aus Zellen	25
2.2.11. Plasmidpräparation	26
2.2.12. Reinigung der Plasmid-DNA über CsCl-Gradient	27
2.2.13. Klonierung von Plasmiden und M13-Phagen	28
2.2.14. Herstellung kompetenter Bakterien	30
2.2.15. Transformation von Bakterien mit Plasmiden	31

2.2.16.	Minipräparation von Plasmid-DNA	32
2.2.17.	Transformation von Bakterien mit M13-DNA	33
2.2.18.	Präparation von Einzel- und Doppelstrang M13-DNA	34
2.2.19.	Agarosegele für DNA	35
2.2.20.	Southern-Transfer von DNA	36
2.2.21.	Agarosegele für RNA	37
2.2.22.	Northern-Transfer von RNA	38
2.2.23.	Elektro-Transfer von Nukleinsäuren	38
2.2.24.	In vitro Markierung von dsDNA (Nick-Translation)	39
2.2.25.	Hybridisierung der Southern- und Northern-Blots	41
2.2.26.	Färben der RNA auf Nitrozellulose-Folien	42
2.2.27.	Nuklease S1-Kartierung (S1 mapping)	43
2.2.28.	Bestimmung der Transkriptionsrate (nuclear run-on assay)	46
2.2.29.	Transfektion von DNA mit Calciumphosphat	49
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Expression von c-Onkogenen in Milzzellen der Maus	51
3.1.1.	Expression in ConA-stimulierten Milzzellen	51
3.1.2.	Expression in Tumorzellen	55
3.1.3.	Expression in gereinigten und stimulierten T-Zellen aus Mausmilzen	61
3.1.4.	Expression in stimulierten Lyt2 <sup>+</sup> -T-Zellen	66
3.2.	Regulation der Genexpression	70
3.2.1.	Wirkung von Cycloheximid auf die mRNA-Konzentration	70
3.2.2.	Halbwertszeit von c-fos und c-myc mRNA in Lymphozyten	78
3.2.3.	Halbwertszeit von c-myc mRNA in Tumorzellen	87
3.2.4.	Analyse des preRNA-zu mRNA-Verhältnisses von c-fos und c-myc in Lymphozyten	90
3.2.5.	Transkriptionsrate von c-fos und c-myc	95
3.2.6.	Regulation durch komplementäre RNA	99

4.	Diskussion	102
4.1.	Expression von c-Onkogenen in Lymphozyten	102
4.2.	Regulation über Transkriptionsrate und mRNA-Degradation	104
4.3.	Mögliche Mechanismen post-transkriptioneller Regulation	108
4.4.	Funktion der c-fos und c-myc Onkogene	111
5.	Literaturverzeichnis	114
Anhang A : Verzeichnis der Abkürzungen		125
Anhang B : Lebenslauf		128
Anhang C : Eigene Veröffentlichungen		129

## 1. Einleitung

### 1.1. Aktivierung von Lymphozyten

Lymphozyten bieten die Möglichkeit, Regulationsphänomene der Genexpression in normalen, nicht transformierten Zellen zu studieren. Sie sind gezielt mit einer Reihe verschiedener Substanzen so stimulierbar, daß von den ersten Aktivierungsschritten, über die Induktion von Rezeptoren, Proliferation für einen oder mehrere Zellzyklen, bis hin zur Differenzierung zu immunologischen Effektorzellen, Schritt für Schritt die Stadien untersucht werden können.

Die Milzen des Menschen oder der Maus enthalten etwa 55% T-Lymphozyten, 40% B-Lymphozyten und 5% Makrophagen. Lektine wie Concanavalin A (ConA), Phytohämagglutinin (PHA) oder Leukoagglutinin (LA) sind in der Lage, T-Zellen aus Milzen polyklonal zu aktivieren, d.h. viele verschiedene T-Zell-Klone - gleichgültig welcher Antigen-spezifität - zu stimulieren. Bei den T-Helferzellen ( $T_H$ ), durch Oberflächenmarker größtenteils als  $CD4^+$ -Zellen definiert, führt die Stimulation mit ConA zur Expression des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R) <sup>(1)(2)</sup> und zur Produktion des T-Zell Wachstumsfaktors IL-2 <sup>(3)(4)</sup>. Die zytotoxischen T-Zellen (CTL), größtenteils  $CD8^+$ -Zellen, werden nach ConA-oder LA <sup>(5)</sup>-Stimulation IL-2 reaktiv, d.h. der IL-2-Rezeptor wird induziert, proliferieren aber nur in Gegenwart des von den T-Helferzellen produzierten Wachstumsfaktors IL-2.

In der Natur erfolgt die Aktivierung der T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor<sup>(6)(7)</sup>, der ein körperfremdes Antigen zusammen mit den Oberflächen-Glykoproteinen des Haupt-histokompatibilitätskomplexes (MHC) erkennt.

B-Zellen aus Mausmilzen können mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) zur Proliferation und Differenzierung stimuliert werden und sezernieren nach fünf Tagen in der Kulturflasche Antikörper. Werden B-Zellen mit einem Antikörperfragment gegen ihr membranständiges IgM (anti- $\mu$ F(ab)<sub>2</sub>) behandelt, durchlaufen sie nur einen Zellzyklus. Durch Zugabe bestimmter Lymphokine können sie zur Differenzierung und weiterer Proliferation angeregt werden<sup>(8-14)</sup>.

Die Lymphozyten aus Mausmilzen sind daher ein hervorragend geeignetes System, in der Zellkultur die Genexpression verschiedener Gene in normalen Zellen zu untersuchen.

## 1.2. Signalübertragung in die Zelle

Das äußere Signal bei Stimulation zum Wachstum, gegeben durch Bindung eines Mitogens, Hormons oder Wachstumsfaktors an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran, wird in das Innere der Zellen übertragen. Dabei können (mindestens) zwei Wege eingeschlagen werden: einmal ein Abbau von Phospholipiden durch die Phospholipase C, zum anderen eine

Erhöhung des cyclischen Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)-Spiegels über das G-Protein und die Adenylat-Zyklase.

Im ersten Falle führt die Spaltung von Phosphatidyl-Inosit-4,5,-diphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu 1,4,5,-Inosittriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerin (DG), was einen Anstieg der  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{H}^+$ -Ionenkonzentration und eine Aktivierung der Proteinkinase C zur Folge hat (15 - 17). Die Erhöhung des cAMP-Spiegels führt zur Aktivierung der Proteinkinase A und über diese zu einer zellspezifischen Enzymkaskade.

Wachstumsfaktoren wie IL-2<sup>(18)</sup> und IL-3<sup>(19)</sup> und Serum sind in der Lage, die Proteinkinase C zu aktivieren, worauf es zu einer Bindung der Proteinkinase C an die Plasmamembran und die Kernmembran kommt<sup>(20-22)</sup>. Der Anstieg der Proteinkinase C-Aktivität erfolgt fast unmittelbar nach Stimulation; bei NIH-3T3-Zellen z.B. schon 15 Sekunden nach Serumzugabe<sup>(23)</sup>.

Der natürliche Weg der Proteinkinase C-Aktivierung über die Spaltung von  $\text{PIP}_2$  läßt sich umgehen durch Behandlung der Zellen mit Phorbolester wie 1-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und Calciumionophore<sup>(24)(25)</sup>. TPA interkaliert dabei in die Lipide der Zellmembran und aktiviert mit seinem DG-ähnlichen Teil die Proteinkinase C (Abb.1). Calciumionophore öffnen Calcium-Kanäle in der Zellmembran und erhöhen in unphysiologischem Maße die  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration im Inneren der Zelle.

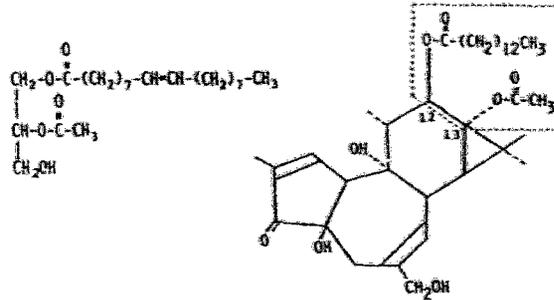


Abb.1: Struktur von DG (1-Oleoyl-2-acetyl-glycerin) links und TPA (1-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) rechts. TPA enthält eine DG-ähnliche Struktur, die durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet ist.

Nach dem Anstieg der Proteinkinase-Aktivität folgt als nächste zelluläre Antwort schon nach 10 Minuten die Expression vieler verschiedener Boten-Ribonukleinsäure-Moleküle (mRNA). Nach Stimulation ruhender 3T3-Zellen mit Serum wird die Expression der mRNA von mindestens 50 verschiedenen Genen stimuliert (26) (27). Darunter sind auch mRNA-Moleküle der sogenannten zellulären Onkogene.

### 1.3. Onkogene und Transformation

Seit Ende der sechziger Jahre wurden in DNA-Tumorviren und Retroviren etwa 20 verschiedene, transformierend wirkende Gene, die viralen oder v-Onkogene (28) gefunden. Zu allen retroviralen Onkogenen, bis auf das tat-Gen der humanen T-Zell-lymphotropen Viren (HTLV I, II, III) (29) (30), wurden inzwischen zelluläre Analoga, die Proto-Onkogene bzw. zellulären oder c-Onkogene, entdeckt.

Darüber hinaus konnten auch einige nicht in Viren vorkommende, transformierend wirkende Gene isoliert werden<sup>(31-35)</sup>. Da die Onkogene in der Evolution in einem hohen Maße konserviert blieben, wird den Onkogenprodukten eine kritische Funktion für die Zelle zugeschrieben<sup>(36)(37)</sup>. Es konnten nämlich selbst in Hefe homologe Sequenzen zur humanen ras-Onkogenfamilie<sup>(38-40)</sup> oder in Drosophila homologe Sequenzen zur src-Onkogenfamilie<sup>(41)</sup> nachgewiesen werden.

Die Onkogenprodukte scheinen ihre Funktion auf verschiedenen Ebenen der Regulation zellulärer Proliferation und Differenzierung auszuüben (Abb.2).

Das sis-Onkogen kodiert für einen Wachstumsfaktor und hat Homologie zur B-Kette des PDGF (platelet derived growth factor)<sup>(42)(43)</sup>.

Das zelluläre neu-Onkogen, das für einen Rezeptor ähnlich dem EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) kodiert, wird durch eine Punktmutation, die den Austausch einer Aminosäure (Valin zu Glutamin) zur Folge hat, zu einem transformierenden Gen<sup>(44)</sup> (R.Weinberg<sup>(17)</sup>).

Das erb-B-Onkogen kodiert dagegen für einen verstümmelten Rezeptor, der seine nach außen gerichtete Domäne, den hormonbindenden Teil, verloren hat<sup>(45)(46)</sup>.

Die meisten membrangebundenen Onkogenprodukte, darunter neu, erb-B, ros und die src-Familie (abl, yes, fes, fms)<sup>(47)(48)</sup> sind Tyrosin-Kinasen. Das zelluläre src-Genprodukt phosphoryliert bevorzugt das zytoplasmatische Ende des EGF-Rezeptors,

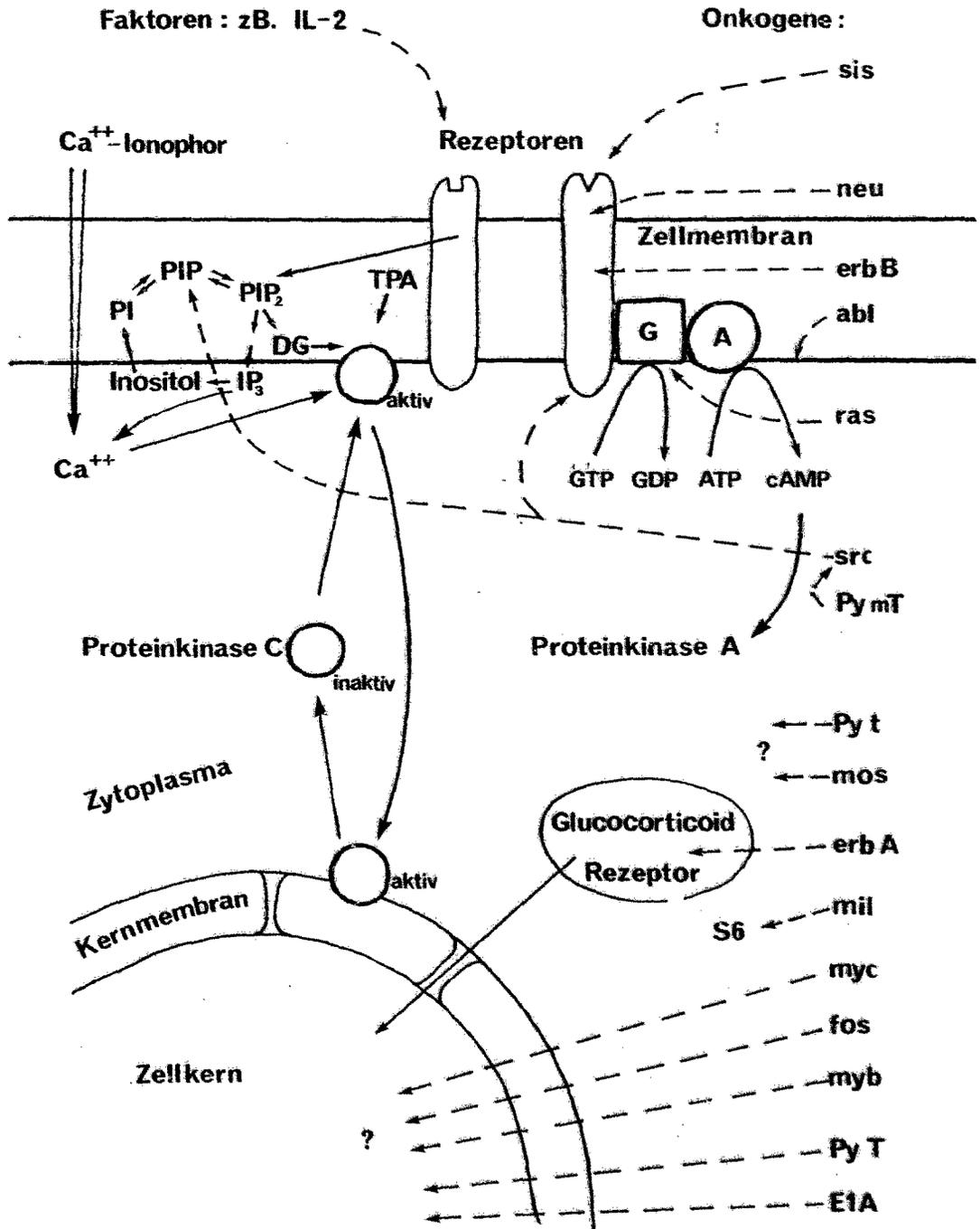


Abb.2: Schema der Übertragung eines externen Signals in die Zelle mit den beteiligten Onkogenen (Erklärung siehe Text)

während das virale src-Genprodukt bevorzugt PIP in der Membran phosphoryliert. Diese Aktivität erhält das c-src-Genprodukt aber auch in Assoziation mit dem Polyomavirus-mittel-T-Antigen (Py mT)<sup>(49)(50)</sup>.

Zu den membrangebundenen Onkogenen gehört auch die Familie der ras-Onkogene (Ha-ras, Ki-ras, N-ras), deren Genprodukte GTP-Bindungsaktivität besitzen<sup>(51)</sup>. Zelluläre ras-Onkogene können durch Punktmutation im 12. oder 61. Kodon zu transformierenden Genen, sogenannten aktivierten Onkogenen, werden<sup>(52)</sup>. Bei der Aktivierung des c-Ha-ras-Gens in einem humanen Blasenkarzinom wurde durch Punktmutation im 12. Kodon die Aminosäure Valin durch Glycin ersetzt<sup>(53)(54)</sup>, die GTPase-Aktivität dadurch stark vermindert<sup>(55)</sup> und das normale zelluläre Gen zu einem transformierenden Gen.

Zu den zytoplasmatischen Onkogenen gehört erb-A, dessen Genprodukt Homologie zum humanen Östrogenrezeptor besitzt<sup>(56)</sup> und die Serin/Threonin-Kinasen wie mos<sup>(57-59)</sup> und ml/raf<sup>(28)</sup>.

Die Gruppe der möglicherweise interessantesten Onkogene jedoch übt ihre Funktion im Zellkern aus. Sie binden an Desoxyribonukleinsäure (DNA), wie z.B. die fos-, myc- und myb-Genprodukte<sup>(60)</sup> und p53<sup>(61)(62)</sup> oder sind trans-aktivierende Faktoren, wie E1A des Adenovirus<sup>(63)(64)</sup>.

Das zelluläre myc-Onkogen kann alleine durch übermäßige Expression, ohne strukturelle Änderungen, zu einem transformierenden Gen werden<sup>(65)</sup>.

Mechanismen, die zu einer defekten Regulation der Genexpression führen, sind Amplifikation des c-myc-Gens auf hohe Kopienzahl<sup>(66-68)</sup>, Translokation in ein Immunglobulin-Gen<sup>(65)(69)</sup>, DNA-Rearrangement<sup>(70)(71)</sup> oder Promotor-Insertion durch Viren<sup>(72)(73)</sup>.

Die Transformation einer normalen Zelle zu einer potentiell unsterblichen und ungehemmt wachsenden Krebszelle folgt einem Viel-Schritt-Mechanismus<sup>(74)</sup>, d.h. erst mehrere Veränderungen in der Zelle, oder die Expression mehrerer Onkogene, führen zu einer vollständigen Entartung der Zelle. Zwei Onkogene mit verschiedenen Eigenschaften, wie z.B. myc und Ha-ras, können kooperieren und primäre Zellkulturen transformieren<sup>(74-76)</sup>.

Die viralen Onkogene unterscheiden sich immer von ihren zellulären Analoga. Sie bilden Fusionsproteine, wie z.B. gag-myc im Myelocytomatosisvirus (MC29)<sup>(79)</sup>, oder haben Mutationen und Deletionen, wie z.B. bei fos im Mäuse-Osteosarkomavirus (FBJ-MuSV), wo die 49 carboxyterminalen Aminosäuren des c-fos-Proteins fehlen<sup>(80)</sup>. Durch diese Veränderungen gewinnen die viralen Onkogene ihre direkt transformierenden Eigenschaften.

#### 1.4. Expression zellulärer Onkogene

Eine Möglichkeit die c-Onkogenexpression bei nicht transformierten, proliferierenden Zellen in vivo zu untersuchen,

ist durch das embryonale bzw. fötale Wachstum gegeben. Sieben bis achtzehn Tage alte Föten der Maus exprimieren c-myc, c-Ha-ras, c-src, c-erb-A und c-sis mit verschiedenen Maxima während der pränatalen Entwicklung<sup>(81)</sup>. C-mos Transkripte unterschiedlicher Länge konnten in Mäuseembryonen, Testes und Ovarien nachgewiesen werden<sup>(82)</sup>.

Die Gene der myc-Familie (c-myc, N-myc, L-myc) werden entwicklungs- und gewebsspezifisch exprimiert. So werden in fötalen und neugeborenen Mäusen alle drei Gene stark exprimiert, in erwachsenen Mäusen aber N-myc nur in Herz, L-myc in der Lunge und c-myc in Thymus, Milz, Dünndarm, Lunge und Herz schwach exprimiert<sup>(83)</sup>.

Beim Menschen konnte c-myc Expression in proliferierenden Zellen der Plazenta nur in den ersten 5 Wochen nach Schwangerschaftsbeginn beobachtet werden<sup>(84)</sup>.

Wie auch die Ergebnisse bei sich regenerierender Leber bei Ratten nach teilweiser Hepatectomie zeigen, scheinen das c-myc und das c-Ha-ras Onkogen mit der Proliferation assoziiert zu sein<sup>(85)(86)</sup>.

Eine Klasse von Onkogenen, deren Genprodukte mehr mit der Differenzierung von Zellen assoziiert sind, wird durch das c-fos Onkogen repräsentiert. Bei der pränatalen Entwicklung der Maus wurde starke c-fos Expression in Amnionzellen, dem Dottersack und in der fötalen Leber entdeckt<sup>(87)(89)</sup>.

Nach der Geburt wird das c-fos Genprodukt nur noch in hämatopoetischen Zellen, besonders in späten Differenzierungsstadien der Monozyten gefunden<sup>(90)</sup>.

Eine andere Möglichkeit, zelluläre Onkogenexpression zu studieren, liegt in der Stimulierbarkeit von Zelllinien oder primären Zellkulturen in vitro durch Mitogene, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren.

So kann die Differenzierung der Monomyelocyten-Zelllinie HL60 mit dem Phorbolster TPA zu Makrophagen und mit Dimethylsulfoxid zu Granulozyten stimuliert werden. Während bei der Differenzierung zu Makrophagen massiv c-fos exprimiert wird, können keine c-fos spezifischen Transkripte bei der Differenzierung zu Granulozyten nachgewiesen werden<sup>(91)(92)</sup>. Bei der Stimulation von arretierten Fibroblasten mit Serum oder gereinigten Faktoren (EGF, FGF, PDGF) wird vorübergehend die Transkriptionsrate von c-fos erhöht und nach ca. 60 Minuten wieder schnell abwärtsreguliert, gefolgt von einer etwa 3 bis 12 Stunden dauernden c-myc Expression<sup>(93)(94)(77)</sup>.

K. Kelly<sup>(95)</sup> fand, daß in Lymphozyten aus Mausmilzen c-myc 2 bis 9 Stunden nach ConA oder LPS Stimulation maximal exprimiert wird und bis 4 Tage nach Stimulation nachweisbar bleibt. Ähnliche Resultate wurden inzwischen für periphere Lymphozyten des Menschen nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA), TPA und Calciumionophoren erhalten<sup>(96)(97)</sup>.

Die c-myc Expression wird somit durch Substanzen stimuliert, die direkte Aktivatoren der Proteinkinase C sind, wie z. B. Phorbol ester, Vasopressin oder PDGF. Die mitogene Wirkung von PDGF jedoch scheint nicht mit der Expression von c-myc korreliert zu sein<sup>(98)</sup>.

#### 1.5. Regulation der c-fos und c-myc Expression

Von K. Kelly<sup>(95)</sup> und Ch. Dani<sup>(99)</sup> wurde berichtet, daß Cycloheximid (CHI), ein Inhibitor der Proteinbiosynthese, die mRNA Konzentration von c-myc in Lymphozyten aus Mausmilzen und verschiedenen Zelllinien (HeLa, MCF7, HL60) drastisch erhöhen kann. Diese "Superinduktion" könnte nach P. Leder<sup>(95)(100)</sup> dadurch zustande kommen, daß ein labiler Repressor nicht mehr synthetisiert wird, oder, da die c-myc mRNA normalerweise eine sehr kurze Halbwertszeit hat<sup>(99)</sup>, daß die mRNA stabilisiert wird.

Tatsächlich verlängert CHI die Halbwertszeit von c-myc mRNA z. B. in einer Plasmazytoma-Zelllinie der Maus von ca. 10 auf 60 Minuten<sup>(101)</sup>.

Den umgekehrten Effekt zeigt  $\beta$ -Interferon (IFN- $\beta$ ) bei Daudi-Zellen. Schon 3 Stunden nach IFN- $\beta$  Behandlung wird die c-myc mRNA Konzentration in den Zellen um 60% reduziert, während die Transkriptionsrate von c-myc gleichbleibt<sup>(102)(103)</sup>.

Unter post-transkriptioneller Kontrolle scheint auch die c-fos Genexpression in Fibroblasten zu stehen. Für eine erfolgreiche Regulation der c-fos mRNA-Konzentration von transfizierten Plasmiden sind Sequenzen am Anfang (5') und am Ende (3') des c-fos Gens notwendig<sup>(104)</sup>. Besonders wichtig ist eine Region von 67 Nukleotiden des nicht-translatierten 3' Endes des Gens. Fehlen diese Basenpaare, so wird das c-fos Gen bei wesentlich verlängerter Halbwertszeit seiner mRNA zu einem transformierenden Gen<sup>(105)(106)</sup>.

Am Anfang meiner Doktorarbeit war noch nicht bekannt, ob zelluläre Onkogene in normalen Lymphozyten exprimiert werden. Inzwischen wurde die c-myc Expression in Lymphozyten beschrieben<sup>(95-97)</sup>. Ich habe darüber hinaus die Expression der beiden zellulären Onkogene c-fos und c-Ha-ras nachweisen können. Mein hauptsächliches Interesse jedoch galt der Fragestellung, ob die Regulation der c-fos und c-myc Genexpression in normalen Lymphozyten der Maus auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene stattfindet.

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	: Roth
Agarose	: Bethesda Research Lab.
Ammoniumpersulfat	: Merck
Bisacrylamid	: Serva
Borsäure	: Roth
Caesiumchlorid	: Roth
Chloroform	: Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	: Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	: Serva
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)- N,N'-tetraessigsäure (EGTA)	: Serva
Ethanol	: Roth
Ethidiumbromid	: Sigma
Filme : Cronex 2	: Dupont
Formaldehyd	: Roth
Formamid	: Merck
Guanidiniumrhodanid	: Fluka
Harnstoff	: Merck
Hybond N-Folie	: Amersham
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	: Sigma
Nitrozellulose-Folie	: Schleicher & Schüll
Nukleotide	: Sigma
Phenol	: Fluka
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	: Serva

Polyethylenglycol (PEG) 6000 : Serva  
Salze : Merck  
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin  
(TEMED) : Serva  
Trishydroxymethylaminomethan (Tris): Roth  
Toluolszintillator : Roth

### 2.1.2. Radioaktivität

$^3\text{H}$ -Thymidin : Amersham  
 $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dNTP : Amersham  
 $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -rUTP : Amersham

### 2.1.3. Material für die Zellzucht

Plastikwaren : Falcon, Nunc, Greiner  
RPMI 1640 - Medium : Gibco  
Fötales Kälberserum (FCS) : Gibco  
Nichtessentielle Aminosäuren 100X : Gibco  
Natriumpyruvat : Gibco  
Penicillin : Apotheke  
Streptomycin : Apotheke  
Concanavalin A (ConA) : Pharmacia  
Leukoagglutinin : Sigma  
Cycloheximid : Sigma  
Actinomycin D : Sigma  
Neuraminidase-Test : Behring-Institute  
Low Tox-M Kaninchen Komplement : Cederlane Laboratories  
Nylonwolle (Leukocyte Filter) : Fenwal Laboratories  
Geneticinsulfat (G418) : Gibco

#### 2.1.4. Material für die Bakterienzucht

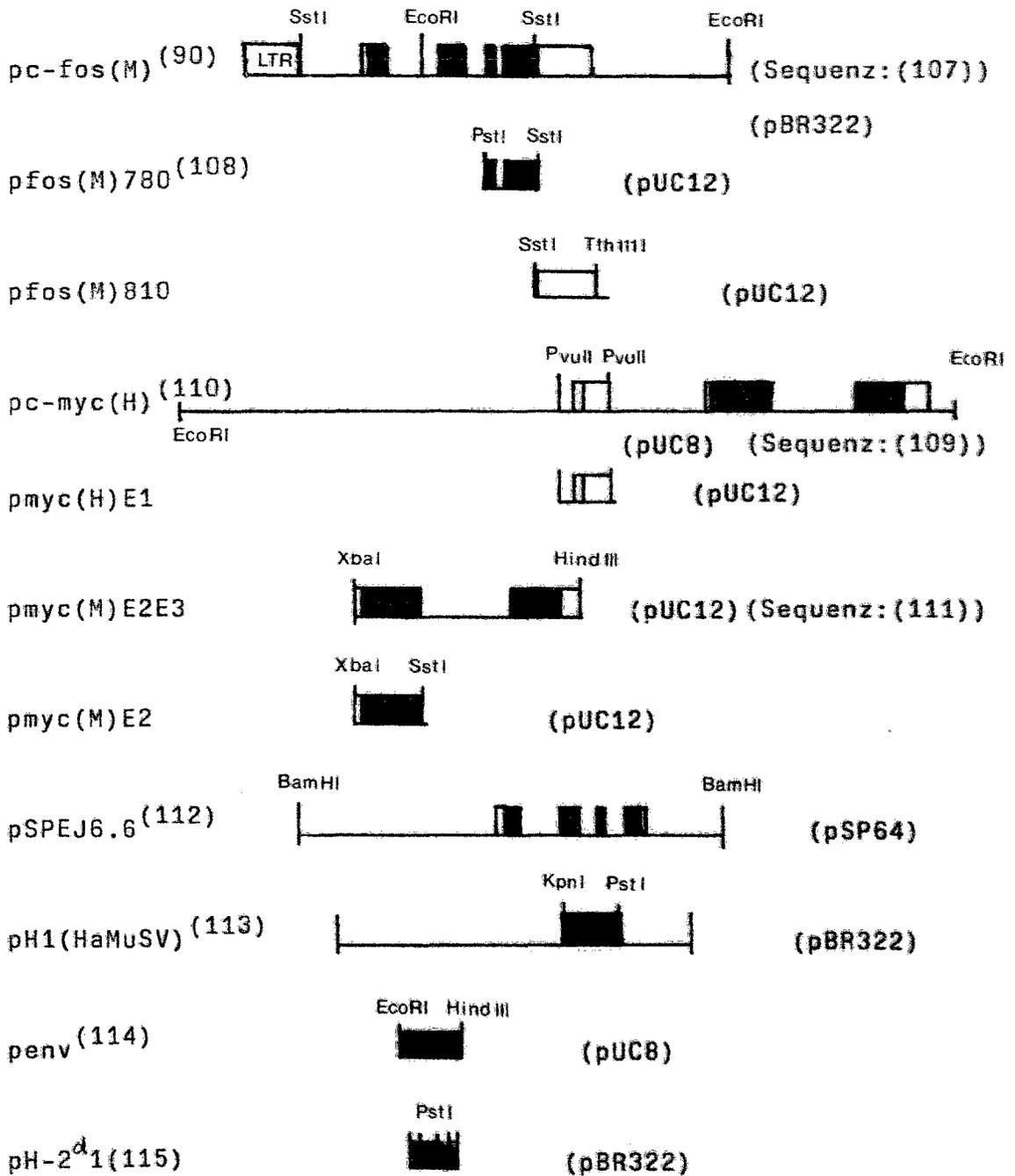
Bakto Tryptone	:	Difco Laboratories
Yeast Extract	:	Difco Laboratories
Chloramphenicol	:	Serva
Ampicillin (Amblosin)	:	Hoechst
Tetracyclin	:	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- B-D-Galactopyranosid (XGal)	:	Sigma
Isopropyl-B-D-Thio- Galactopyranosid (IPTG)	:	Sigma

#### 2.1.5. Enzyme

Restriktionsenzyme	:	Pharmacia, Biolabs
Nuklease S1	:	Pharmacia
DNase I	:	Pharmacia
DNase I (RNase frei)	:	Promega
RNase A	:	Sigma
Proteinase K	:	Sigma
Polymerase I	:	Biolabs
Polymerase I large fragment	:	Pharmacia
Alkalische Phosphatase (CIP)	:	Pharmacia
DNA-Ligase	:	Amersham
Phosphocreatinkinase	:	Boehringer Mannheim

1kb

2.1.6. Plasmide \*



\* dargestellt sind jeweils die spezifischen Inserts,  
 schwarze Fläche : translatierte Sequenzen der Exons  
 helle Fläche : nicht-translatierte Sequenzen der Exons  
 Linie : Intronsequenzen

2.1 7. M13-Klone

c-fos(M):

		Herkunft:
Probe für (+) (mRNA)	M13mp18fos(M) 260	EcoRI/PstI Ex2
(-)	M13mp19fos(M) 260	PstI/EcoRI Ex2
(-)	M13mp18fos(M) 780	SstI/PstI Ex3/4
(+)	M13mp19fos(M) 780	PstI/SstI Ex3/4
(-)	M13mp18fos(M) 3'	EcoRI/SstI 3'Ende
(+)	M13mp19fos(M) 3'	SstI/EcoRI 3'Ende

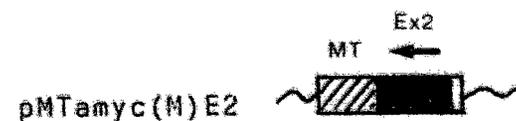
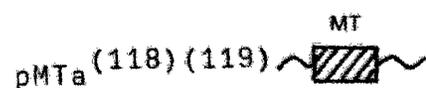
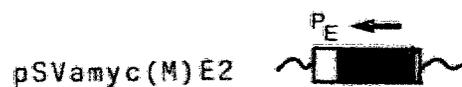
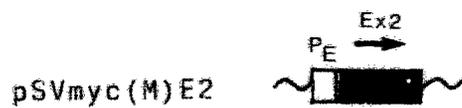
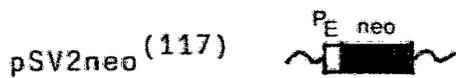
c-myc(M):

(+)	M13mp18myc(M) E25'	XbaI/PstI Ex2
(-)	M13mp19myc(M) E25'	PstI/XbaI Ex2
(+)	M13mp18myc(M) 3'	PvuII/BamHI 3'Ende
(-)	M13mp19myc(M) 3'	BamHI/PvuII 3'Ende

Maus ribosomale DNA, Wildtyp:

(+)	M13mp9MrWt	SalI/SmaI 5'Ende
-----	------------	------------------

### 2.1.8. Expressionsvektoren



P<sub>E</sub> : SV40 frühe Promotor/Enhancer Region (340 bp)

MT : (Maus) Metallothionin-Promotor (MT I , 1,8 kb)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Isolierung von Lymphozyten aus Mausmilzen

Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet, die Milzen herauspräpariert und in eiskaltes BSS (1.0 g Glucose, 60 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 238 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mg Phenolrot, 186 mg  $\text{CaCl}_2$ , 400 mg KCl, 8 g NaCl, 200 mg  $\text{MgCl}_2$ , 200 mg  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,2 pro 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ ) gegeben.

Um eine Zellsuspension zu erhalten, werden die Milzen mit dem Stempel einer sterilen 2 ml Spritze durch ein Stahlsieb gerieben und in 5 ml BSS/Milz aufgenommen. Die groben Bestandteile läßt man 5 Min. absitzen, dann wird die Zellsuspension in ein zweites Röhrchen überführt und die Lymphozyten werden 2x mit BSS gewaschen, d.h. sedimentiert bei 167 g und resuspendiert in BSS.

Erythrozyten werden durch Lyse in einem Ammoniumchloridpuffer entfernt. Die Zellen werden 10 Min. bei Raumtemperatur (R.T.) in TAC (1,5 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,9 % NaCl) inkubiert und anschließend 2x mit BSS gewaschen.

### 2.2.2. Reinigung der T-Zellen aus Milzzellen

Die Lymphozyten werden in 0,5 ml BSS 5% FCS pro Milz suspendiert und auf eine mit BSS 5% FCS äquilibrierte Nylonwollsäule (ca. 2 ml/Milz in einer sterilen Spritze)

bei 37 °C aufgetragen<sup>(120)</sup>. Man läßt die Zellen in das Säulenmaterial einlaufen und inkubiert 20 Min. bei 37 °C. Dann nochmals 0,5 ml BSS 5% FCS pro Milz langsam in das Säulenmaterial einlaufen lassen und 20 Min. bei 37 °C inkubieren. Makrophagen und B-Zellen haften unter diesen Bedingungen an der Nylonwolle und T-Zellen<sup>(121)</sup> können nun mit BSS 5% FCS mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen/Sekunde eluiert werden. Die T-Zellen werden anschließend mit BSS gewaschen.

### 2.2.3. Isolierung von Lyt2<sup>+</sup>-T-Zellen

Aus der gesamt T-Zellpopulation werden die L3T4<sup>+</sup> T-Helferzellen durch Lyse mit spezifischen Antikörpern und Komplement entfernt und es bleiben hauptsächlich Lyt2<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL) übrig.

Über Nylonwolle gereinigte T-Zellen ( $1 \times 10^7$ /ml in BSS) werden 30 Min. auf Eis mit Ratte anti-Maus T4 monoklonalem Antikörper (H1.29.19)<sup>(125)</sup> in einer Verdünnung von 1:100 und anschließend 30 Min. mit Kaninchen anti-Ratte Ig Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 behandelt. Dann werden die L3T4<sup>+</sup>-Zellen mit Kaninchen Komplement 1:15 bei 37 °C 45 Min. lysiert und die Zellen 3x mit BSS gewaschen.

#### 2.2.4. Neuraminidase-Behandlung

N-Acetylneuraminsäure-Reste, die negativ geladen sind und die Agglutination der Zellen stören, werden durch Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* von der Zelloberfläche entfernt<sup>(122)</sup>.

$5 \times 10^7$  T-Zellen/ml werden 1 Std. bei 37 °C mit 0,02 U/ml Neuraminidase (= 1:50) inkubiert und anschließend 2x mit BSS gewaschen.

#### 2.2.5. Mitogene Stimulation der Lymphozyten

Die T-Zellen werden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$ /ml in RPMI 1640-Medium (RPMI 1640, 1x nichtessentielle Aminosäuren, Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin 100 U/ml, β-Mercaptoethanol  $5 \times 10^{-5}$  M) mit 5% FCS ausgesäht und stimuliert mit 2,5 µg/ml ConA<sup>(123)</sup> oder 0,5 µg/ml LA<sup>(5)</sup>.

ConA stimuliert sowohl  $L3T4^+$  T-Helferzellen als auch  $Lyt2^+$  zytotoxische T-Zellen. LA induziert in der benutzten Konzentration nur bei den  $Lyt2^+$  T-Zellen die Expression des IL-2-Rezeptors. Zur Proliferation benötigen diese Zellen noch 30 U/ml externes IL-2<sup>(124)</sup>.

#### 2.2.6. Cycloheximid-Behandlung

Cycloheximid (CHI), ein Inhibitor der Peptidyl-Transferase-Aktivität in Ribosomen, wird dem Medium in einer Konzentration von 10 µg/ml für 1 Std. oder 20 µg/ml für 30 Min. vor dem Ernten der Zellen zugegeben.

#### 2.2.7. Actinomycin D-Behandlung

Actinomycin D (ActD) blockiert in einer Konzentration von 5 µg/ml die Transkription durch Interkalation in doppelsträngige DNA (dsDNA). Nach 5 bis 10 Min. wird keine neue precursor mRNA mehr synthetisiert und vorhandene mRNA-Moleküle verschwinden mit unterschiedlichen Halbwertszeiten.

#### 2.2.8. <sup>3</sup>H-Thymidin Einbau

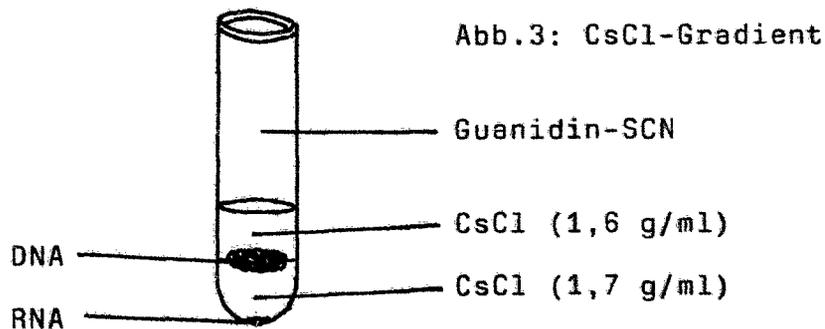
$5 \times 10^4$  Zellen in 200 µl Medium pro Napf einer Mikrotiterplatte werden für 16 Std. mit 5 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin (2 Ci/mmol) markiert. Die Zellen werden mit einem Zellerntegerät (Titertek, Flow Laboratories) über Glasfaserfilter abgesaugt. Die Filter werden 1 Std. bei 80 °C getrocknet und die in DNA eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler mit 3 ml Toluolszintillator gemessen.

Es werden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 2.2.9. RNA-Präparation aus Zellen

Festgewachsene Zellen können entweder trypsinisiert und sedimentiert werden oder die Zellschicht in der Kulturf flasche kann direkt mit 6 ml Guanidiniumrhodanid-Puffer (4 M Guanidin-SCN, 0,5% Na-N-Lauroylsarcosin, 25 mM Na-Citrat, 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,0) pro  $0,5-5 \times 10^8$  Zellen aufgelöst werden.

Lymphozyten werden 5 Min. bei 600 g zentrifugiert und das Sediment suspendiert. Die Zellen ( $0,5-5 \times 10^8$ ) werden mit 6 ml Guanidin-SCN-Puffer aufgelöst. Diese Lösung wird direkt auf zwei Caesiumchlorid-Kissen unterschiedlicher Dichte überschichtet. (Abb.3).



Die Kissen werden durch Unterschichten der CsCl-Lösung der Dichte  $1,6 \text{ g/cm}^3$  ( $0,9 \text{ g/ml}$  CsCl in  $25 \text{ mM}$  Na-Citrat pH 7,0, Brechungsindex  $n=1,3902$ ) mit der CsCl-Lösung der Dichte  $1,7 \text{ g/cm}^3$  ( $0,959 \text{ g/ml}$  CsCl in  $25 \text{ mM}$  Na-Citrat pH 7,0, Brechungsindex  $n=1,3994$ ) hergestellt. Für den SW41 Rotor werden  $2 \times 2 \text{ ml}$  CsCl-Lösung mit  $6 \text{ ml}$  Zellen in Guanidin-SCN überschichtet und 18 Std. bei  $32000 \text{ rpm}$  und  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert.

Danach wird die Guanidin-SCN-Lösung mit einer Plastik-pasteurpipette abgenommen und die DNA in ein gesondertes Röhrchen überführt (siehe DNA-Präparation, 2.2.10).

Das Zentrifugenröhrchen wird entleert und auf den Kopf gestellt, um restliche Flüssigkeit ablaufen zu lassen.

Das RNA-Sediment wird mit 2x 100 µl TES (10 mM Tris HCl pH 7,0, 5 mM EDTA, 1% SDS) gelöst, mit 200 µl Chloroform/Butanol (4:1) extrahiert und 5 Min. in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Eppendorffgefäß überführt und die verbleibende organische Phase erneut mit 200 µl TES extrahiert.

Die Überstände werden vereinigt und die RNA mit 2,2 Vol Ethanol 3 Std. bei -20 °C ausgefällt. Danach wird die RNA 10 Min. in der Eppendorffzentrifuge bei 11000 rpm sedimentiert und in 100 µl H<sub>2</sub>O (DEPC-behandelt) gelöst.

Davon werden 3 µl für eine Absorptionsmessung im UV (260 und 280 nm) 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt ; die restliche RNA wird sofort wieder mit 2,5 Vol Ethanol und 0,1 Vol 3 M NaOAc pH 5,2 bei -20 °C ausgefällt.

Bei RNA entspricht 1 OD (260 nm) 40 µg/ml. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis der OD von 260/280 nm 1,8 bis 2,0 betragen. Bei einem kleineren Verhältnis sollte nochmals mit Chloroform/Butanol extrahiert werden.

### 2.2.10. DNA-Präparation

Die DNA des CsCl-Gradienten (siehe 2.2.9.) wird 2 Tage gegen TE (10 mM Tris pH 7,2, 1 mM EDTA) dialysiert und dann mit TE auf ein Volumen von 3 ml/10<sup>8</sup> Zellen Ausgangsmaterial verdünnt.

Bei der DNA-Präparation aus den Zellen einer Zellkultur direkt, werden 1x10<sup>8</sup> Zellen bei 167 g für 10 Min. sedimentiert und mit PBS gewaschen. Sediment in 3 ml EB (20 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) suspendieren.

Mit 100 µl RNase A (10 mg/ml in 0,1 M NaOAc pH 7,5)  
+ 50 µl Proteinase K (10 mg/ml in 20 mM Tris pH 7,5)  
+ 200 µl 10% SDS

wird 1 Std. bei R.T. inkubiert.

Anschließend wird 30 Min. mit 1 Vol Phenol, dann 1 Vol Chloroform extrahiert und die Phasen jeweils bei 1600 g für 10 Min. (3000 rpm in der Hettichzentrifuge) getrennt. Die DNA im wässrigen Überstand wird möglichst ohne Interphase abgenommen und mit 2,2 Vol Ethanol bei - 20 °C ausgefällt.

Die DNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei 260/280 nm bestimmt. 1 OD entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Sollte das Verhältnis der OD von 260/280 nm kleiner als 1,8 sein, wird nochmals mit 1 Vol Phenol und 1 Vol Chloroform extrahiert.

### 2.2.11. Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation aus den E. coli -Stämmen JM83 oder JM103 wird LB-Medium (10 g/l Bakto Tryptone, 10 g/l NaCl, 5 g/l Yeast Extract) verwendet.

Eine Vorkultur (20 ml LB) wird mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Je nach Resistenz des Plasmides enthält das Medium 40 mg/l Ampicillin oder 15 mg/l Tetracyclin.

Mit 1 ml der Vorkultur wird 1 l Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und bis zu einer OD (600 nm) von 0,5 bei 37 °C geschüttelt. Jetzt wird zur Amplifikation der Plasmide 200 mg/l Chloramphenicol für 8 bis 12 Std. zugegeben.

Aufarbeitung (bezogen auf 1 l Kultur) :

- zentrifugieren 10 Min. 5000 rpm 4 °C im GS3-Rotor (Sorvall)
- Sediment suspendieren in 20 ml (Endvolumen) ST (15% Saccharose, 50 mM Tris pH 8,0) und in 40 ml Sorvallröhrchen überführen.

- + 2 ml Lysozym (5 mg/ml in ST) 2 Min. auf Eis

- + 3 ml EDTA (0,5 M pH 8,0) 10 Min. auf Eis

- + 5 ml 2% Sarcosyl 10 Min. auf Eis

- zentrifugieren 60 Min. 18000 rpm im SS34-Rotor bei 4 °C

- dünnflüssigen Überstand dekantieren in 40 ml Sorvallröhrchen.

- + 100 µl RNase A (10 mg/ml) 15 Min. 37 °C
  - + 0,2 Vol 5 M NaCl
  - + 0,33 Vol 30% PEG-6000 2 Std. auf Eis
  - zentrifugieren für 20 Min. 10000 rpm im SS34 Rotor bei 4 °C
  - Sediment trocknen und aufnehmen in 3 ml TE (10 ml Röhrchen)
  - + 1 Vol Phenol, 5 Min, extrahieren bei R.T.
  - zentrifugieren 10 Min. mit 1600 g bei R.T.
  - Überstand + 1 Vol Chloroform, zentrifugieren
  - Überstand + 2,2 Vol Ethanol + 0,1 Vol NaOAc pH 5,2
  - Plasmid-DNA bei - 20 °C ausfällen.
- Die Plasmid-DNA ist nun schon sehr sauber und kann für die meisten Zwecke so verwendet werden.

#### 2.2.12. Reinigung der Plasmid-DNA über CsCl-Gradient

Zur Trennung von supercoiled Plasmid-DNA von Plasmiden mit Einzel- oder Doppelstrangbrüchen und restlicher zellulärer DNA und RNA wird ein CsCl-Gradient angefertigt.

8,53 g CsCl + 6,4 ml TE + 1,8 ml Plasmid-Lösung + 200 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) ergeben ca. 10 ml Lösung mit einem Brechungsindex  $n=1,3920$ . Diese wird auf zwei Röhrchen für den Vertikalrotor ViTi 65 verteilt und die Röhrchen zugeschmolzen. Die Zentrifugation erfolgt bei 45000 rpm 18 Std. bei 20 °C im ViTi-Rotor. Zentrifuge ohne Bremse auslaufen lassen. Die Plasmidbande wird mit einer 2 ml Spritze abgezogen und 5x mit Isopropanol (NaCl-gesättigt) ausgeschüttelt. Überstand auf das 3fache Volumen mit TE verdünnen und DNA mit 2,2 Vol Ethanol ausfällen.

### 2.2.13. Klonierung von Plasmiden und M13-Phagen

Das zu klonierende dsDNA-Fragment wird mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus vorhandener DNA ausgeschnitten, über ein Agarosegel (siehe 2.2.19) von unspezifischer DNA abgetrennt und aus dem Gel eluiert. Dazu wird das Gelstück ausgeschnitten, in einen Dialyseschlauch überführt, nach Zugabe von 400 µl TAE (40 mM Tris Acetat pH 8,0, 2 mM EDTA) der Schlauch verschlossen und mit ca. 75 Volt die DNA 2 Std. elektroeluiert. Anschließend wird die DNA-Lösung mit 1 Vol Phenol, dann 1 Vol Chloroform im Eppendorfgefäß extrahiert und mit 2,2 Vol Ethanol + 0,1 Vol 3 M NaOAc pH 5,2 das DNA-Fragment ausgefällt.

Der Vektor (pUC12 oder M13mp18/19) wird mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geöffnet. Wird nur ein Enzym verwendet, kann eine Religation des Vektors verhindert werden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) (0,1 U/µg Vektor-DNA) für 30 Min bei 37 °C in CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidin). Danach wird mit 1 Vol Phenol und 1 Vol Chloroform extrahiert und der Vektor mit 2,5 Vol Ethanol ausgefällt.

5' überhängende Enden können mit Nukleotiden und Klenow-polymerase aufgefüllt werden (50 µl Reaktion siehe 2.2.24.) zu stumpfen Enden und in die Restriktionsschnittstelle von Sma I kloniert werden.

Bei der Ligationsreaktion von Vektor und DNA-Fragment wird eine Mindestkonzentration an reaktiven Enden und eine relativ niedrige Temperatur benötigt, damit sich die überlappenden Enden häufig und lange genug für die Knüpfung der neuen Bindungen treffen können. Die Menge an Vektor zu DNA-Fragment sollte in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 stehen.

Reaktionsansatz für ein DNA-Fragment von ca. 1 kb Länge

und den Vektor pUC12:

0,5 µg Vektor	5 µl
0,5 µg Fragment	5 µl
5 U DNA-Ligase	2 µl
10x Lig.-Puffer	2 µl
H <sub>2</sub> O ad	<u>20 µl</u>

über Nacht bei 14 °C inkubieren und direkt zur Transformation kompetenter Bakterien verwenden oder bei - 20 °C einfrieren.

10x Ligations-Puffer:

0,5 M Tris pH 7,4
0,1 M MgCl <sub>2</sub>
0,1 M DTT
10 mM Spermidin
10 mM rATP
1 mg/ml BSA

#### 2.2.14. Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium werden mit 5 ml einer Vorkultur von JM83 oder JM103 angeimpft und heftig bei 37 °C geschüttelt. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,4 werden die Bakterien 3 Min auf Eis abgekühlt. Von nun ab nur eiskalte Lösungen und Pipetten verwenden :

- zentrifugieren 10 Min. 6000 rpm bei 4 °C im GS3-Rotor (Sorvall-Zentrifuge, vorgekühlt)
- Sediment suspendieren in 150 ml 0,1 M  $MgCl_2$
- zentrifugieren 10 Min. 6000 rpm bei 4 °C im GS3-Rotor
- Sediment suspendieren in 250 ml 0,1 M  $CaCl_2$
- 30 Min. auf Eis inkubieren
- zentrifugieren 10 Min. 6000 rpm bei 4 °C im GS3-Rotor
- Sediment suspendieren in 15 ml 0,1 M  $CaCl_2$ , 15% Glycerin und in 300 µl Portionen bei - 70 °C oder in flüssigem Stickstoff einfrieren.

Jede Präparation kompetenter Bakterien sollte auf Kompetenz mit einem fertigen Plasmid und auf Kontaminationen getestet werden.

### 2.2.15. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

300 µl kompetente Bakterien (noch nicht ganz aufgetaut) und 5 µl des Ligationsansatzes (ca. 300 ng DNA) oder 2 ng kloniertes Plasmid werden 40 Min. auf Eis mit gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach 90 Sekunden 42 °C Temperaturschock läßt man 5 Min. auf R.T. abkühlen und gibt dann 1 ml LB-Medium zu. Anschließend werden die Bakterien in der Eppendorffzentrifuge für 5 Min. bei 6000 rpm zentrifugiert und das Sediment in 300 µl LB resuspendiert. Davon werden 10, 50 und 240 µl in je 3 ml flüssigen 42 °C warmen Topagar (0,7 % Agaragar in LB) mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion pipettiert und die Mischung auf je eine vorgewärmte Agar-Platte (1,5 % Agaragar in LB) der entsprechenden Resistenz ausplattiert.

Wird die Farbreaktion des β-Galaktosidasegens der pUC-Plasmide ausgenutzt, wird dem Topagar noch 40 µl XGal (20 mg/ml in Dimethylformamid) und bei JM103 zur Induktion der Enzymaktivität 40 µl IPTG (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugesetzt.

Nach 5 Min. ist der Topagar fest und die Bakterienplatten werden über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.16. Minipräparation von Plasmid-DNA

Um den richtigen Klon zu finden werden 12 Kulturen mit je 10 ml LB einzelner (weißer) Klone der Transformation mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Parallel dazu werden die selben Klone zur späteren Verwendung auf einer Bakterienplatte ausgestrichen.

- 10 ml Übernachtskulturen sedimentieren (3000 rpm in der Hettichzentrifuge) bei 1600 g für 10 Min
- Sediment mit 600 µl ST (15 % Saccharose, 50 mM Tris pH 8,0) suspendieren und in Eppendorfgefäß überführen
  - + 10 µl Lysozym (5 mg/ml) 2 Min. auf Eis
  - + 20 µl EDTA (0,5 M)
  - + 1 µl RNase A (10 mg/ml) 5 Min. Eis
  - + 60 µl 2% Sarcosyl 5 Min. Eis
- zentrifugieren in der Eppendorffzentrifuge 30 Min. mit 12000 rpm bei 4 °C
- Überstand in ein Eppendorfgefäß dekantieren und mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl auffüllen
- extrahieren mit 1 Vol Phenol, 1 Vol Chloroform und die DNA ausfällen mit 2,2 Vol Ethanol + 0,1 Vol NaOAc bei - 70 °C für 15 Min.

Die Plasmid-DNA reicht für ca. fünf Enzymverdaus, mit denen die Identität des gesuchten Klons festgestellt werden kann.

### 2.2.17. Transformation von Bakterien mit M13-DNA

Für das Klonieren in M13 werden JM103-Bakterien auf einer Minimalplatte (1,5 % Agaragar, 10 % M9 Salze (60 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 30 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 g/l  $\text{NaCl}$ ), 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Thiamin-HCl, 2% Glucose) ausgestrichen, da die Bakterien nur auf Minimalmedium die für die Infektion durch M13-Phagen notwendigen Pili ausbilden.

Eine Vorkultur von JM103 in 2x YT (16 g/l Tryptone, 5 g/l  $\text{NaCl}$ , 10 g/l Yeast Extract) wird ca. 2 Std. bei 37 °C geschüttelt.

Parallel dazu wird zusammenpipettiert :

- 300 µl Kompetente Bakterien JM103 oder JM83
  - + 5 µl Ligationsansatz 40 Min. auf Eis
  - Temperaturschock 2 Min. 42 °C
  - 5 Min. auf R.T. abkühlen lassen
  - + 1 ml 2x YT
  - zentrifugieren 6000 rpm in der Eppendorffzentrifuge für 5 Min.
  - Sediment in 200 µl 2x YT suspendieren
  - davon 50 und 150 µl in je 3 ml flüssigen Topagar bei 42 °C pipettieren
  - + 40 µl IPTG (20 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ )
  - + 40 µl XGal (20 mg/ml in DMF)
  - +200 µl logarithmisch wachsende JM103 der Vorkultur
  - ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- Es bilden sich blaue und weiße Plaques in einem gleichmäßigen Rasen von JM103-Bakterien.

### 2.2.18. Präparation von Einzel- und Doppelstrang M13-DNA

Die Analyse von 12 Klonen, die Präparation von Einzel (ss)- und Doppelstrang (ds) M13-DNA und das Abnehmen von infektiösem Überstand wird in einem Ansatz durchgeführt.

Eine Vorkultur von JM103 in 2x YT wird über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Zu je 10 ml 2x YT in 100 ml Erlenmeyerkölbchen werden 200 µl der Vorkultur pipettiert. Die Bakterien werden mit einem (weißen) Plaques der Transformation, isoliert mit einer Pasteurpipette, oder 50 µl infektiösem Phagenüberstand infiziert und 4 Std bei 37 °C heftig geschüttelt.

-Zentrifugieren 8000 rpm 10 Min. bei 4 °C im SS34-Rotor in der Sorvallzentrifuge

-8 ml Überstand abpipettieren und in ein neues 10 ml Zentrifugenröhrchen überführen (für ss M13-DNA)

-2 ml Überstand in ein neues Röhrchen dekantieren und als infektiösen Phagenüberstand bei 4 °C aufbewahren.

-Sediment aufarbeiten wie bei der Minipräparation von Plasmid-DNA (siehe 2.2.16.)(für ds M13-DNA)

Die 8 ml Überstand für die ss M13-DNA-Präparation werden wie folgt aufgearbeitet :

+ 1,6 ml 25% PEG, 3 M NaCl 1 Std. auf Eis inkubieren

-zentrifugieren 20 Min. 10000 rpm bei 4 °C im SS34-Rotor

-Sediment trocknen und aufnehmen in 400 µl TE (Eppendorfgefäß)

-extrahieren mit 1 Vol Phenol, 1 Vol Chloroform

-ssDNA ausfällen mit 2,2 Vol Ethanol + 0,1 Vol NaOAc pH 5,2

Die Konzentrationsmessung erfolgt im UV (260/280 nm) mit dem Umrechnungsfaktor für Einzelstrangnukleinsäuren wie bei der RNA : 1 OD = 40 µg/ml.

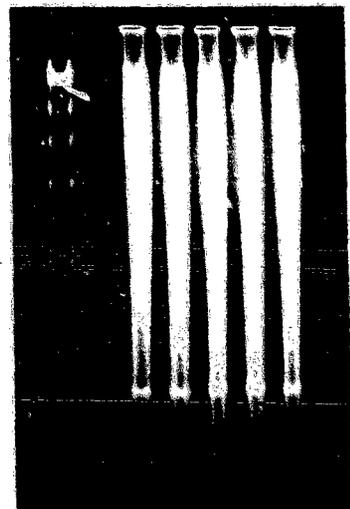
### 2.2.19. Agarosegele für DNA

Für Plasmid-DNA mit Fragmentgrößen von 10 kb bis 200 bp werden 1 bis 2 %ige Agarosegele mit 20 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gel in 1x TAE (40 mM Tris Acetat pH 8,0 , 2 mM EDTA) verwendet. Ca. 0,3 µg DNA pro erwartete Bande in TE wird mit 0,1 Vol 10x Farbpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 60% Glycerin) gemischt, aufgetragen und die Elektrophorese 4 Std. bei 100 Volt oder über Nacht bei 25 Volt durchgeführt.

Für zelluläre DNA mit Fragmentgrößen von 30 kb bis 500 bp werden 0,7 %ige Agarosegele mit 10 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) pro 100 ml Gel in 1x TAE über Nacht bei 25 Volt verwendet. Für einen Southern-Transfer zellulärer DNA wird 20 µg/Spur mit einem Restriktionsenzym gespaltener DNA aufgetragen (Abb.4). Als Marker kann z.B. EcoRI/HindIII gespaltene DNA von λ -Phagen verwendet werden.

Abb.4: Zelluläre DNA von fünf Tumorzelllinien gespalten mit EcoRI.

Je 20 µg DNA wurden mit 2x 50 U EcoRI für 6 Std. bei 37 °C verdaut, mit Phenol und Chloroform extrahiert, ausgefällt mit Ethanol und im Probenpuffer auf das 0,7 %ige Agarosegel aufgetragen. Der Marker ist λ-Klon C7/C12 gespalten mit EcoRI.



## 2.2.20. Southern-Transfer von DNA

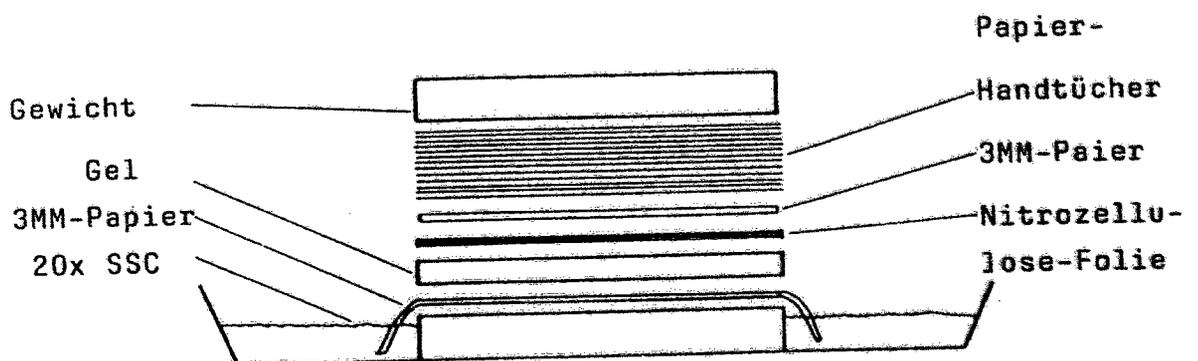
Das DNA-Gel wird zunächst mit einem Maßstab auf dem UV-Tisch fotografiert.

Die DNA im Agarosegel wird dann 2x 30 Min. mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert und anschließend das Gel wieder neutralisiert mit 1 M Tris pH 7,5, 1,5 M NaCl für 2x 30 Min.

Nitrozellulose-Folie der Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$  oder Hybond N-Folie wird zunächst in  $\text{H}_2\text{O}$ , dann in 20x SSC (3 M NaCl, 0,5M NaCitrat, pH 7,2) für mindestens 30 Min. vorgeweicht.

Whatman 3MM-Papier, das DNA-Gel, die Nitrozellulose, 3MM-Papier und ein Stoß Papierhandtücher werden übereinandergelegt und mit ca. 10 g/cm<sup>2</sup> Gel beschwert. Mit dem 20x SSC wird die DNA auf die Nitrozellulose-Folie gesaugt. (Abb.5). Anschließend wird die Folie 2 Std. bei 80 °C im Vakuum gebacken.

Abb.5: Southern-Blot

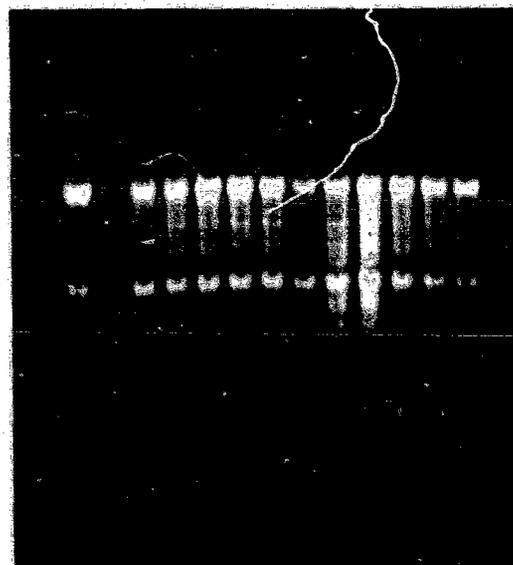


### 2.2.21. Agarosegele für RNA

Für RNA-Größen von 200 b bis 5 kb wird ein 1,5 %iges Agarosegel mit 6 % Formaldehyd in 1x MOPS (0,4 M Morpholinopropansulfonsäure, 100 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7,0) gegossen. 20 µg totale zelluläre RNA werden aufgenommen in 20 µl Probenpuffer (50% Formamid, 15% Formaldehyd, 10% 10x MOPS, 25% DEPC-H<sub>2</sub>O) und 15 Min. bei 70 °C denaturiert. Die RNA wird auf Eis abgekühlt, mit 2 µl 10x Farbpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 60% Glycerin) versetzt und die Elektrophorese ca. 5 Std. bei 100 Volt pro 15 cm Gellänge durchgeführt. Dabei wird der Elektrophoresepuffer (1x MOPS) von + nach - umgepumpt, da die Pufferkapazität sonst nicht ausreicht den pH-Wert an den Elektroden konstant zu halten.

Um die RNA sichtbar zu machen, kann das Gel für 3 Min. in einem Ethidiumbromidbad (0,1 mg/ml) gefärbt werden, mit anschließendem Entfärben für ca. 1 Std. in H<sub>2</sub>O (Abb.6).

Abb.6: Zelluläre RNA von stimulierten Lymphozyten gefärbt mit Ethidiumbromid.



### 2.2.22. Northern- Transfer von RNA

Um die RNA an Nitrozellulose-Folie oder Hybond N-Folie zu binden, wird das RNA-Gel ohne nochmals zu denaturieren mit 20x SSC entsprechend dem Southern-Blot (2.2.20.) weiterverarbeitet.

### 2.2.23. Elektro-Transfer von Nukleinsäuren

DNA und RNA in Agarosegelen kann auch in einer Elektro-Blot-Kammer (Western-Blot-Kammer) auf die Nitrozellulose bzw. Hybond N-Folie übertragen werden. Dafür wird die Folie im Kammerpuffer (25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,4) 30 Min. vorgeweicht und die Nukleinsäuren werden über Nacht bei 200 mA transferiert.

2.2.24. In vitro Markierung von dsDNA (Nick-Translation)

Für die Hybridisierung der Southern- und Northern-Blots werden Plasmide oder spezifische DNA-Fragmente von 300 bp bis 5 kb mit  $^{32}\text{P}$ -dATP radioaktiv markiert.

Reaktionsansatz : 0,3  $\mu\text{g}$  DNA in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE  
+ 5  $\mu\text{l}$  10x Nick-Translationspuffer  
+ 2  $\mu\text{l}$  0,5 mM dTTP  
+ 2  $\mu\text{l}$  0,5 mM dCTP  
+ 2  $\mu\text{l}$  0,5 mM dGTP  
+ 2  $\mu\text{l}$  0,025 mM dATP  
+ 5  $\mu\text{l}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP (50  $\mu\text{Ci}$ , 3000 Ci/mmol)  
+  $\text{H}_2\text{O}$  ad 46  $\mu\text{l}$   
+ 2  $\mu\text{l}$  DNase I (1:10000) 5 Min. R.T.  
+ 2  $\mu\text{l}$  DNA-Polymerase I (5 U)

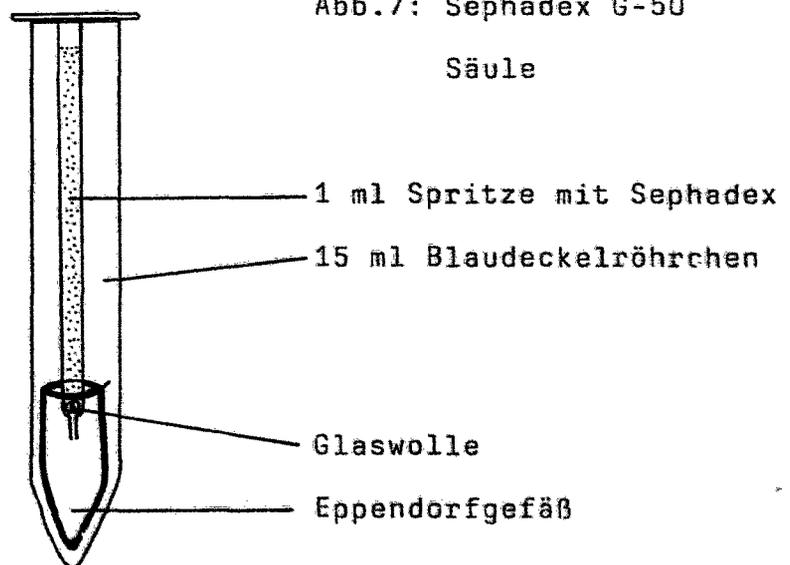
inkubieren für 2 Std. bei 14 °C (Wasserbad im Kühlraum).

10x Nick-Translationspuffer : 0,1 M  $\text{MgSO}_4$   
0,5 M Tris pH 7,2  
1 mM DTT  
0,5 mg/ml BSA

Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  STE (50 mM Tris pH 7,2 , 1 mM EDTA, 1% SDS).

Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide werden durch Zentrifugation durch eine Sephadex G-50 Säule von der markierten Probe abgetrennt<sup>(126)</sup>.

Dafür wird das in STE vorgequollene Säulenmaterial in eine 1 ml Plastik-Spritze gefüllt und die Flüssigkeit in ein Eppendorfggefäß 4 Min. bei 167 g (1000 rpm in der Hettichzentrifuge) hineinzentrifugiert. Das Eppendorfggefäß wird nun ausgewechselt und die 100 µl Lösung der Nick-Translation durch das trockene Säulenmaterial 4 Min. zentrifugiert (Abb.7).



Das Eppendorfggefäß enthält danach die markierte Probe in 100 µl STE. Davon wird 1 µl im Szintillationszähler ohne Szintillationsflüssigkeit gezählt und die spezifische Aktivität der Probe berechnet ( $1-2 \times 10^8$  cpm/µg DNA).

## 2.2.25. Hybridisierung der Southern- und Northern-Blots

Die Nitrozellulose- bzw. Hybond N-Folien mit gebundener DNA oder RNA werden zunächst mit 2x SSC angefeuchtet und in einen Plastikbeutel (Einfrierbeutel) überführt. Die Hybridisierungslösung bestehend aus

50% Formamid

6x SSPE (43 g/l NaCl, 6,9 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,85 g/l EDTA, pH 7,2)

5x BFP (1 g/l Ficoll, 1 g/l Polyvinylpyrrolidon, 1 g/l BSA)

300 µg/ml Lachs DNA

0,3 % SDS

wird 30 Min. bei 70 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und luftblasenfrei zusammen mit den Folien in den Plastikbeutel eingeschweißt (ca. 0,1 ml Hybridisierungslösung/ cm<sup>2</sup> Blot). Die Vorhybridisierung erfolgt 4 bis 24 Std. bei 42 °C im Schüttelwasserbad. Die radioaktiv markierte DNA (100 µl in 5 ml Hybridisierungslösung) wird 30 Min. bei 70 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zur Vorhybridisierungslösung zugegeben (ca.  $2 \times 10^5$  cpm/cm<sup>2</sup>). Die Hybridisierung erfolgt 24 bis 72 Std. im Schüttelwasserbad bei 42 °C.

Die Folien werden anschließend gewaschen mit

- 0,2x SSC 0,1% SDS für 15 Min. bei R.T.
- 3x 30 Min. mit 0,2x SSC 0,1% SDS bei 60 °C
- 0,2x SSC 0,1% SDS für 15 Min. bei R.T.

und anschließend getrocknet und ein Röntgenfilm (Cronex-2) wird bei -70 °C angelegt.

### 2.2.26. Färben der RNA auf Nitrozellulose-Folien

Die RNA auf Nitrozellulose- und Hybond N-Folien kann nach dem Backen oder nach der Hybridisierung und Exposition mit Methylen-Blau angefärbt werden<sup>(126)</sup>.

Schon hybridisierte Folien werden vor dem Färben 1 Std. mit H<sub>2</sub>O bei 70 °C gewaschen um die Lachs-DNA und Probe der Hybridisierung zu entfernen.

- Folie für 5 Min. in 5% Essigsäure einweichen
- mit einer Lösung von 0,04% Methylen-Blau in 0,5 M NaOAc pH 5,2 für 5 Min. bei R.T. färben
- mit H<sub>2</sub>O entfärben bis 28 S und 18 S RNA als blaue Banden vor hellerem Hintergrund sichtbar werden.

#### 2.2.26. Färben der RNA auf Nitrozellulose-Folien

Die RNA auf Nitrozellulose- und Hybond N-Folien kann nach dem Backen oder nach der Hybridisierung und Exposition mit Methylen-Blau angefärbt werden<sup>(126)</sup>.

Schon hybridisierte Folien werden vor dem Färben 1 Std. mit H<sub>2</sub>O bei 70 °C gewaschen um die Lachs-DNA und Probe der Hybridisierung zu entfernen.

- Folie für 5 Min. in 5% Essigsäure einweichen
- mit einer Lösung von 0,04% Methylen-Blau in 0,5 M NaOAc pH 5,2 für 5 Min. bei R.T. färben
- mit H<sub>2</sub>O entfärben bis 28 S und 18 S RNA als blaue Banden vor hellerem Hintergrund sichtbar werden.

### 2.2.27. Nuklease S1-Kartierung (S1 mapping)

Die S1-Kartierung wird mit spezifischen ss M13-DNA-Proben durchgeführt (127)(128).

Synthese der radioaktiven Probe :

- 1,5 µl ss M13-DNA mit spezifischem Insert
- + 4 µl Primer (15 b Sequenzierungs-Primer, Pharmacia)
- + 1,5 µl 10x Puffer A (100 mM Tris pH 7,4, 100 mM MgCl<sub>2</sub>)
- + H<sub>2</sub>O ad 15 µl
- 10 Min. bei 60 °C denaturieren und 30 Min. auf R.T. abkühlen lassen. Dabei hybridisiert der Primer 3' der multiplen Klonierungsstelle von M13 an die ss DNA.
- + 3 µl <sup>32</sup>P-α-dATP (30 µCi, 3000 Ci/mmol)
- + 1 µl DNA-Polymerase I, großes Fragment (Klenow) (5 U)
- + 2 µl Synthese Puffer (0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dTTP, 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA)
- 15 Min. bei 28 °C inkubieren
- + 2 µl Nukleotid Puffer (0,5 mM dGTP/dCTP/dTTP/dATP, 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA)
- 15 Min. bei 28 °C inkubieren
- + 70 µl TSE (20 mM Tris pH 7,4, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- + 10 µl Restriktionsenzym puffer für EcoRI oder HindIII
- + 25 U EcoRI (M13mp18) oder HindIII (M13mp19)
- 1Std. bei 37 °C verdauen
- + 100 µl TSE
- + 200 µl Phenol/Chloroform 1:1
- extrahieren und zentrifugieren 5 Min. in der Eppendorfzentrifuge
- + 2 µl Carrier RNA (Hefe tRNA)(10 mg/ml)
- + 500 µl Ethanol.
- 30 Min. bei - 70 °C ausfällen, 10 Min. zentrifugieren

Die radioaktive ss DNA-Probe wird über ein 8%iges Acrylamidgel mit 7% Harnstoff von dem M13-Template getrennt :

- 21 g Harnstoff
  - + 20 ml H<sub>2</sub>O
  - + 5 ml 10x TBE (108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure,  
40 ml/l 0,5 M EDTA, pH 8,2 )
  - + 10 ml 38% Acrylamid- 2% Bisacrylamid- Lösung
- rühren bis sich der Harnstoff gelöst hat, evakuieren
- + 45 µl TEMED
  - +200 µl 10% Ammoniumpersulfat in H<sub>2</sub>O (frisch)

Gel gießen und 2 Std. polymerisieren lassen.

Elektrophorese bei 40 Watt, 1500 Volt, 28 mA.

Das Gel wird 30 Min. ohne Probe vorgewärmt auf ca. 60 °C.

Die radioaktiv markierte Probe wird in 12 µl Probenpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 0,01 M EDTA, 50% Formamid) aufgenommen und 2 Min. bei 100 °C denaturiert.

Auf Eis abkühlen, auf das Gel auftragen und bei 40 Watt für ca. 1,5 Std. die Elektrophorese durchführen.

Das Gel wird für 2 Min. an einen Cronex 2 Röntgenfilm angelegt, um die genaue Position der Bande radioaktiver ss DNA zu finden. Die Bande wird mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Mit 2x 200 µl Extraktionspuffer (0,5 M NaOAc pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) wird 2x 30 Min. bei 37 °C extrahiert.

Die Überstände werden vereinigt und mit 10 µl Carrier RNA versetzt. Extraktion mit 1 Vol Phenol/Chloroform, zentrifugieren und Überstand mit 2,2 Vol Ethanol ausfällen (30 Min. bei - 70 °C). Das Sediment wird nun im Szintillationszähler trocken gemessen (ca.  $5 \times 10^6$  cpm).

Für die Hybridisierung mit zellulärer RNA werden  $1 \times 10^6$  cpm pro Ansatz verwendet.

Hybridisierungsansatz:

5  $\mu$ l  $^{32}$ P-ssM13-DNA-Probe in DEPC- $H_2O$

+ 4  $\mu$ l zelluläre RNA (10-20  $\mu$ g)

10 Min. bei - 70 °C einfrieren und 30 Min. lyophilisieren

+ 10  $\mu$ l Formamid Hybridisierungspuffer

(0,4 M NaCl, 40 mM HEPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 80% Formamid)

20 Min. bei 60 °C denaturieren und 4 bis 16 Std. bei 42 °C

in den Eppendorfgefäßen hybridisieren.

Reaktion stoppen auf Eis :

+ 100  $\mu$ l S1 Puffer (250 mM NaCl, 30 mM NaOAc pH 4,5, 1 mM  $ZnSO_4$ )

Eppendorfgefäße in ein 30 °C Wasserbad stellen

+ 70 U Nuklease S1

1 Std. bei 30 °C verdauen

+ 100  $\mu$ l Phenol/Chloroform 1:1

extrahieren und zentrifugieren 5 Min, Überstand abnehmen

und in ein neues Eppendorfgefäß überführen

+ 1,5  $\mu$ l Carrier RNA (10 mg/ml)

+ 250  $\mu$ l Ethanol

30 Min. bei - 70 °C ausfällen, 15 Min zentrifugieren,

Sediment gut trocknen und in 10  $\mu$ l Probenpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 0,01 M EDTA, 90% Formamid)

aufnehmen. 2 Min. bei 100 °C denaturieren, auf Eis abkühlen

und auf ein vorgewärmtes denaturierendes Acrylamidgel auftragen (siehe Reinigung der ssDNA). Elektrophorese für

2 Std. bei 40 Watt. Anschließend über Nacht einen Röntgenfilm anlegen.

2.2.28. Bestimmung der Transkriptionsrate  
(nuclear run-on assay) (129-132)

Für die in vitro Transkription radioaktiv markierter RNA werden zunächst funktionell intakte Zellkerne von Lymphozyten in unterschiedlichen Aktivierungsstadien hergestellt.  $2 \times 10^8$  Lymphozyten werden mit BSS gewaschen und in 8 ml Lysepuffer (0,3 M Saccharose, 0,5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0,05% Triton X-100, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 15 mM HEPES pH 7,5) suspendiert und 10 Min. auf Eis mit gelegentlichem Hin- und Herpipettieren inkubiert. Die Kerne werden 5 Min. bei 1600 g (3000 rpm in der Hettichzentrifuge) zentrifugiert und in 2 ml des gleichen Puffers ohne Triton X-100 suspendiert. Die Suspension wird 2x durch ein 15 ml Kissen des gleichen Puffers mit 30% Saccharose 10 Min. bei 1000 g (2500 rpm) zentrifugiert. Nach dem ersten Mal werden die Kerne mit Trypanblau gezählt. Die Kerne werden dann im Kernpuffer (20 mM Tris pH 7,9, 75 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,85 mM DTT, 0,125 mM PMSF, 50% Glycerin) aufgenommen und in Portionen zu  $2 \times 10^7$  Kerne in 100  $\mu$ l bei -70 °C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bei der nun folgenden Neusynthese von RNA mit  $^{32}\text{P}$ -rUTP werden von der Polymerase II nur die RNA-Moleküle verlängert, deren Transkription in vivo schon initiiert war. Der Test ist also ein Maß für die Polymerasedichte bzw. Transkriptionsrate der Zellen in einem bestimmten Aktivierungsstadium.

Für die Elongationsreaktion wird auf Eis in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert :

- 6 µl H<sub>2</sub>O
- + 10 µl 25 mM rATP
- + 10 µl 25 mM rCTP
- + 10 µl 25 mM rGTP
- + 25 µl 100 mM Creatinphosphat
- + 27 µl 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- + 25 µl 10x EP (870 mM Tris pH 7,9, 240 mM NaCl, 2 mM EDTA,  
9 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 830 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> )
- + 1,7 µl 1 M MnCl<sub>2</sub>
- + 5 µl 25% Sarcosyl
- + 5 µl Creatinkinase (2,5 U/µl)
- + 25 µl <sup>32</sup>P-α-rUTP (250 µCi, 410 Ci/mmol)
- + 100 µl Zellkerne

In einem Gesamtvolumen von 250 µl wird 30 Min. bei 26 °C inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von :

- + 1,25 ml H<sub>2</sub>O
  - + 60 µl 10% SDS
  - + 50 U DNase I (RNase frei)
- inkubieren für 5 Min. bei 26 °C.

+ 15 µl Proteinase K (10 mg/ml)

inkubieren für 30 Min. bei 26 °C. Die Lösung wird nun in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt :

- + 10 µl Carrier RNA (10 mg/ml)
- + 1,5 ml 0,3 M NaOAc, 20 mM EDTA

Das Gesamtvolumen beträgt nun 3 ml.

Extraktion mit 1 Vol Phenol, zentrifugieren 10 Min. bei 10000 rpm im HB-4 Rotor in der Sorvall-Zentrifuge.

Überstand + 1 Vol Chloroform, extrahieren, zentrifugieren  
Überstand + 1 Vol 10% TCA, 60 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 2 mM rUTP  
inkubieren 30 Min. auf Eis  
zentrifugieren 10 Min. bei 10000 rpm im HB-4 Rotor bei 4 °C  
Überstand dekantieren (sehr radioaktiv)  
Sediment lösen in 400 µl 0,3 M NaOAc, in ein Eppendorfgefäß  
überführen und mit 2,2 Vol Ethanol ausfällen 30 Min. bei -70°C.  
Zentrifugieren 10 Min. in der Eppendorffzentrifuge .  
Das Sediment in 100 µl TES aufnehmen und ein Aliquot im  
Szintillationszähler vermessen. Es werden etwa  $5 \times 10^6$  cpm  
säurefällbare RNA neu synthetisiert.

Die radioaktive neu synthetisierte RNA wird nun hybridisiert  
mit einem Hybond N-Filter, auf dem spezifische DNA-Fragmente  
(je ca. 4 µg) der nachzuweisenden Gene (möglichst ohne re-  
petitive Sequenzen) gebunden sind.

Vorhybridisierung über Nacht bei 42 °C mit dem Hybridisierung-  
puffer (50% Formamid, 5x BFP, 6x SSPE, 300 µg/ml Lachs-DNA,  
0,3% SDS, 250 µg/ml Carrier RNA (Hefe-RNA)). Für die Hybri-  
disierung wird die markierte RNA in TES 10 Min. bei 70 °C de-  
naturiert und zu der Vorhybridisierungslösung zugegeben.  
Die Filter werden mit  $1 \times 10^6$  cpm/ml Hybridisierungslösung  
3 Tage bei 42 °C hybridisiert.

Waschen der Filter: 2x 5 Min. R.T. mit 2x SSC

2x 15 Min. 60°C mit 0,3x SSC/0,1% SDS

1x 15 Min. R.T. mit 2x SSC

1x 15 Min. R.T. mit 2x SSC/2,5µg/ml RNaseA

1x 15 Min. R.T. mit 0,3x SSC/0,1% SDS

Die Filter werden ca. 7 Tage an einen Röntgenfilm angelegt.

### 2.2.29 Transfektion von DNA mit Calciumphosphat (133-135)

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion neu ausgesät,  $1 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Kulturschale. 3 Std. vor der Transfektion wird das Medium nochmals gewechselt und die Zellen bekommen 10 ml MEM-Medium mit 5% FCS.

Zwei Lösungen werden steril in zwei 5 ml Röhrchen bei R.T. vorbereitet :

- a) 0,5 ml 2xHBS (280mM NaCl, 1,5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50mM HEPES pH7,1)
- b) 0,43 ml  $\text{H}_2\text{O}$ 
  - + 62  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{CaCl}_2$
  - + 10  $\mu\text{l}$  zu transfizierende DNA (0,1-10  $\mu\text{g}$ )

Lösung b) wird tropfenweise mit Lösung a) gemischt und bleibt für 30 Min. bei R.T. stehen. Es bildet sich ein feines Präzipitat der DNA. Die Mischung wird nun auf die Zellen pipettiert, gleichmäßig verteilt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Erhöhung der Transfektionsrate kann ein Glycerinschock durchgeführt werden :

Nach 3 Std. werden die Zellen mit auf 37 °C vorgewärmten serumfreien Medium gewaschen. Pro 10 cm Kulturschale werden 3 ml 15% Glycerin in MEM (37 °C) pipettiert, gleichmäßig verteilt und 2 Min. bei 37 °C inkubiert. Dann werden die Zellen wieder mit serumfreien Medium gewaschen und bekommen 20 ml neues Medium mit 5% FCS.

Eine transiente Expression der transfizierten Gene kann 24 - 48 Std.nach der Transfektion untersucht werden.

Bei der Transfektion mit Plasmiden, die einen Methallothionin-Promotor enthalten, wird 20 Std.nach der Transfektion für 4 - 8 Std.zur Induktion der Transkription der entsprechenden Gene  $10 \mu\text{M ZnCl}_2$  und  $2 \mu\text{M CdCl}_2$  im Medium zugestzt.

Bei der Transfektion mit pSV2neo (siehe 2.1.8.) zur stabilen Transformation wird dem Medium 2 Tage nach der Transfektion  $400 \mu\text{g/ml G418}$  zur Selektion zugesetzt. Die meisten Zellen sterben nun und lösen sich von dem Boden der Kulturschale ab. Nach ca. 10 Tagen werden 5 - 10 neomycinresistente Klone pro 10 cm Kulturschale sichtbar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression von c-Onkogenen in Milzzellen der Maus

##### 3.1.1. Expression in ConA stimulierten Milzzellen

Lymphozyten aus Mausmilzen wurden nach möglichst kurzer Aufarbeitung und ohne die Zellen mit irgendwelchen stimulierenden Agentien in Berührung zu bringen, als "nicht-aktivierte" Zellen als Ausgangsmaterial und Referenz für alle weiteren Versuche verwendet.

Werden diese Zellen in RPMI-Medium mit 5% FCS ausgesät und bei 37 °C inkubiert, findet keine meßbare Proliferation statt. Bei Zusatz von 2,5 µg/ml Concanavalin A (ConA) in das Medium beginnen die T-Zellen zu proliferieren und bauen ab ca. 20 Std. nach Stimulation <sup>3</sup>H-Thymidin in ihre DNA ein (Abb.8). Durch ConA werden T-Helferzellen (L3T4<sup>+</sup>) und zytotoxische T-Zellen (Lyt2<sup>+</sup>) gleichermaßen stimuliert, wobei die T-Helferzellen das für die Proliferation beider T-Zell-Populationen notwendige Interleukin-2 (IL-2) in der Zellkultur selbst produzieren.

Die T-Zellen durchlaufen mehrere Zellzyklen bis sie nach etwa 5 Tagen die Proliferation einstellen und einige Tage später sterben. Diese Zellen sind also normale, nicht-transformierte Zellen und können nicht unbegrenzt in Kultur gehalten werden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach ConA-Stimulation wurde aus den Lymphozyten RNA und DNA präpariert. Um den jeweiligen Zustand der Zellen zu erhalten, wurden diese 5 Min. bei 4 °C sedimentiert und sofort in Guanidinium-rhodanid-Puffer aufgelöst. Die RNA wurde über einen

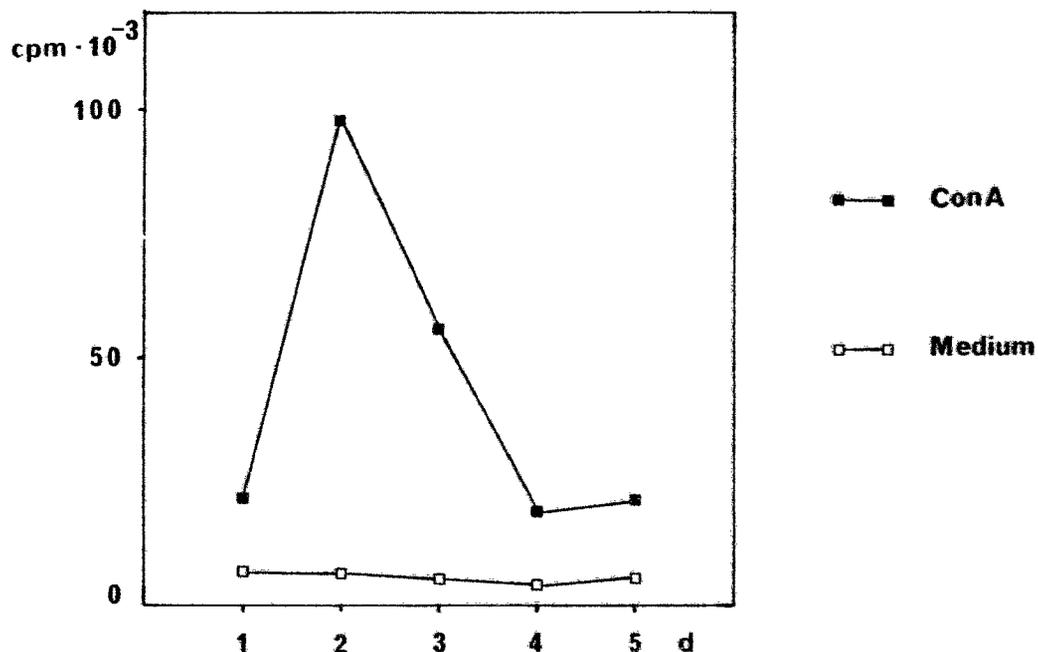


Abb.8: <sup>3</sup>H-Thymidineinbau stimulierter Lymphozyten

Lymphozyten aus Mausmilzen wurden in RPMI-Medium 5% FCS mit (■—■) oder ohne (□—□) ConA für verschiedene Zeiten bei 37 °C inkubiert. Jeweils 16 Std. vor dem Ernten der Zellen wurde mit 5 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin neu synthetisierte DNA markiert und der radioaktive Einbau gemessen (siehe 2.2.8.).

CsCl-Gradienten gereinigt, in einem denaturierenden Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, auf einen Nitrozellulose-Filter übertragen und mit onkogenspezifischen Proben hybridisiert (siehe Material und Methoden).

Das Signal für die c-fos mRNA war in nicht-aktivierten Zellen nicht nachweisbar, aber schon 15 Min. nach Stimulation wurde eine Bande bei 2,4 kb sichtbar. Nach maximaler Expression bei 1 Std. nahm die Signalstärke rasch wieder ab (Abb.9(A)).

Als Kontrolle dafür, daß in allen Spuren vergleichbare Mengen intakter RNA vorhanden ist, wurde die Nitrozellulose-Folie gleichzeitig mit einer H-2 spezifischen Probe hybridisiert. Die mRNA dieses Gens des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Maus gibt ein Signal bei 1,7 kb, unterhalb der 18 S ribosomalen RNA. Bei einem sehr starken c-fos oder c-myc Signal schmiert dieses nach unten und wird so von der 18 S RNA getrennt, daß eine weitere Bande bei 1,7 kb erscheint. Das verstärkt das Signal der dort lokalisierten H-2 Bande unspezifisch und macht diese als Maß für die Menge der aufgetragenen gesamt RNA unzuverlässig. Besser geeignet ist das Anfärben der RNA in einem Vergleichsgel (Abb.6) oder das Anfärben der Nitrozellulose-Folie nach der Hybridisierung (siehe 2.2.26.).

Als zweite onkogenspezifische Probe wurde ein Plasmid mit einem Teil des c-myc Gens verwendet. Die c-myc mRNA Expression zeigte eine völlig andere Kinetik als die c-fos mRNA Expression (Abb.9(B)). Hier wurde das Maximum erst 6 Std. nach Stimulation mit ConA erreicht und die c-myc mRNA blieb auch noch nach Tagen nachweisbar.

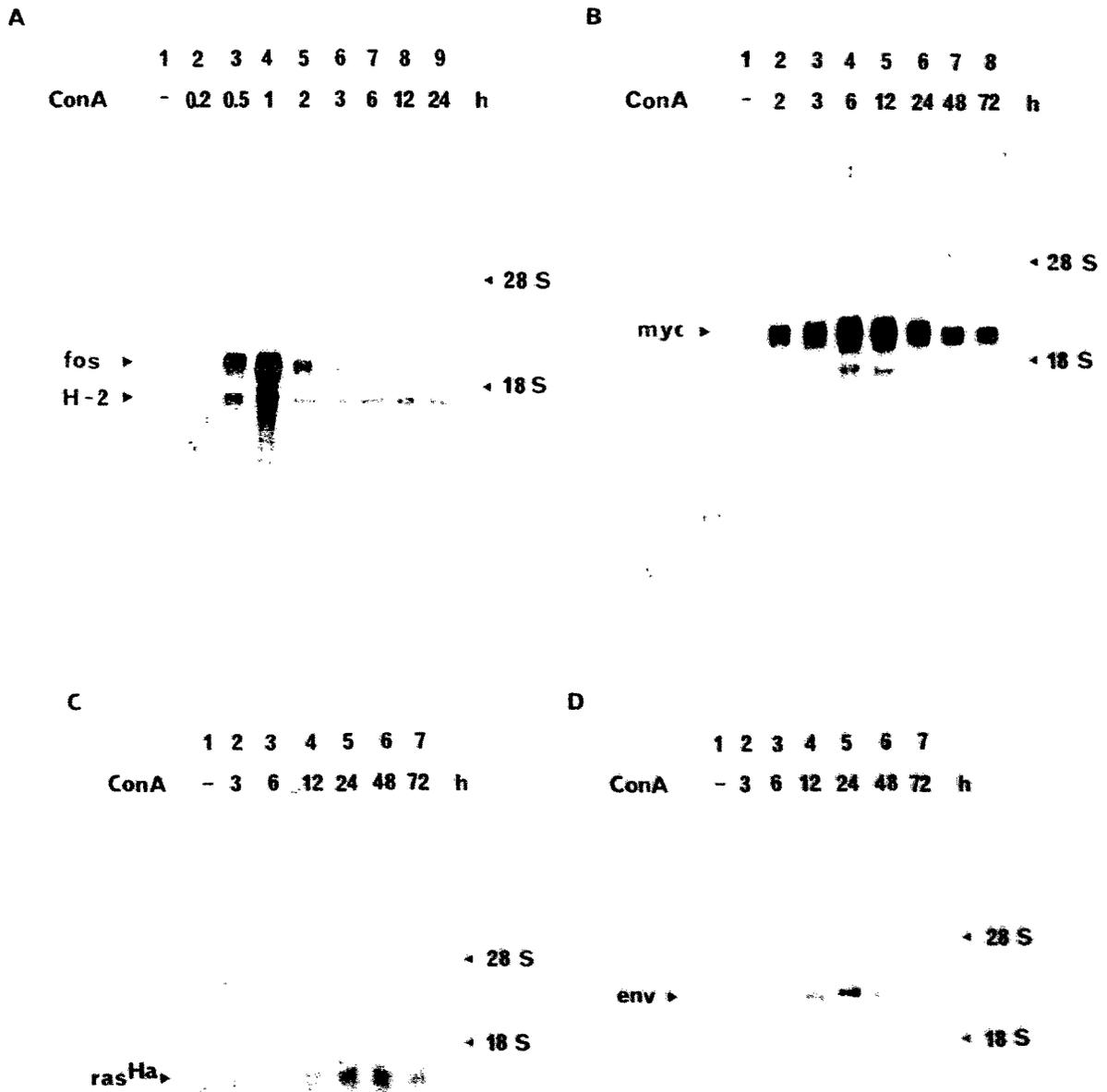


Abb.9: Northern-Blots ConA-stimulierter Lymphozyten

Lymphozyten aus Mausmilzen wurden mit 2,5 µg/ml ConA in RPMI 5% FCS stimuliert, nach verschiedenen Zeiten RNA präpariert und Northern-Blots angefertigt. Die Nitrozellulose-Filter wurden hybridisiert mit durch Nick-Translation markierten DNA-Proben spezifisch für fos (pfos(M)780) und H-2 (pH-2<sup>d</sup>1)(A), myc (pmyc (M)E2)(B), Ha-ras (1,3 kb KpnI/PstI Fragment von pH1) (C) und env (penv)(D).

Das c-Ha-ras Onkogen wurde insgesamt nur sehr schwach exprimiert, zeigte aber eine Zunahme bei 24 und 48 Std nach ConA-Stimulation (Abb.9(C)).

Das zelluläre Gen für das Glycoprotein gp70, das Homologie zu retroviralen Genen für das Hüllprotein (env) besitzt, wurde erst 24 Std. nach Stimulation mit ConA vorübergehend exprimiert (Abb.9(D)) (165)(166).

Mindestens drei zelluläre Onkogene, c-fos, c-myc und c-Ha-ras wurden also von proliferierenden normalen Lymphozyten mit verschiedener Kinetik exprimiert. Trotzdem sind diese Zellen nicht transformiert und können auch nicht unbegrenzt in Kultur gehalten werden.

### 3.1.2. Expression in Tumorzellen

Ein Vergleich der Onkogenexpression in Lymphozyten mit viral transformierten Zellen oder durch chemische Karzinogenese entstandenen Tumorzellen (Tabelle 1) zeigte, daß auch in transformierten Zellen nicht immer mehr mRNA der getesteten Onkogene exprimiert wurde, als in mitogen stimulierten normalen Lymphozyten (Abb.10(b),11(b),12(b)).

Die DNA der Tumorzellen (Abb.10(a),11(a),12(a)) zeigte verschiedene Unregelmäßigkeiten, wie Amplifikationen oder Rearrangements.

Die c-fos, c-myc und c-Ha-ras Gene der Lymphozyten lagen dagegen als eine Kopie pro haploidem Genom vor (Abb.10(a), 11(a),12(a) jeweils Spur 5).

Eine Expression von c-fos mRNA war in den Tumorzellen nicht nachweisbar (Abb.10(b)). Auch nach Behandlung mit Cycloheximid (CHI) war nur ein sehr schwaches Signal bei den Zelllinien SCH und BDVII (Abb.10(b)Spur 6 und 8) im Vergleich zu CHI-behandelten Lymphozyten (Abb.10(b)Spur 13) zu erkennen.

Die Expression der c-myc mRNA war nicht korreliert mit der Amplifikation des Gens (Abb.11). So wurde die c-myc mRNA in MCA-Zellen (Abb.11(b)Spur 1) weniger exprimiert als in SCH-Zellen (Abb.11(b)Spur 4), obwohl das c-myc Gen in den MCA-Zellen etwa zehnfach amplifiziert ist und in den SCH-Zellen als Einzelkopie vorliegt (Abb.11(a)Spur 1 und 4).

Auch c-Ha-ras wurde in den Tumorzellen unterschiedlich stark exprimiert (Abb.12(b)). Auffällig war eine starke Hybridisierung mit der mRNA aus Molony-Sarkomavirus transformierten Zellen, SAC<sup>+</sup>, die auch Virus-Produzenten sind (Abb.12(b)Spur 2). Die DNA der UT-Zellen (Abb.12(a)Spur 9) zeigte eine zusätzliche Bande bei 9 kb, die auf ein Rearrangement von c-Ha-ras oder Amplifikation und Kreuzhybridisierung von c-Ki-ras zurückzuführen sein könnte. Die selben Zellen zeigten auch eine Amplifikation des c-myc Gens um etwa das Fünzigfache (Abb.11(a)Spur 9).

Tabelle 1 :

Inzucht- stamm	Name	mRNA (Northern-Blot)				DNA (Southern-Blot)	Zellen transformiert :
		fos	myc	Ha-ras	mos		
STU	MCA-5	-	+	+	-	myc amplifiziert	Methylcholanthren <sup>(136)</sup>
STU	SAC <sup>+</sup>	-	++	+++	+	myc/mos amplifiziert	MoMuSV (Virus <sup>+</sup> )
STU	SAC <sup>-</sup>	-	++	++	+	myc/mos amplifiziert	MoMuSV (Virus <sup>-</sup> )
STU	SCH-TD	(+) <sup>*</sup>	+	+	-	-	(spontaner Tumor)
C57B1/6	BDVII	(+) <sup>*</sup>	+	+	-	fos rearrangiert	Dimethylbenzanthrazen <sup>(137)</sup>
C57B1/6	T241	ND	+	+	-	myc amplifiziert	Dibenzanthrazen <sup>(138)</sup>
C3H	HDII	-	+	+	-	fos rearrangiert	Dimethylbenzanthrazen <sup>(137)</sup>
C3H	TRI	-	+	+	ND	-	? (Trichoepitheliom) <sup>(139)</sup>
NMRI	UT	-	+++	+	-	myc/ras amplifiziert	Dimethylbenzanthrazen <sup>(140)</sup>
129J	F9	-	+	+	-	-	(Terato Karzinom)

\* schwache Expression nach Behandlung mit CHI

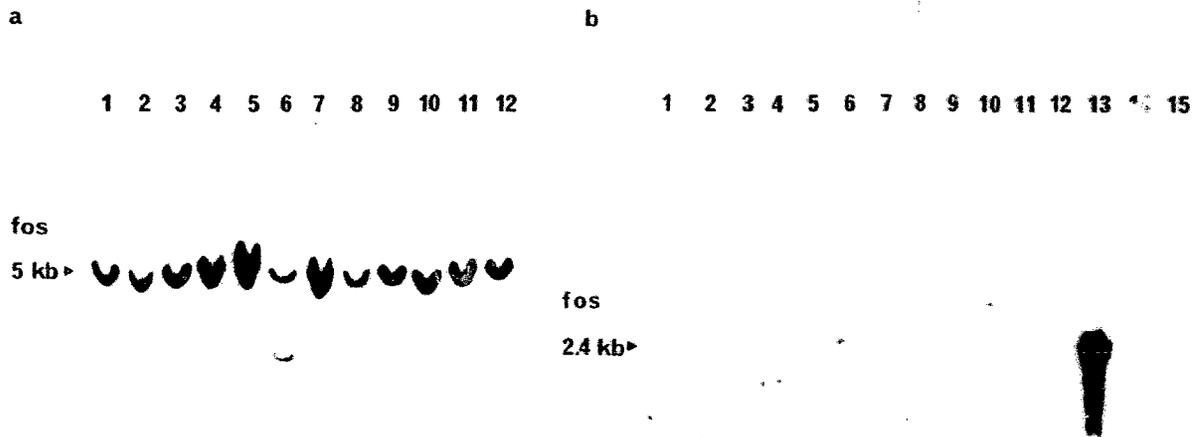


Abb.10: Southern- und Northern-Blot der Tumorzellen

a) Aus verschiedenen Tumorzellen wurde DNA präpariert, mit EcoRI gespalten, ein Southern-Blot angefertigt und mit einer fos-spezifischen  $^{32}\text{P}$ -markierten Probe hybridisiert. Die Spuren enthalten DNA aus : MCA(1), SAC<sup>+</sup>(2), SAC<sup>-</sup>(3), SCH(4), C57Bl/6-Milz(5), BDVII(6), T241(7), HDII(8), UT(9), F9(10), TRI(11) und 3T3(12).

b) Northern-Blot der Tumorzell-RNA. Jeweils ein Teil der Zellen wurde mit 20 µg/ml CHI für 1 Std. vorbehandelt. Die Spuren enthalten RNA aus : MCA(1), MCA+CHI(2), SAC<sup>-</sup>(3), SAC<sup>-</sup>+CHI(4), SCH(5), SCH+CHI(6), BDVII(7), BDVII+CHI(8), HDII(9), HDII+CHI(10), UT(11), UT+CHI(12), Lymphozyten+CHI(13), TRI(14) und F9(15).

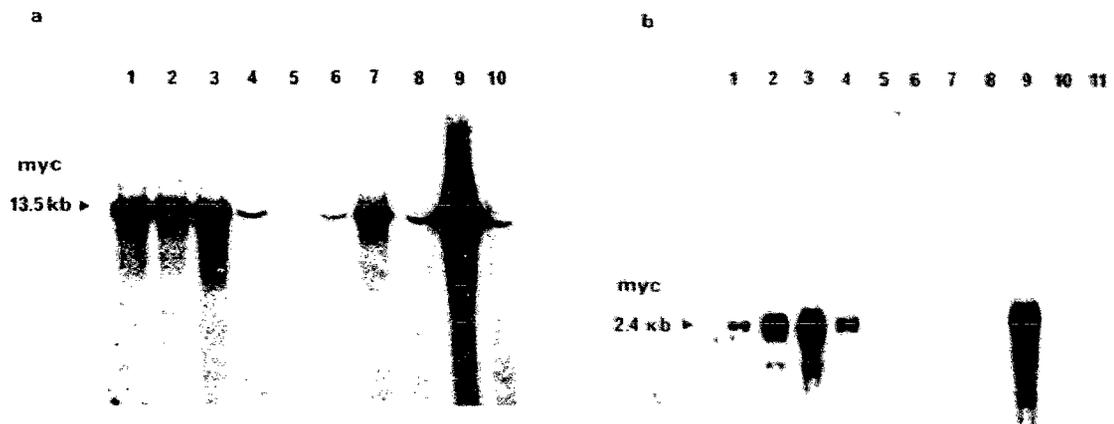


Abb.11: Southern- und Northern-Blot der Tumorzellen

a) Southern-Blot hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten, myc-spezifischen Probe. Die Spuren enthalten DNA aus : MCA(1), SAC<sup>+</sup>(2), SAC<sup>-</sup>(3), SCH(4), C57B1/6-Milz(5), BDVII(6), T241(7), HDII(8), UT(9), F9(10). Das Signal für das c-myc Gen in den Spuren (1)(2)(3) und (7) ist etwa 10fach, in Spur (9) etwa 50fach amplifiziert.

b) Northern-Blot der Tumorzellen hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten myc-spezifischen Probe. Die Spuren enthalten RNA aus den selben Zellen wie im Southern-Blot a). Spur 5 enthält RNA aus nicht-aktivierten Lymphozyten, Spur 11 RNA aus 48 Std. LPS-aktivierten Lymphozyten.

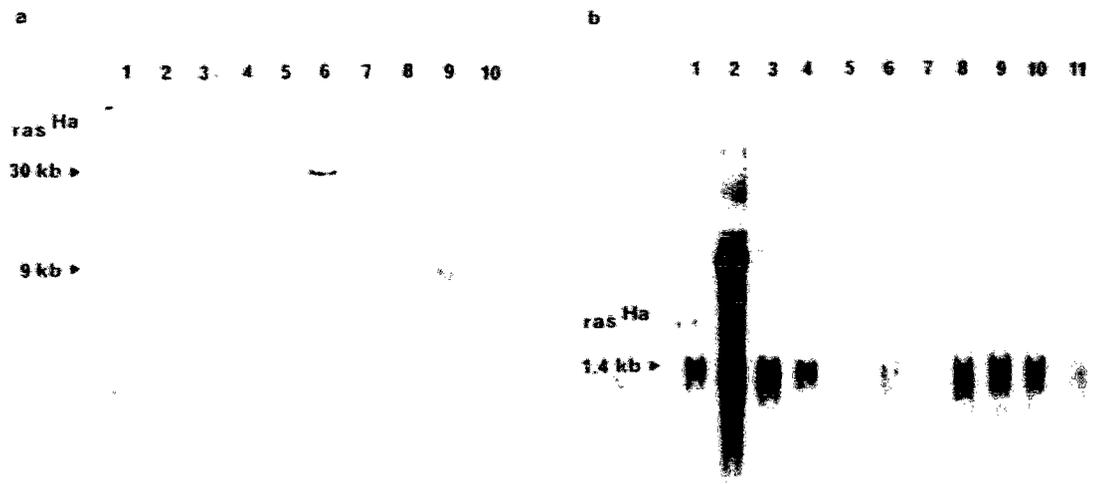


Abb.12: Southern- und Northern-Blot der Tumorzellen

a) Southern-Blot hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Ha-ras-spezifischen Probe. Die Spuren enthalten die gleiche DNA wie in Abb.11(a) : MCA(1), SAC<sup>+</sup>(2), SAC<sup>-</sup>(3), SCH(4), C57B1/6-Milz(5), BDVII(6), T241(7), HDII(8), UT(9), F9(10). Das Signal in Spur 9 bei 9 kb kommt entweder durch Kreuzhybridisierung mit amplifiziertem c-Ki-ras oder Rearrangement von c-Ha-ras zustande.

b) Northern-Blot der Tumorzellen hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Ha-ras-spezifischen Probe. Die Spuren enthalten RNA aus den selben Zellen wie im Southern-Blot a). Spur 5 enthält RNA aus nicht-aktivierten Lymphozyten, Spur 11 RNA aus 48 Std. LPS-aktivierten Lymphozyten.

Die beiden zellulären Onkogene c-myc und c-Ha-ras wurden demnach in unterschiedlicher Menge, aber in allen getesteten Zelllinien exprimiert. Ihre Expression ist deshalb mit dem transformierten Zustand eher korreliert als die Expression der c-fos mRNA, die hier nicht nachzuweisen war.

### 3.1.3. Expression in gereinigten und stimulierten T-Zellen aus Mausmilzen

Mausmilzen bestehen zu ca. 55% aus T-Zellen, 40% aus B-Zellen und 5% aus Makrophagen. Aufgrund ihrer Bindungseigenschaften an Nylonwolle lassen sich B-Zellen und Makrophagen leicht von den T-Zellen abtrennen (siehe 2.2.2.). Die T-Zellen aus gesamt-Milzzellen wurden gereinigt, um eine einheitlichere Zellpopulation zu erhalten und prozentual mehr Zellen mit ConA zu stimulieren. Um eine noch bessere und synchronere Proliferationsantwort auf die Stimulation zu bekommen, wurden die T-Zellen mit Neuraminidase (siehe 2.2.4.) behandelt. Diese entfernt negative, sich abstoßende Ladungen von der Oberfläche der Zellen und erleichtert dadurch den für die Aktivierung wichtigen Zell-Zell-Kontakt und macht die T-Zellen unabhängig von akzessorischen Zellen<sup>(122)</sup>.

Aus nicht stimulierten und 3, 20 und 48 Std. ConA-behandelten T-Zellen wurde RNA präpariert, Northern-Blots angefertigt und mit c-myc, c-Ha-ras und H-2 spezifischen Proben hybridisiert. (Abb.13).

Parallel zu den RNA-Präparationen wurde ein  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau zur Kontrolle der Proliferation durchgeführt (Abb.14). Da nur noch wenige B-Zellen und Makrophagen unter den T-Zellen waren, führte die ConA-Stimulation im Vergleich zu ungetrennten Milzzellen zu einem stärkeren Signal der c-myc und c-Ha-ras mRNA.

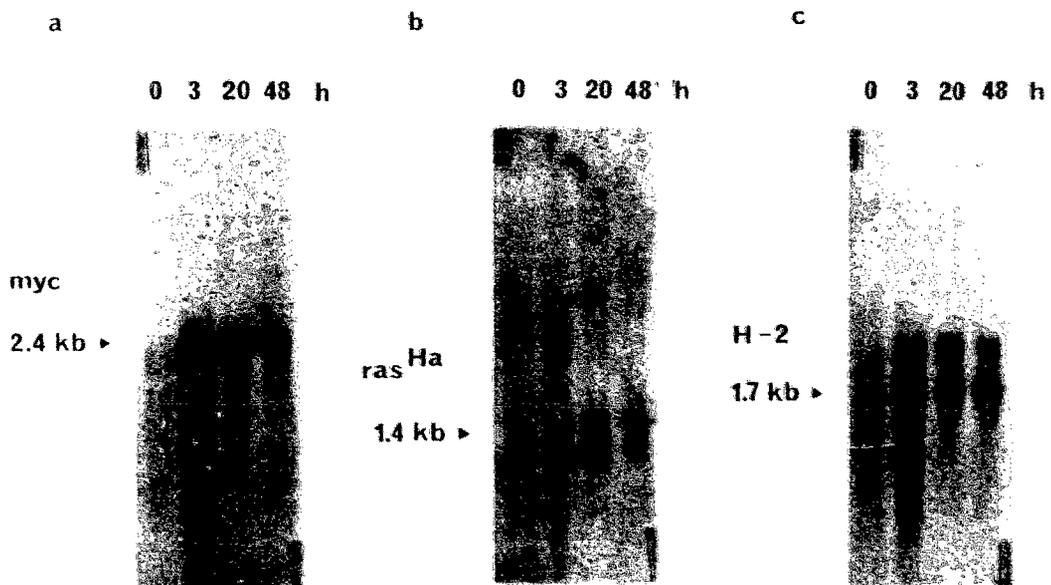


Abb.13: Northern-Blot ConA-stimulierter T-Zellen

Über Nylon-Wolle gereinigte und Neuraminidase behandelte T-Zellen wurden mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ConA stimuliert, nach verschiedenen Zeiten RNA präpariert und Northern-Blots angefertigt. Die Nitrozellulose-Filter wurden hybridisiert mit durch Nick-Translation markierten DNA-Proben spezifisch für c-myc (pmyc(M)E2)(a), c-Ha-ras (1,3 kb KpnI/PstI Fragment von pH1)(b), und H-2 (pH-2<sup>d</sup>1)(c). Dabei wurde der Filter (a) mit H-2 nachhybridisiert, sodaß die c-myc Banden in (c) schwach sichtbar blieben.

Schon 3 Std. nach Stimulation mit ConA zeigte sich ein c-myc Signal, das etwa 50fach stärker als in nicht aktivierten Zellen war (Abb.13(a)). Die c-Ha-ras mRNA wurde 20 Std. nach Stimulation maximal exprimiert und war bei 48 Std. wieder schwächer (Abb.13(b)).

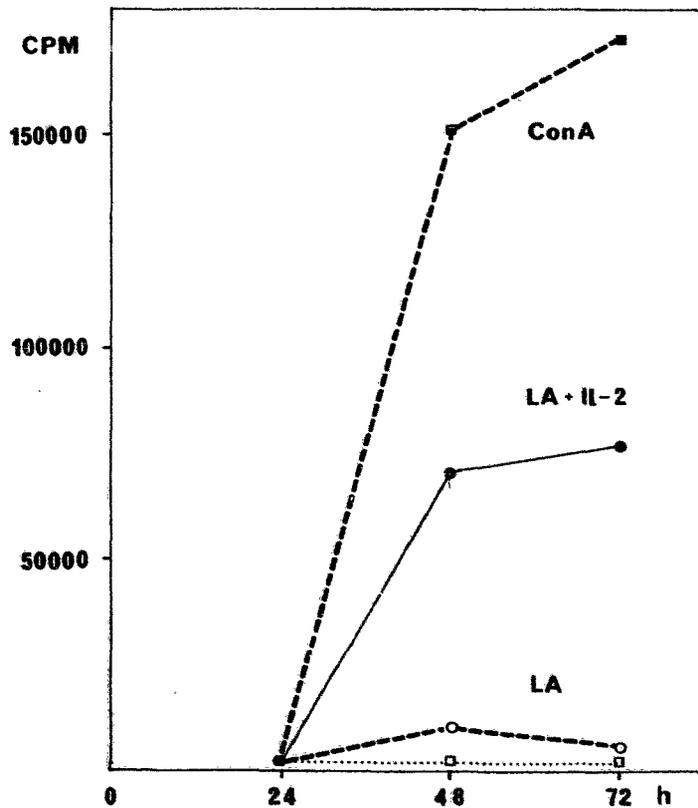


Abb.14:  $^3\text{H}$ -Thymidin Einbau  
Über Nylon-Wolle gereinigte und Neuraminidase behandelte T-Zellen wurden mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ConA (■-■), 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LA+ 30 U/ml IL-2 (●-●), 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LA (○-○), oder Medium (□-□) bei 37°C inkubiert und jeweils 16 Std. vor dem Ernten mit 5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin die neu synthetisierte DNA markiert.

Im Prinzip entsprach das Ergebnis der Expression in ConA-stimulierten ungetrennten Milzzellen. Die c-fos Expression wurde hier nicht untersucht, da während der Reinigung der T-Zellen mit 5% FCS bei 37 °C inkubiert wurde, was, wie nachfolgend gezeigt wird, an sich schon die c-fos Expression stimulieren kann (siehe Abb.21(B)).

Die T-Zellen aus Mausmilzen bestehen zu etwa 50% aus L3T4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und zu 50% aus Lyt2<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen. ConA stimulierte beide Subpopulationen, wobei die T-Helferzellen in der Kultur genügend IL-2 zur Proliferation beider Subpopulationen produzierten (Abb.14). Mit 0,5 µg/ml Leukoagglutinin (LA) wurden nur die Lyt2<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen zur Expression des IL-2-Rezeptors angeregt, sie konnten aber selbst IL-2 nicht ausreichend

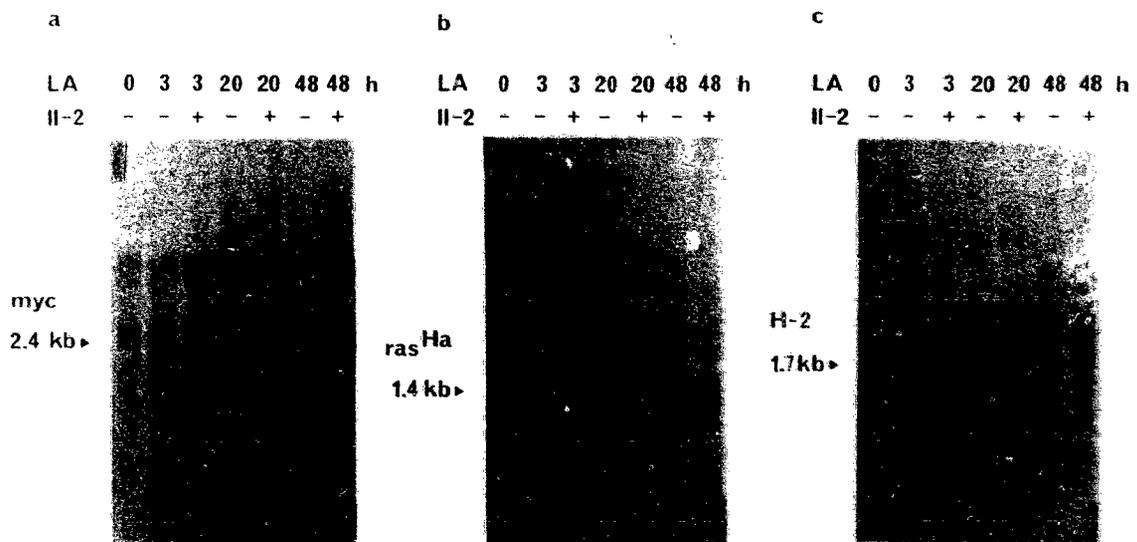


Abb.15: Northern-Blot LA-stimulierter T-Zellen

Über Nylon-Wolle gereinigte und Neuraminidase-behandelte T-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml LA stimuliert und teilweise 30 U/ml kloniertes IL-2 zugegeben. 3, 20 und 48 Std. nach Stimulation wurden die Zellen geerntet, RNA präpariert und Northern-Blots angefertigt. Die Nitrozellulose-Filter wurden hybridisiert mit <sup>32</sup>P-markierten DNA-Proben spezifisch für c-myc (pmyc(M)E2)(a), c-Ha-ras (1,3 kb KpnI/PstI Fragment von pH1)(b), und H-2 (pH-2<sup>d</sup>1)(c).

für Proliferation produzieren. Die  $L3T4^+$ -T-Helferzellen reagierten unter diesen Bedingungen nicht auf LA und produzierten deshalb auch kein IL-2. Wurde jedoch bei der Stimulation mit LA dem Medium 30 U/ml IL-2 zugesetzt, proliferierten die  $Lyt2^+$ -Zellen (etwa 50% der mit ConA aktivierten Zellen, Abb.14).

Die Northern-Blots der LA stimulierten T-Zellen mit und ohne IL-2, also in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen, sind in Abb.15 zu sehen. Zugabe von IL-2 führte zu einer Verstärkung des c-myc mRNA-Signals (Abb.15(a)) und zu einer schwachen Verstärkung des c-Ha-ras mRNA-Signals (Abb.15(b)).

Die Kinetik der Expression von c-myc war im Vergleich zu ConA-stimulierten T-Zellen zu späteren Zeiten hin verschoben, obwohl der Beginn der Proliferation bei den ConA- und LA+IL-2 -aktivierten T-Zellen gleich blieb (Abb.14).

Wurde der Unterschied in der Kinetik der c-myc Expression nun durch das andere Mitogen oder die Zellpopulation verursacht ? Um diese Frage zu klären wurden aus den T-Zellen die  $Lyt2^+$ -zytotoxischen T-Zellen isoliert und untersucht.

für Proliferation produzieren. Die  $L3T4^+$ -T-Helferzellen reagierten unter diesen Bedingungen nicht auf LA und produzierten deshalb auch kein IL-2. Wurde jedoch bei der Stimulation mit LA dem Medium 30 U/ml IL-2 zugesetzt, proliferierten die  $Lyt2^+$ -Zellen (etwa 50% der mit ConA aktivierten Zellen, Abb.14).

Die Northern-Blots der LA stimulierten T-Zellen mit und ohne IL-2, also in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen, sind in Abb.15 zu sehen. Zugabe von IL-2 führte zu einer Verstärkung des c-myc mRNA-Signals (Abb.15(a)) und zu einer schwachen Verstärkung des c-Ha-ras mRNA-Signals (Abb.15(b)).

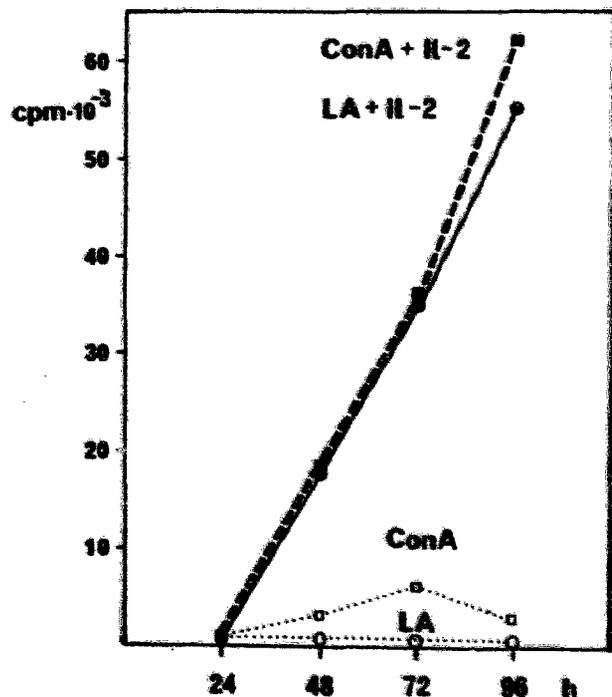
Die Kinetik der Expression von c-myc war im Vergleich zu ConA-stimulierten T-Zellen zu späteren Zeiten hin verschoben, obwohl der Beginn der Proliferation bei den ConA- und LA+IL-2 -aktivierten T-Zellen gleich blieb (Abb.14).

Wurde der Unterschied in der Kinetik der c-myc Expression nun durch das andere Mitogen oder die Zellpopulation verursacht ? Um diese Frage zu klären wurden aus den T-Zellen die  $Lyt2^+$ -zytotoxischen T-Zellen isoliert und untersucht.

### 3.1.4. Expression in stimulierten $\text{Lyt}2^+$ -T-Zellen

Die gesamt T-Zellen wurden mit einem Ratte anti-T4(Maus)-Antikörper (H.1.29.19), Kaninchen anti-Ig(Ratte)-Antikörper und Komplement behandelt, um die  $\text{L}3\text{T}4^+$ -Zellen zu entfernen (siehe 2.2.3.). Die  $\text{Lyt}2^+$ -Zellen wurden dann mit ConA alleine, mit ConA + IL-2 und mit LA + IL-2 stimuliert.

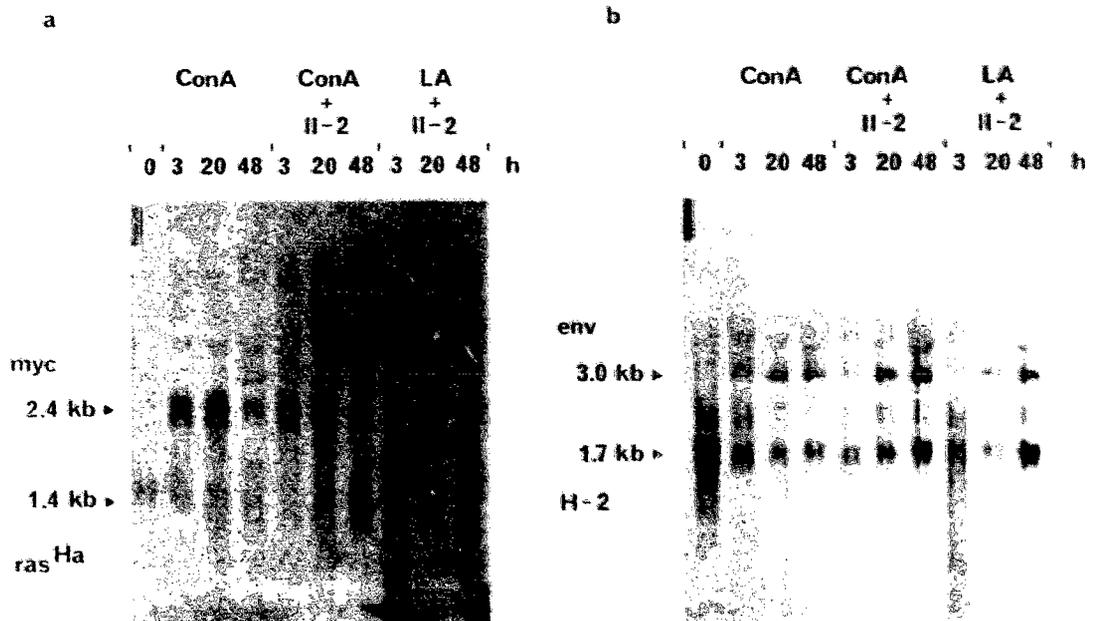
Abb.16:  $^3\text{H}$ -Thy.-Einbau  
 $\text{Lyt}2^+$ -Zellen wurden mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ConA ( $\square$ - $\square$ ), ConA+IL-2 (30 U/ml) ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ), 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LA ( $\circ$ - $\circ$ ) oder LA + IL-2 (30 U/ml) ( $\bullet$ - $\bullet$ ) stimuliert und jeweils 16 Std. vor dem Ernten der Zellen mit 5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin neu synthetisierte DNA markiert.



Der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau zeigt, daß ConA + IL-2 und LA + IL-2 in gleichem Maße zur Proliferation führten (Abb.16).

ConA oder LA ohne IL-2 induzierte zwar den IL-2-Rezeptor, konnte die  $\text{Lyt}2^+$  zytotoxischen T-Zellen aber nicht zu einer ausreichenden Produktion des Wachstumsfaktors IL-2 anregen. (Abb.16) (122).

Die nicht-proliferierenden, ConA-stimulierten Lyt2<sup>+</sup>-Zellen zeigten im Northern-Blot ein schwaches Signal der c-myc mRNA nach 3 und 20 Std., welches nach 48 Std. wieder verschwunden war (Abb.17(a)). Die mit ConA + IL-2 stimulierten, also proliferationsaktiven Zellen, zeigten nach 3 Std. ebenfalls ein schwaches Signal für c-myc, welches erst nach 20 Std. maximal und nach 48 Std. noch deutlich sichtbar war. Die Stimulation mit LA + IL-2 führte bei gleicher Proliferation (Abb.16) nach 3 Std. zu überhaupt keiner und nach 20 und 48 Std. zu einer schwächeren Expression von c-myc mRNA als die Stimulation mit ConA + IL-2 (Abb.17(a)).



Abt. 17: Northern-Blot stimulierter Lyt2<sup>+</sup>-T-Zellen

Lyt2<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit 2,5 µg/ml ConA, ConA+IL-2 (30 U/ml) und LA+IL-2 stimuliert, nach 3, 20 und 48 Std. geerntet, RNA präpariert und ein Northern-Blot angefertigt. Der Nitrozellulose-Filter wurde hybridisiert mit c-myc und c-Ha-ras spezifischen Proben(a) und der selbe Filter rehybridisiert mit env und H-2 spezifischen Proben (b).

C-Ha-ras wurde nur in den proliferierenden Lyt2<sup>+</sup>-T-Zellen verstärkt exprimiert (Abb.17(a)). Im Falle der c-Ha-ras Expression war kein Unterschied zwischen ConA+IL-2 und LA+IL-2 -Stimulation festzustellen.

Die quantitative Auswertung der Northern-Blots (Abb.13, 15, und 17) für das c-myc mRNA-Signal bezogen auf H-2 verdeutlicht den Unterschied zwischen ConA- und LA-Stimulation (Abb.18).

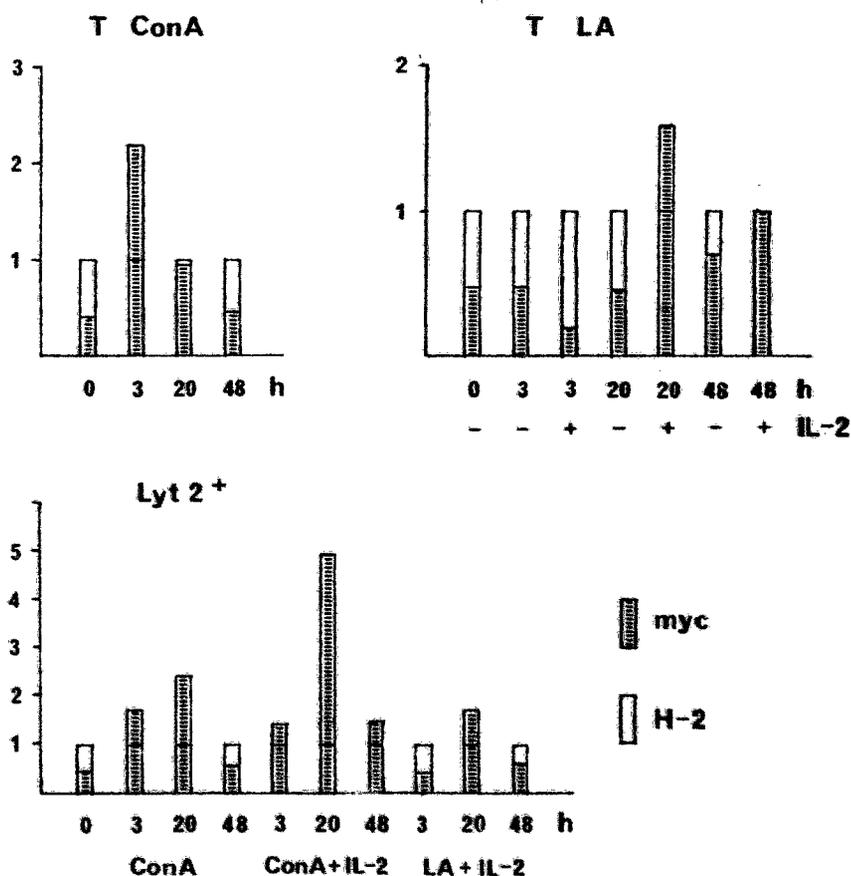


Abb.18: Densitometrische Auswertung der Northern-Blots

Die Absorption des c-myc und H-2 Signals der Northern-Blots von Abb 13, 15 und 17 wurden gemessen und normiert auf H-2. Daraus ergibt sich eine relative c-myc Expression bezogen auf H-2. Die absoluten Werte der c-myc und H-2 Expression der unterschiedlichen Northern-Blots können nicht miteinander verglichen werden.

ConA + IL-2 und LA + IL-2 bewirkten zwar bei gleicher Proliferation verschieden starke c-myc Expression, aber die Kinetik der c-myc Expression blieb mit Maximalwerten bei 20 Std. gleich (Abb.18, Lyt2<sup>+</sup>).

Die vorher beschriebene Kinetik der c-myc Expression in ungetrennten T-Lymphozyten (Abb.13) mit Maximalwerten bei 3 Std. nach ConA-Stimulation unterschied sich deutlich von der Kinetik in Lyt2<sup>+</sup>-T-Zellen und dürfte daher charakteristisch für die T-Helferzellen sein.

Auch die H-2 mRNA-Konzentration nahm nach mitogener Stimulation zu und bietet somit keinen optimalen Bezugswert. Zumindest aber kann damit gezeigt werden, daß die RNA intakt war und bei den nicht-aktivierten Zellen kein c-myc oder c-Ha-ras exprimiert wurde.

Drei Ergebnisse sollten festgehalten werden :

1. Die Expression des c-myc Gens genügte nicht zur Proliferation der T-Zellen.
2. Die Stärke der c-myc Expression war nicht korreliert mit der proliferativen Aktivität der T-Zellen.
3. L3T4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und Lyt2<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen zeigten bei gleicher mitogener Stimulation eine unterschiedliche Kinetik der c-myc Expression.

### 3.2. Regulation der Expression

#### 3.2.1. Wirkung von Cycloheximid auf die mRNA-Konzentration

Von K.Kelly<sup>(95)</sup> und Ch.Dani<sup>(99)</sup> wurde Ende 1983 gefunden, daß Cycloheximid (CHI) bei Lymphozyten und verschiedenen Zelllinien (HeLa, MCF7, HL60) eine Akkumulierung der sonst sehr kurzlebigen mRNA von c-myc bewirkt. Worauf der Mechanismus dieses Effektes beruht, ist noch unbekannt. P.Leder postulierte zwei Modelle, einen labilen Repressor, der bei der Inhibition der Proteinbiosynthese durch CHI nicht mehr nachproduziert würde, oder eine Stabilisierung der mRNA der entsprechenden Gene<sup>(95)</sup>.

Meine weiteren Versuche beschäftigten sich zunächst mit der Frage, welche Wirkung CHI auf die Konzentration und Halbwertszeit der mRNA von c-myc, c-fos und c-Ha-ras in Lymphozyten hat und schließlich, ob die Expression der Onkogene einer Transkriptionskontrolle oder einer Post-Transkriptionskontrolle unterliegt.

Die Expressionskinetiken in ungetrennten Milzzellen (siehe Abb.9) wurden so erweitert, daß zu jeder RNA ConA-stimulierter Lymphozyten nun auch die entsprechende RNA aus CHI-behandelten Zellen isoliert wurde. Die Zellen wurden 1 bzw. 3 Std. vor dem Ernten mit 10 µg/ml CHI im Medium behandelt und danach die RNA präpariert, Northern-Blots angefertigt und mit spezifischen, radioaktiv markierten Proben für c-myc (Abb.19(A)), c-fos (Abb.21(A)) und c-Ha-ras (Abb.22(A))

hybridisiert. Gleichzeitig wurde eine Kinetik der Onkogenexpression nur in Medium mit 5% FCS gehaltener Zellen mit und ohne CHI durchgeführt. Nun konnte also direkt die Expression der Onkogene proliferierender Lymphozyten (Abb.19(A), 21(A), 22(A)) verglichen werden mit der Expression in nicht proliferierenden Lymphozyten (Abb.19(B), 21(B), 22(B)).

Die Proliferationskontrolle zu den Versuchen, d.h. der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau, zeigte einen klaren Gegensatz zwischen proliferierenden (ConA) und nicht proliferierenden (Medium) Lymphozyten (Abb.8).

Die c-myc mRNA-Konzentration nach ConA-Stimulation wurde deutlich beeinflusst durch CHI (Abb.19(A)). CHI führte bei frühen Meßpunkten (3, 6 und 12 Std.) zu einer Superinduktion und bei späteren Werten zu einem konstanten Niveau von c-myc mRNA. Die Behandlung der Lymphozyten mit CHI für 1 Std. in Medium ohne FCS und Mitogen (Abb.19(B) Spur 9) führte nur zu einem schwachen Signal von c-myc mRNA. Medium mit 5% FCS ohne ConA führte zu einer schwachen Expression von c-myc, die durch CHI superinduziert werden konnte (Abb.19(B)).

Die quantitative densitometrische Auswertung der Northern-Blots (Abb.19 und teilweise Abb.25) ist in Abb.20 dargestellt. Die maximale mRNA-Konzentration nach 6 Std. ConA-Stimulation wurde als 100% Wert genommen. Die Zunahme der c-myc mRNA von nicht-aktivierten auf maximal aktivierte

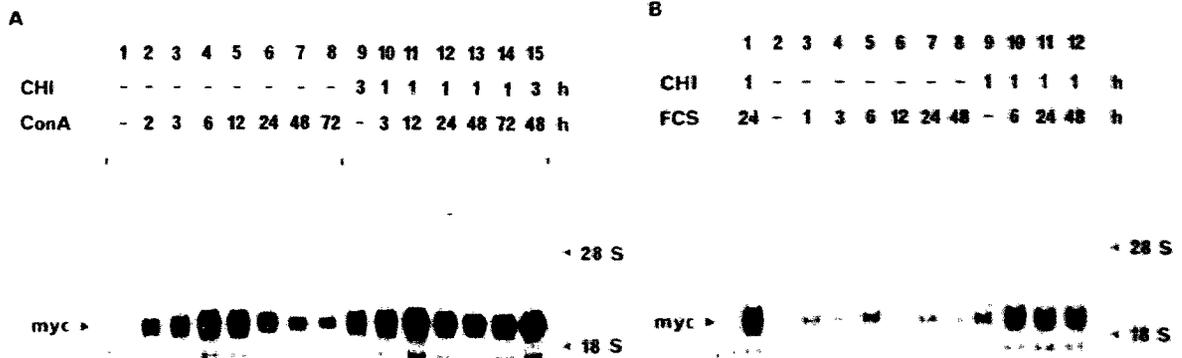


Abb.19: Northern-Blot stimulierter Lymphozyten  $\pm$  CHI

Gesamt Milzzellen wurden stimuliert mit 2,5  $\mu$ g/ml ConA in Medium 5% FCS (A) oder Medium 5% FCS alleine (B). Teilweise wurden die Zellen für 3 Std., ((A)Spur 9 und 15) oder 1 Std. ((A)Spur 10 bis 14 und (B)Spur 9 bis 12) vor dem Ernten mit 10  $\mu$ g/ml CHI behandelt. RNA wurde präpariert, Northern-Blots angefertigt und hybridisiert mit  $^{32}$ P-markierten DNA-Proben spezifisch für c-myc (pmyc(M)E2). Die RNA in (A)Spur 12 wurde als Kontrolle auch in (B)Spur 1 aufgetragen, um einen direkten Vergleich beider Bilder zu ermöglichen.

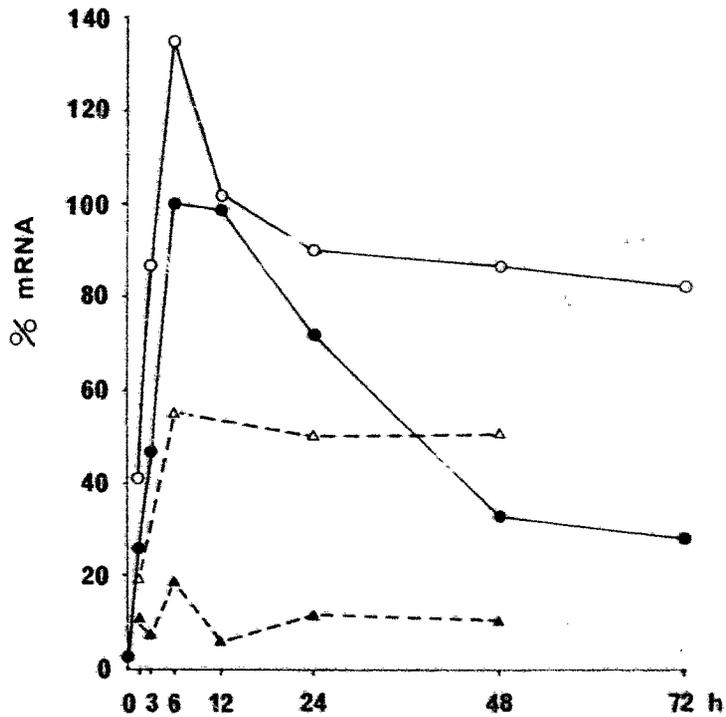


Abb.20: Densitometrische Auswertung der c-myc Expression

Die Autoradiographien der Northern-Blots von Abb.19 und 25 (6 Std. ConA + CHI) wurden mit dem Densitometer vermessen und die maximale c-myc mRNA-Konzentration 6 Std nach ConA-Stimulation als 100% Wert genommen. Die verschiedenen Kurven sind : c-myc mRNA nach ConA-Stimulation in Medium 5% FCS (●-●), ConA + CHI (○-○), Medium 5% FCS alleine (▲-▲) und Medium 5% FCS + CHI (△-△).

Lymphozyten war etwa 50fach. Medium mit 5% FCS stimulierte nur ca. 10% der maximalen Expression schon nach 1 Std. CHI bewirkte in diesem Falle eine Erhöhung der c-myc mRNA-Konzentration auf ca. 50% der maximalen Expression (Abb.20).

Da in nicht stimulierten Lymphozyten die Behandlung mit CHI nicht zu einer erhöhten Expression von c-myc mRNA führte (Abb.19(B)Spur 9), zu allen späteren Zeiten aber die c-myc Expression durch CHI superinduziert wurde, weisen diese Daten darauf hin, daß die Expression der c-myc mRNA zunächst einer Transkriptionskontrolle unterliegt, zu späteren Zeitpunkten dann aber post-transkriptionell reguliert ist.

Ein anderes Ergebnis lieferte die Untersuchung der c-fos Expression : Der Vergleich der c-fos Expression in ConA-stimulierten und nur mit Medium mit 5% FCS behandelten Lymphozyten zeigte in beiden Fällen dieselbe Kinetik und Stärke des c-fos Signals (Abb.21(A)(B)). Die c-fos Expression wurde also von Medium mit 5% FCS stimuliert, obwohl dies nicht zur Proliferation der Lymphozyten führte (Abb.8). Das Signal der c-fos mRNA erreichte in proliferierenden und nicht-proliferierenden Lymphozyten 1 Std. nach Aufnahme der Zellen in Medium mit 5% FCS sein Maximum und wurde danach rasch wieder abwärtsreguliert.

Auch CHI war nicht in der Lage die mRNA-Konzentration zu späteren Zeitpunkten nach Stimulation zu erhöhen (Abb.21(A) Spur 15 und (B)Spur 12), wenn auch die Expression um einige Stunden verlängert war. Daß CHI zu späteren Zeitpunkten

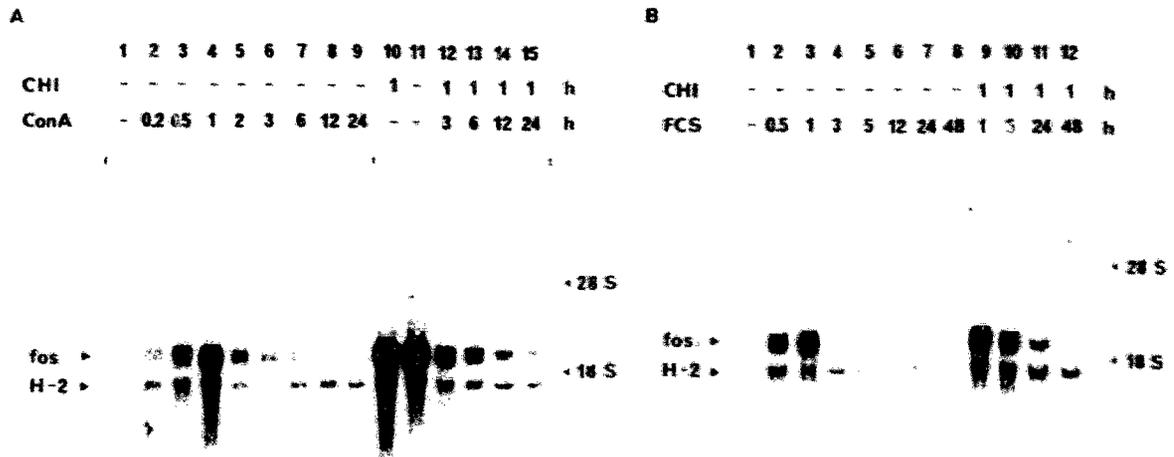


Abb.21: Northern-Blot stimulierter Lymphozyten <sup>+</sup> CHI

Gesamt Milzzellen wurden stimuliert mit 2,5 µg/ml ConA in Medium 5% FCS (A) oder Medium 5% FCS alleine (B). Teilweise wurden die Zellen für jeweils 1 Std. vor dem Ernten mit 10 µg/ml CHI behandelt ((A)Spur 10, 12 bis 15, (B)Spur 9 bis 12). RNA wurde präpariert, Northern-Blots angefertigt und hybridisiert mit spezifischen Proben für c-fos (pfos(M)780) und H-2 (pH-2<sup>d</sup>1). Die RNA in (A)Spur 10 stammt aus 1 Std. CHI behandelten Zellen in Medium ohne FCS.

nach Stimulation nicht mehr zu einer Expression von c-fos mRNA führte, kann nach bisherigen Vorstellungen nur mit einer Transkriptionskontrolle, d.h. mit dem Abschalten der Transkription von c-fos erklärt werden. Hätte die Kontrolle zu diesem Zeitpunkt auf post-transkriptioneller Ebene stattgefunden, müßte CHI zu einer Stabilisierung der c-fos mRNA und damit zu einem starken Signal im Northern-Blot geführt haben, was von mir nicht gefunden wurde.

Anders als c-myc, wurde c-fos mRNA auch durch CHI alleine in serumfreiem Medium maximal induziert (Abb.21(A) Spur 10) (vgl. c-myc Abb.19(B) Spur 9). Dies könnte durch den Zerfall eines labilen Repressors hervorgerufen worden sein, oder dadurch, daß schon in nicht-aktivierten Lymphozyten die Transkription angeschaltet war, während die mRNA-Konzentration post-transkriptionell herunterreguliert war. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde später eine Nuklease S1-Kartierung (3.2.4.) und ein Transkriptionstest (3.2.5.) durchgeführt.

Die c-Ha-ras Expression wurde durch CHI nur wenig beeinflusst (Abb.22(A)(B)). In nicht-proliferierenden Lymphozyten (Abb.22(B)) wurde c-Ha-ras gleichbleibend nur sehr schwach exprimiert, dagegen führte ConA-Stimulation und Proliferation zu der schon vorher gezeigten Erhöhung der c-Ha-ras Expression (Abb.22(A) und Abb.9(C)).

Auf die mRNA-Konzentration anderer Gene, wie z.B. H-2, hatte

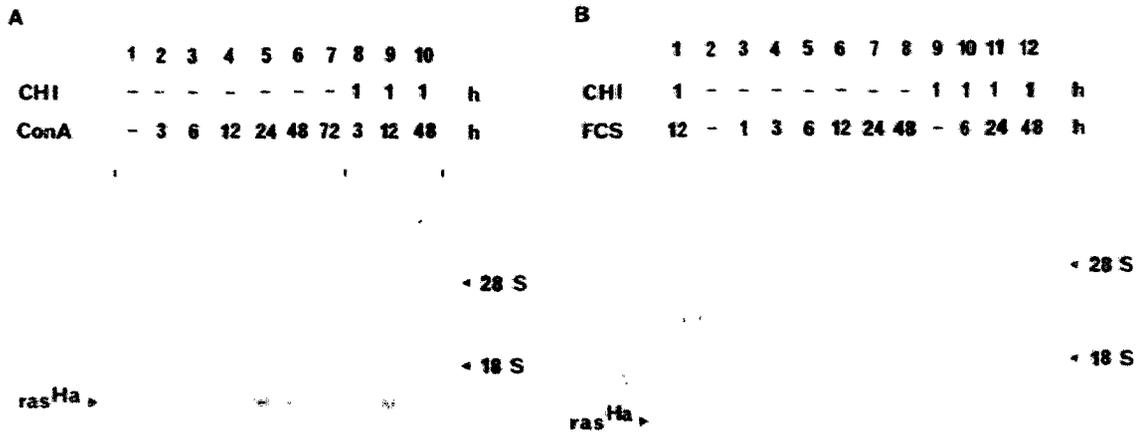


Abb.22: Northern-Blot stimulierter Lymphozyten <sup>+</sup> CHI

Die gleiche RNA wie in Abb.19 und 21 wurde auf Nitrozellulose-Filter übertragen und mit einer <sup>32</sup>P-markierten Probe spezifisch für c-Ha-ras (1,3 kb KpnI/PstI Fragment von pH1) hybridisiert. Die RNA in (A)Spur 9 ist die gleiche wie in (B)Spur 1.

CHI keine Wirkung. So blieb das Signal für die H-2 mRNA (Abb.21(A)(B)) als Kontrolle mit und ohne CHI gleich. Die Vermutung liegt nahe, daß CHI nur bei solchen mRNA-Molekülen zu einem erhöhten Niveau führt, die eine sehr kurze Halbwertszeit haben.

### 3.2.2. Halbwertszeit von c-fos und c-myc mRNA in Lymphozyten

Wie von Ch.Dani (1984)<sup>(99)</sup> und M.Piechaczyk (1985)<sup>(101)</sup> gezeigt wurde, bewirkt CHI eine Stabilisierung der c-myc mRNA und eine damit verbundene Verlängerung der Halbwertszeit von ca. 10 Min. auf ca. 6 Std. in HeLa-Zellen<sup>(99)</sup>. Kürzlich konnte C.B.Thompson<sup>(141)</sup> ähnliche Ergebnisse für die c-myb mRNA beschreiben. Die Stabilisierung der mRNA durch CHI war aber nicht in allen bis jetzt untersuchten Zellen gleich. So hatte CHI auf die c-myc mRNA in Daudi-Zellen keinen Effekt<sup>(99)</sup>.

Wie sich CHI auf die Halbwertszeit von c-fos, c-myc, c-Ha-ras und H-2 mRNA bei stimulierten Lymphozyten auswirkt, und ob die Halbwertszeiten dieser mRNA's im Verlaufe der Aktivierung einer Regulation unterworfen sind, habe ich in den folgenden Experimenten untersucht.

Lymphozyten aus Mausmilzen wurden mit ConA stimuliert, ein Teil 30 Min. vor Actinomycin D (ActD)-Zugabe mit CHI versetzt

und dann die Transkription mit ActD gehemmt. Nach einer Anlaufzeit von 5 bis 10 Min. wurde die gesamte Transkription der Zellen durch Interkalation von ActD in die DNA gehemmt und die vorhandene mRNA mit einer jeweils spezifischen Geschwindigkeit abgebaut.

Die Halbwertszeit der c-fos mRNA betrug nach 1 Std. ConA-Stimulation ca. 25 Min., nach 2 Std. ConA-Stimulation ca. 70 Min. (Abb.23 und 24). CHI verlängerte die Halbwertszeit auf ca. 8 Std. sowohl 1 Std. als auch 2 Std. nach Stimulation mit ConA.

Zwei Ergebnisse wurden deutlich : a. CHI erhöhte die c-fos mRNA-Stabilität und entsprechende mRNA-Halbwertszeiten unphysiologisch von 25 und 70 Min. auf ca. 8 Std. und b. die natürliche Halbwertszeit blieb nach Stimulation nicht gleich, d.h. daß die Regulation der Genexpression auch über eine Verkürzung oder Verlängerung der Halbwertszeit stattfinden kann.

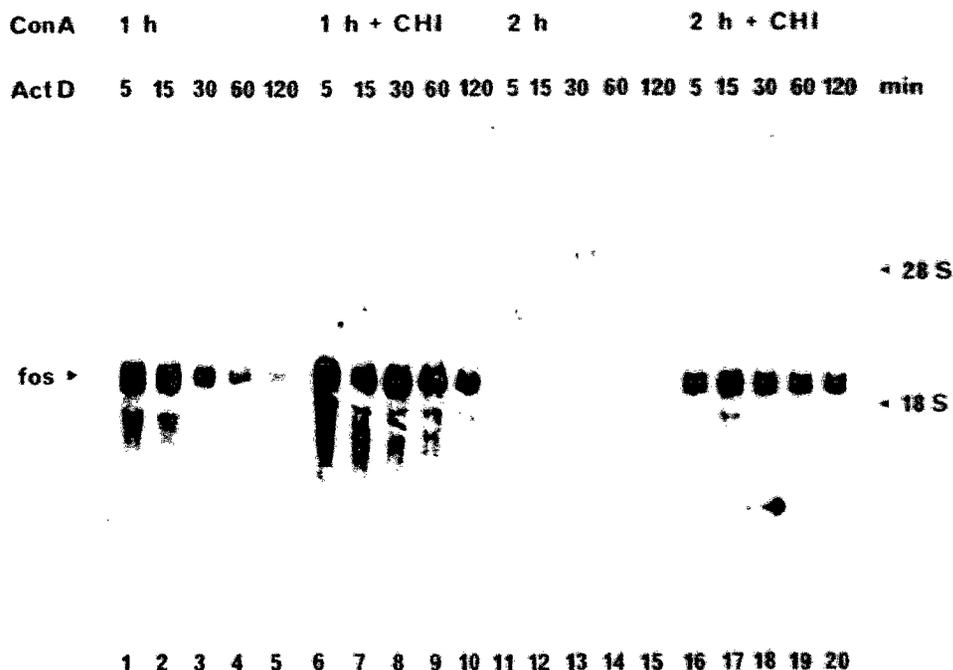


Abb.23: Northern-Blot ActD-behandelter Lymphozyten

Lymphozyten aus Mausmilzen wurden 1 Std. (Spur 1 bis 10) und 2 Std. (Spur 11 bis 20) mit 2,5 µg/ml ConA stimuliert. Bei einem Teil der Zellen wurde 30 Min. vor der Hemmung der Transkription durch ActD 20 µg/ml CHI zugegeben (Spur 6 bis 10 und 16 bis 20). Die Zellen wurden 5, 15, 30, 60 und 120 Min. nach Zugabe von 5 µg/ml ActD geerntet, RNA präpariert und ein Northern-Blot angefertigt. Der Nitrozellulose-Filter wurde mit einer <sup>32</sup>P-markierten spezifischen Probe für c-fos (pfos(M)780) hybridisiert. Quantitative Auswertung siehe Abb.24.

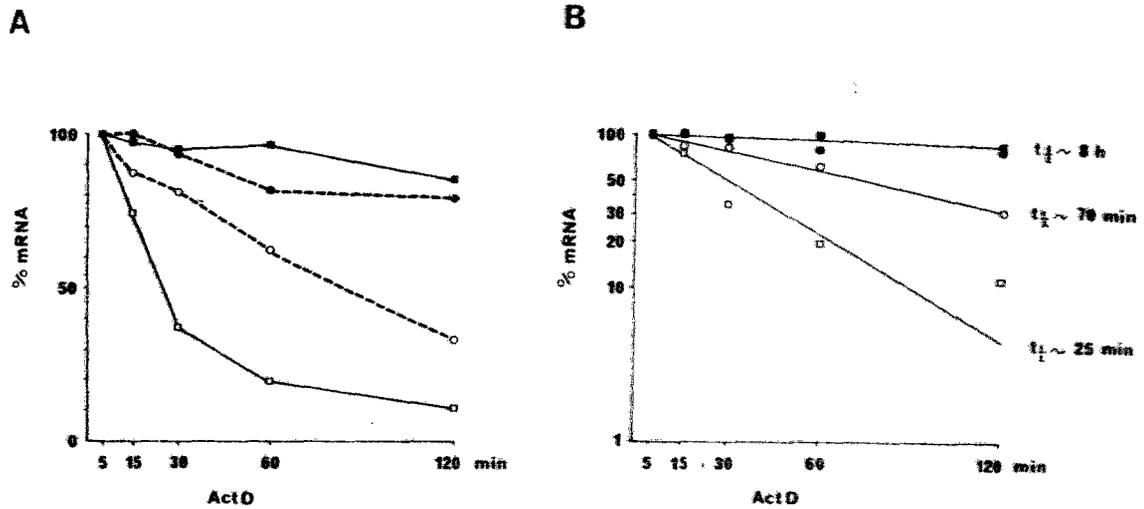


Abb.24: Halbwertszeit von c-fos mRNA

Das Autoradiogramm von Abb.23 wurde mit dem Densitometer vermessen und die jeweils maximale Absorption 5 Min. nach Zugabe von ActD als 100% genommen. (A) Den Zerfall der c-fos mRNA stellt dar : 1 Std. nach ConA-Stimulation ( $\square-\square$ ), 1 Std. ConA + CHI ( $\blacksquare-\blacksquare$ ), 2 Std. nach ConA-Stimulation ( $\circ-\circ$ ) und 2 Std. ConA + CHI ( $\bullet-\bullet$ ). Aus der logarithmischen Auftragung (B) ergeben sich die Halbwertszeiten von ca. 25 Min. für 1 Std. ConA ( $\square-\square$ ), ca. 70 Min. für 2 Std. ConA ( $\circ-\circ$ ) und ca. 8 Std. für CHI-behandelte Zellen ( $\blacksquare-\blacksquare$ ) und ( $\bullet-\bullet$ ).

Für die c-myc mRNA wurden 2 Std. und 6 Std. nach ConA-Stimulation eine Halbwertszeit von ca. 50 Min. gemessen, die nach 48 Std. ConA-Stimulation auf ca. 12 Min. abgesunken war. (Abb.25 und 26). Zugabe von CHI verlängerte die Halbwertszeit bei 6 und 48 Std. ConA-Stimulation gleichermaßen auf etwa 8 Std., unabhängig also von der Menge und Halbwertszeit von c-myc mRNA in nicht CHI-behandelten Zellen.

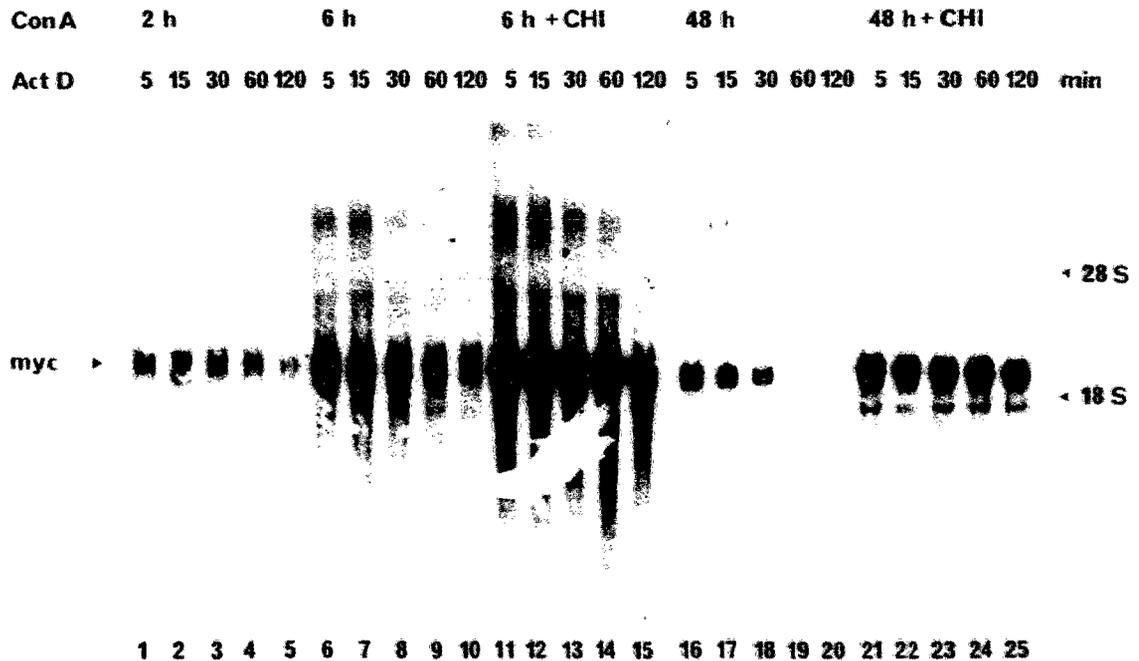


Abb.25: Northern-Blot ActD-behandelter Lymphozyten

Lymphozyten aus Mausmilzen wurden 2 Std. (Spur 1 bis 5), 6 Std. (Spur 6 bis 15) und 48 Std. (Spur 16 bis 25) mit ConA (2,5 µg/ml) stimuliert. Bei einem Teil der Zellen wurde 30 Min. vor Hemmung der Transkription durch ActD 20 µg/ml CHI zugegeben (Spur 11 bis 15 und 21 bis 25). Die Zellen wurden 5, 15, 30, 60 und 120 Min. nach Zugabe von 5 µg/ml ActD geerntet, RNA präpariert und ein Northern-Blot angefertigt. Die Hybond N-Filter wurden mit einer <sup>32</sup>P-markierten spezifischen Probe für c-myc (pmyc(M)E2) hybridisiert. Quantitative Auswertung siehe Abb.26.

Die Tatsache, daß die Halbwertszeit der c-myc mRNA, unabhängig von der Konzentration an mRNA, in der frühen Phase der Stimulation (2 und 6 Std. ConA) relativ lang war (ca. 50 Min.) und bei späteren Werten (48 Std. ConA) sehr kurz wurde (ca. 12 Min.), spricht für die Induktion einer c-myc mRNA abbauenden Aktivität.

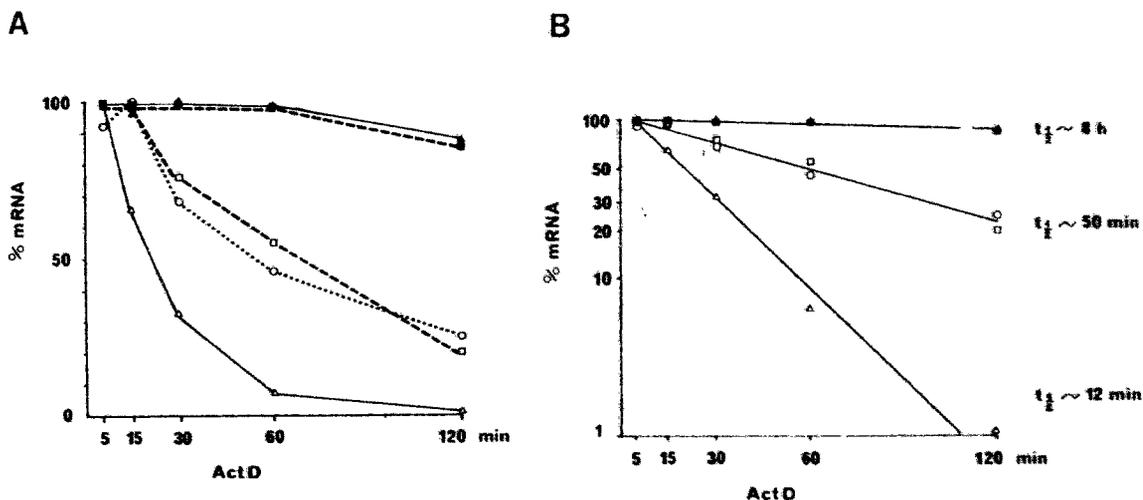


Abb.26: Halbwertszeit von c-myc mRNA

Das Autoradiogramm in Abb.25 wurde mit dem Densitometer vermessen und die jeweils maximale Absorption 5 Min. nach Zugabe von ActD als 100% genommen. (A) Den Zerfall der c-myc mRNA stellt dar : 2 Std. nach ConA-Stimulation (○-○), 6 Std. nach ConA-Stimulation (□-□), 6 Std. ConA + CHI (■-■), 48 Std. nach ConA-Stimulation (△-△) und 48 Std. ConA + CHI (▲-▲). (B) Aus der logarithmischen Auftragung ergeben sich die Halbwertszeiten von ca. 50 Min. für 2 und 6 Std. ConA-Stimulation (○-○) und (□-□), ca. 12 Min. für 48 Std. ConA-Stimulation (△-△) und ca. 8 Std. für die CHI-behandelten Zellen (■-■) und (▲-▲).

Die Veränderung der Halbwertszeit erfolgte bei der c-fos und c-myc mRNA nach Stimulation mit ConA entgegengesetzt : bei der c-fos mRNA ansteigend von 25 auf 70 Min., bei der c-myc mRNA von 50 auf 12 Min. abfallend.

Die Halbwertszeit anderer, langlebiger mRNA-Moleküle wurde im Gegensatz zu der von c-myc und c-fos mRNA nicht von CHI beeinflusst. Das Signal für c-Ha-ras (Abb.27) wurde durch CHI zwar leicht verstärkt, ein Effekt auf die Halbwertszeit war aber nicht zu erkennen. Während der 2 Std. ActD-Behandlung war keine Abnahme der ohnehin geringen c-Ha-ras mRNA-Konzentration zu erkennen.

Bei der mRNA-Konzentration von H-2 war mit und ohne CHI keine Veränderung meßbar (Abb.28). Die natürlichen Halbwertszeiten von c-Ha-ras und H-2 mRNA schienen eher in der Größenordnung von Tagen als von Stunden zu liegen. Auf die Konzentration und Halbwertszeit dieser langlebigen mRNA-Moleküle hatte CHI keinen Einfluß.

Die post-transkriptionelle Regulation der mRNA-Konzentration in der Zelle über den Abbau war also spezifisch für die mRNA ganz bestimmter Gene und erfolgte unabhängig voneinander.

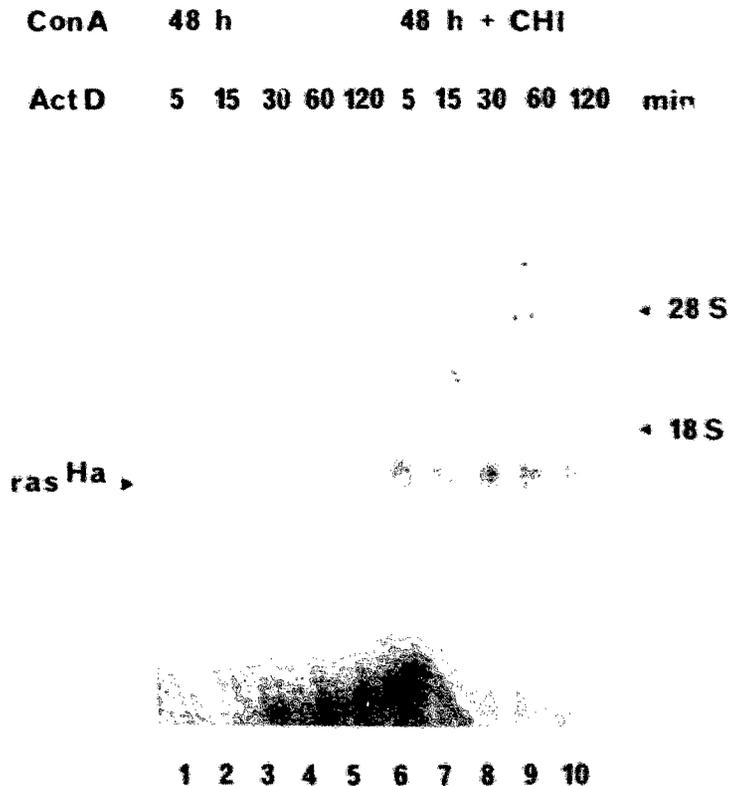


Abb.27: Northern-Blot ActD-behandelter Lymphozyten

Die gleiche RNA wie in Abb.25 Spur 16 bis 25 wurde auf einen Hybond N-Filter übertragen und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten c-Ha-ras spezifischen Probe (1,3 kb KpnI/PstI Fragment von pH1) hybridisiert. Die mRNA von c-Ha-ras nahm in den 2 Std. nach Hemmung der Transkription durch ActD nicht merklich ab. CHI bewirkte eine geringe Verstärkung des Signals der c-Ha-ras mRNA.

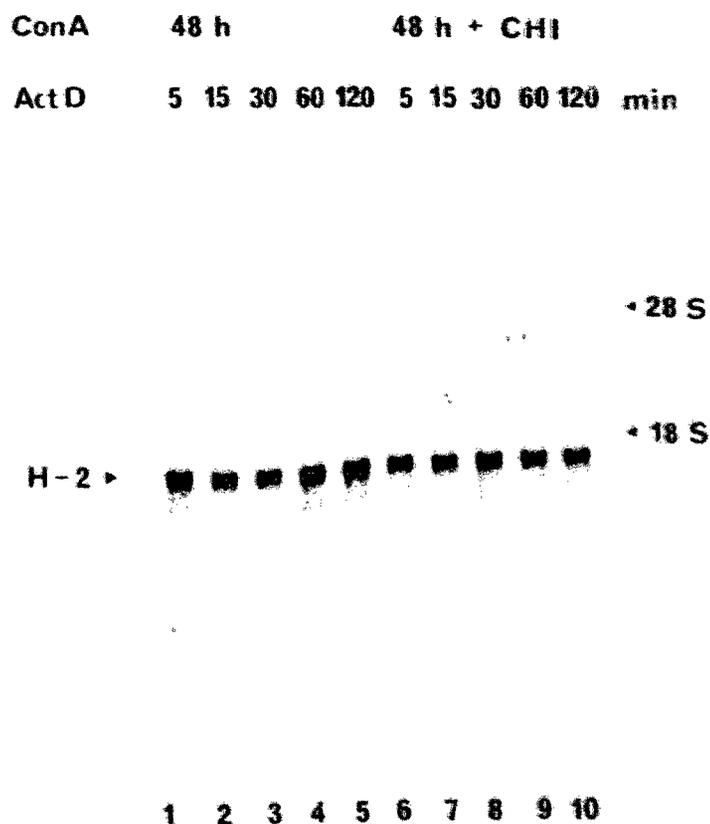


Abb.28: Northern-Blot ActD-behandelter Lymphozyten

Die gleiche RNA wie in Abb.25 Spur 16 bis 25 wurde auf einen Hybond N-Filter übertragen und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten H-2 spezifischen Probe ( $\text{pH-2}^{\text{d1}}$ ) hybridisiert. Die mRNA-Konzentration von H-2 nahm in den 2 Std.nach Inhibition der Transkription durch ActD nicht meßbar ab. CHI hatte keinen Effekt auf die mRNA-Konzentration von H-2.

### 3.1.3. Halbwertszeit von c-myc mRNA in Tumorzellen

Als Vergleich zu der mRNA-Stabilität in normalen Lymphozyten wurden auch bei fünf Tumorzelllinien Experimente zur Bestimmung der Halbwertszeit durchgeführt. Da die c-myc Expression in logarithmisch wachsenden Zelllinien, wie für Embryo-Fibroblasten gezeigt wurde<sup>(142)(143)</sup>, invariant bleibt, können die gemessenen Halbwertszeiten direkt verglichen werden mit denen der stimulierten Lymphozyten. Eine Trennung der Tumorzellen nach Zellzyklusphase bzw. eine Synchronisation war also nicht notwendig.

Die Zelllinien MCA, SAC<sup>-</sup>, SCH, BDVII und HDII (vgl. Tabelle 1) hatten alle eine Halbwertszeit der c-myc mRNA von ca. 1 Std. (Abb.29 und 30). CHI bewirkte nur eine schwache Superinduktion von c-myc mRNA bei den SAC<sup>-</sup>- und SCH-Zellen. Extrem kurze oder lange Halbwertszeiten konnten nicht gefunden werden.

Die Halbwertszeiten von ca. 1 Std. entsprachen der c-myc Halbwertszeit in stimulierten Lymphozyten bei maximaler Expression (6 Std. nach ConA-Stimulation, ca. 50 Min). Möglicherweise ist bei diesen Tumorzellen ein Defekt im c-myc mRNA-Abbau verantwortlich für die Überexpression des c-myc Gens und damit auch beteiligt an dem transformierten Zustand der Zellen.

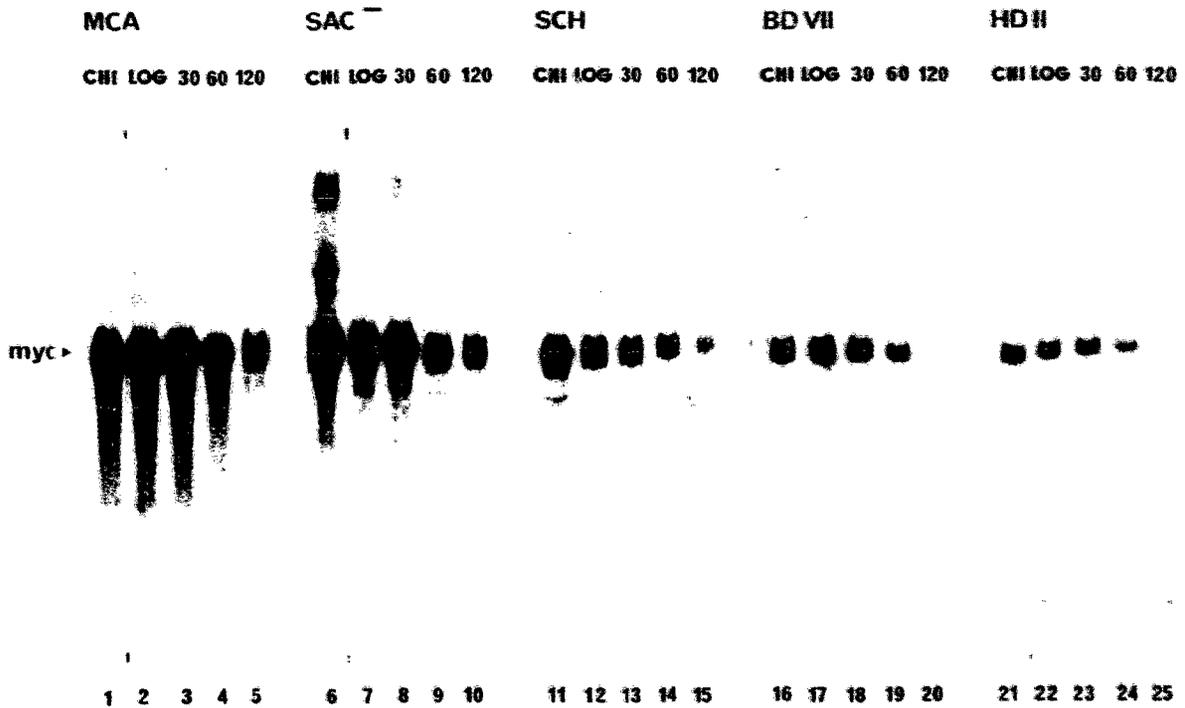


Abb.29: Northern-Blot ActD-behandelter Tumorzellen

Die Tumorzelllinien MCA, SAC<sup>-</sup>, SCH, BDVII und HDII (vgl. Tabelle 1) wurden teilweise für 30 Min. mit 20 µg/ml CHI behandelt (Spur 1, 6, 11, 16, 21), ein Teil als logarithmisch wachsende Zellen geerntet (Spur 2, 7, 12, 17, 22) und teilweise die Transkription durch Zugabe von 5 µg/ml ActD für 30, 60 und 120 Min. gehemmt. RNA wurde präpariert, Northern-Blots angefertigt und mit einer <sup>32</sup>P-markierten Probe spezifisch für c-myc (pmyc(M)E2) hybridisiert. Die Quantitative Auswertung ist in Abb.30 dargestellt.

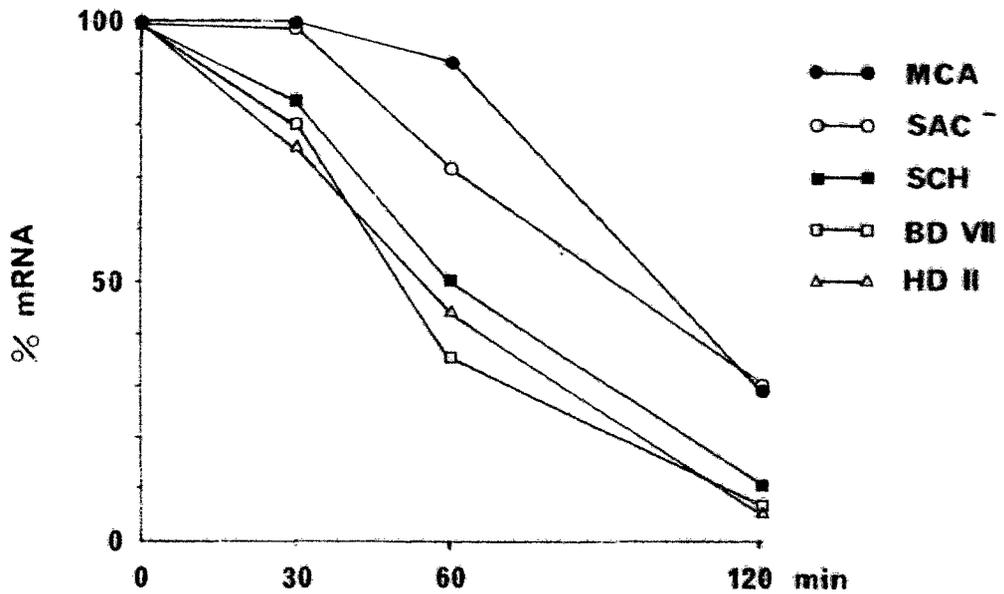


Abb.30: Halbwertszeit von c-myc mRNA in Tumorzellen

Das Autoradiogramm in Abb.29 wurde mit dem Densitometer vermessen und die Absorption der logarithmisch wachsenden Zellen als 100% genommen. Die Zellen hatten wahrscheinlich aufgrund ihrer Geometrie als Monolayer oder übereinanderwachsende Zellen verlängerte Anlaufzeiten für die Wirkung von ActD. Die Halbwertszeiten waren alle etwa 1 Std.

### 3.2.4. Analyse des preRNA zu mRNA Verhältnisses von c-fos und c-myc in Lymphozyten

Die Frage, ob die Regulation der c-fos und c-myc Expression in stimulierten Lymphozyten mehr auf transkriptioneller Ebene oder post-transkriptionell stattfindet, wurde von mir zunächst mit Hilfe der Nuklease S1-Kartierung (siehe 2.2.27.)(S1 mapping) untersucht. Die Empfindlichkeit des Tests mit den verwendeten Einzelstrang-M13-Proben war etwa zehnmal höher als mit durch Nick-Translation markierten Doppelstrang-DNA-Proben, sodaß ein Signal für die noch nicht gespleißte Vorläufer-RNA (precursor mRNA)(preRNA) der c-fos und c-myc Gene sichtbar gemacht werden konnte.

Aus den Genen von c-fos und c-myc wurde jeweils ein Stück DNA mit Restriktionsenzymen so herausgeschnitten, daß es teilweise Sequenzen aus einem Intron und einem Exon enthielt und in M13mp18-Phagen kloniert (siehe 2.1.7. und Abb.31(A) und Abb.32(A)). Die preRNA ergab nach der Nuklease S1-Behandlung das jeweils größere Signal. Nach Entfernung der Intron-Sequenzen durch Spleißen<sup>(144-146)</sup>, ergab die reife mRNA das kleinere Signal. Die Prozessierung der preRNA zur mRNA erfolgt innerhalb weniger Minuten, sodaß nur eine geringe Konzentration von preRNA im Gleichgewichtszustand im Zellkern enthalten ist. Bei konstanter Prozessierungsgeschwindigkeit reflektiert ein verstärktes Signal der preRNA eine Erhöhung der Transkriptionsrate.

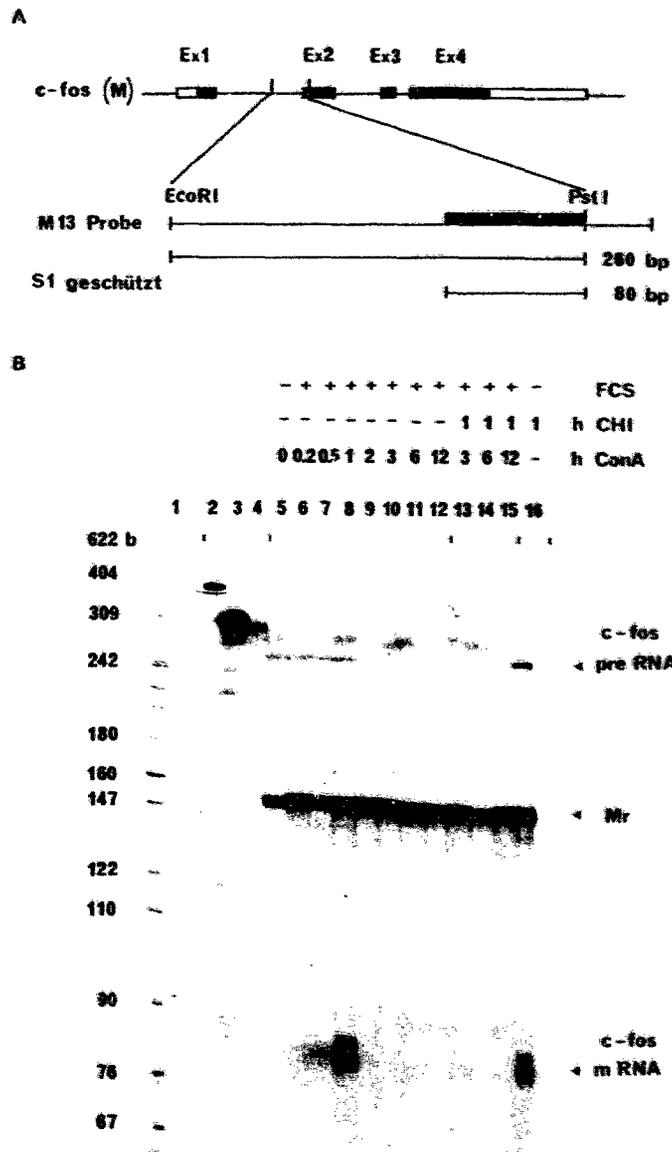


Abb.31: S1-Kartierung stimulierter Lymphozyten

- (A) Das 260 bp EcoRI/PstI Fragment des 1. Introns und 2. Exons des c-fos Gens der Maus wurde in M13mp18 kloniert. Mit Hilfe des 15 b Sequenzierprimers und Klenow-Polimerase wurde die  $^{32}\text{P}$ -markierte ssDNA-Probe komplementär zur c-fos mRNA synthetisiert. Nuklease S1-geschützte Bereiche gaben eine Bande bei 260 b für die preRNA und 80 b für die mRNA.
- (B) Je 12 µg totale RNA aus ConA-stimulierten Lymphozyten wurden mit zwei M13-Proben (Spur 2 und 3) hybridisiert und das S1 mapping durchgeführt. Die

Probe aus Spur 2 war spezifisch für ribosomale RNA der Maus (M13mp9MrWt, siehe 2.1.7.) und ergab ein Signal bei 155 b (Mr). Diese Probe wurde als Kontrolle für die Menge RNA im jeweiligen Ansatz verwendet. Spur 3 enthält die c-fos spezifische Probe vor und Spur 4 nach Behandlung mit Nuklease S1. Die Signale für die preRNA bei 260 b (unterhalb der unverdauten restlichen Probe) sind in den Spuren 5 bis 8 und 16 zu sehen. Die Signale für die mRNA sind in den Spuren 7, 8 und 16 sichtbar. Der Marker (Spur 1) war pBR322 verdaut mit HpaII und endmarkiert mit <sup>32</sup>P-dCTP und Klenow-Polymerase.

Für die preRNA des c-fos Gens war schon in nicht-aktivierten Zellen ein Signal zu sehen, das auch bei maximaler mRNA-Expression 1 Std. nach ConA-Stimulation nicht stärker wurde (Abb.31(B)Spur 5 bis 8). Bei den mit CHI alleine behandelten Lymphozyten war dieses Signal etwas deutlicher zu sehen (Abb.31(B)Spur 16). Ab 2 Std. nach der Aktivierung der Zellen war auch nach CHI-Behandlung kein Signal mehr für die c-fos preRNA erkennbar.

Das bedeutet, daß das c-fos Gen schon in nicht-aktivierten Zellen transkribiert wurde, die mRNA aber post-transkriptionell abgebaut war. Nach Aktivierung der Zellen wurde die post-transkriptionelle Regulation aufgehoben und das Signal für die mRNA erschien. Danach wurde die Transkription des c-fos Gens abgeschaltet. Dies erklärte auch, warum schon in nicht-aktivierten Lymphozyten nach CHI-Behandlung ein Signal für die mRNA zu sehen war (vgl. Abb.21(A)Spur 10).

In nicht-aktivierten Lymphozyten war bei der Nuklease S1-Kartierung mit einer c-myc spezifischen M13-Probe noch kein Signal der c-myc preRNA zu sehen (Abb.32(B)Spur 4). Nach 3 Std erschien die Bande bei 165 b. Die Expression erreichte ihr Maximum 6 Std.nach ConA-Stimulation zusammen mit der mRNA bei 132 b (Abb.32(B)Spur 6 und 7). Ab 12 Std.nach ConA-Stimulation nahm das Signal für preRNA und mRNA in gleichem Maße ab.

Durch CHI wurde das Signal für die preRNA nicht verstärkt (vgl. Abb.32(B)Spur 5 mit 11, 6 mit 12, 8 mit 13, 10 mit 14). Dagegen akkumulierte die mRNA nach CHI-Behandlung und ergab auch noch 72 Std.nach ConA-Stimulation ein starkes Signal (vgl. Abb.32(B)Spur 10 mit 14).

Im Falle der c-myc mRNA-Expression wurde nach Stimulation also zunächst die Transkription angeschaltet und maximale Transkription nach 6 Std erreicht. Später blieb die Transkription auf einem niedrigen Niveau für längere Zeit erhalten. Die mRNA-Konzentration wurde dann post-transkriptionell abwärtsreguliert und konnte durch CHI-Behandlung erhöht werden.



hybridisiert und das S1-mapping durchgeführt. Die Signale der precursor mRNA bei 165 b zeigten ein Maximum 6 und 12 Std. nach ConA-Stimulation (Spur 6 und 7), das durch Zugabe von CHI nicht verstärkt wurde (Spur 12). CHI verstärkte nur das Signal der mRNA (Spur 11 bis 14). CHI in serumfreiem Medium (Spur 15) führte zu einem schwachen Signal der preRNA und mRNA. Der Marker (Spur 1) war pBR322 verdaut mit HpaII und endmarkiert mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP und Klenow-Polymerase.

### 3.2.5. Transkriptionsrate von c-fos und c-myc

Die tatsächliche Transkriptionsrate von c-fos und c-myc wurde in einem Transkriptionstest (nuclear run-on assay) gemessen. Dazu wurden aus Lymphozyten in verschiedenen Aktivierungszuständen intakte Zellkerne isoliert und in vitro mit  $^{32}\text{P}$ -rUTP von der Polymerase II elongierte RNA radioaktiv markiert (siehe 2.2.28.). Die radioaktive RNA wurde dann mit spezifischen DNA-Fragmenten auf Hybond N-Filtern hybridisiert.

Die Signalstärke entspricht der Transkriptionsrate der Gene in den Zellkernen während der Zellernte (Abb.33(A)). Die quantitative Auswertung (Abb.33(B)) ergab für c-fos eine gleichbleibende Transkriptionsrate in nicht-aktivierten (Abb.33(B)Spur 1), 1 Std. ConA-stimulierten (Abb.33(B) Spur 2) und 1 Std. CHI behandelten Lymphozyten (Abb.33(B) Spur 3). 5 Std. und 48 Std. nach ConA-Stimulation war mit und ohne CHI kein Signal für die c-fos Transkription mehr nachzuweisen (Abb.33(B)Spur 4 bis 7).

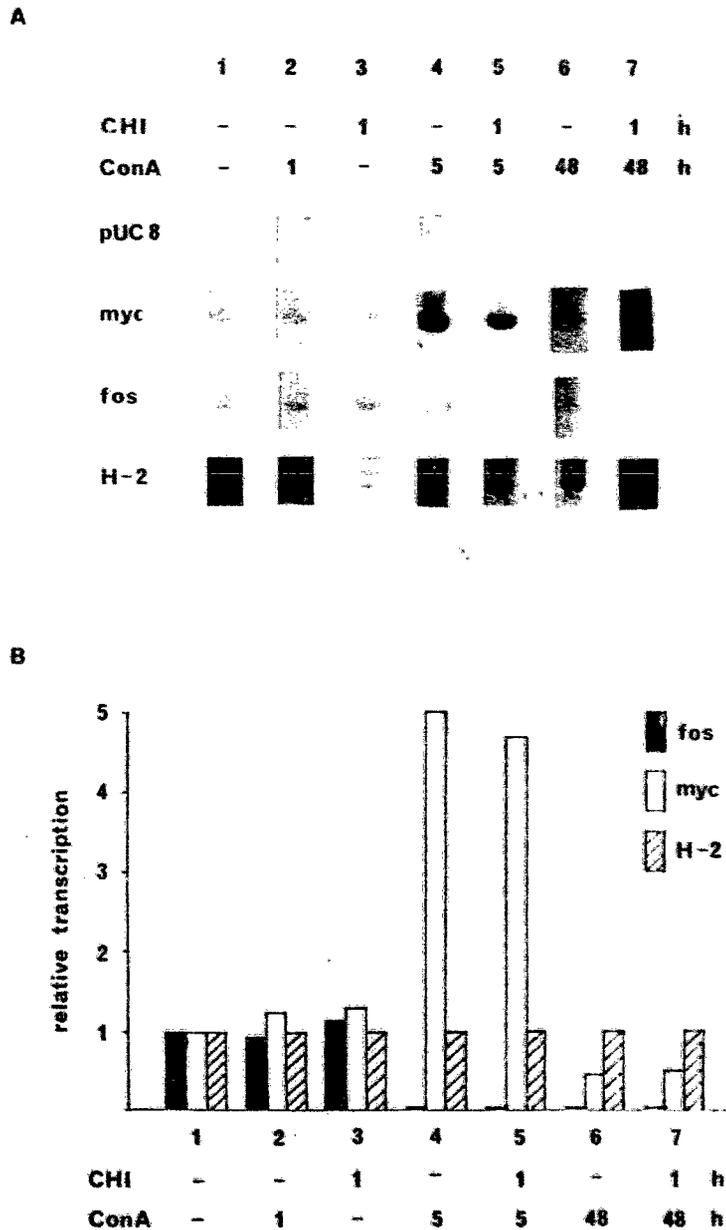


Abb.33: Transkriptionstest stimulierter Lymphozyten

Aus verschiedenen vorbehandelten Lymphozyten wurden die Zellkerne isoliert und in vitro synthetisierte RNA mit  $^{32}\text{P}$ -rUTP (410 Ci/mmol) bei 26 °C für 30 Min. markiert.

(A) Die radioaktiv markierte RNA wurde hybridisiert auf Hybond N-Filter, auf die spezifische DNA-Fragmente für c-myc (1,0 kb XbaI/SstI), c-fos (0,8 kb PstI/SstI), H-2 (pH-2<sup>d</sup>) und pUC8 mit der Southern-Blot

Technik übertragen worden waren. Die Signalstärke entsprach der Transkriptionsrate der Gene während der Zellernte.

(B) Das Autoradiogramm in (A) wurde mit dem Densitometer vermessen und die Signalstärken in Relation zu den Signalen für H-2 (=1) gesetzt. Die Auswertung ergab für c-fos eine gleichbleibende Transkriptionsrate bei nicht-aktivierten (Spur 1), 1 Std. ConA-stimulierten (Spur 2) und 1 Std. CHI-behandelten Lymphozyten (Spur 3). Die Transkriptionsrate von c-myc stieg 5 Std. nach ConA-Stimulation auf das 5fache an (Spur 4 und 5) und war 48 Std. nach ConA-Stimulation wieder gering (Spur 6 und 7). CHI hatte keine Wirkung auf die Transkriptionsraten von c-fos und c-myc (Spur 3, 5 und 7). Die Werte der Transkriptionsrate von c-myc 48 Std. nach ConA-Stimulation waren unterrepräsentiert, da auch die Transkriptionsrate von H-2 stimuliert wurde.

Für die c-fos Transkriptionsrate konnte 1 Std. nach Stimulation, wenn die mRNA-Konzentration am höchsten war, kein Anstieg gemessen werden. Ein vorübergehender Anstieg bei z.B. 30 Min. nach Stimulation wäre von diesem Experiment nicht erfaßt worden, doch sprachen die Ergebnisse der S1-Kartierung (vgl. Abb. 31(B)) auch gegen eine Erhöhung der Transkriptionsrate von c-fos, da die pre-mRNA-Konzentration ebenfalls gleich blieb. Die Regulation der Expression auf Transkriptionsebene bestand also für c-fos im Abschalten der Transkription nach maximaler mRNA-Expression.

Die Transkriptionsrate von c-myc wurde 5 Std. nach ConA-Stimulation auf das 5fache des Wertes in nicht-aktivierten

Lymphozyten erhöht und hatte 48 Std. nach ConA-Stimulation wieder ein niedriges Niveau erreicht (Abb.33(B)Spur 4 und 6). CHI hatte keinen Einfluß auf die Transkriptionsrate von c-myc (Abb.33(B)Spur 3, 5 und 7).

Die Regulation der c-myc mRNA-Expression fand also auch auf transkriptioneller Ebene statt.

Zwei Ergebnisse sollten festgehalten werden :

1. Die Regulation der mRNA-Konzentration von c-fos und c-myc fand sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene statt.
2. Die Regulation der mRNA-Konzentration von c-fos und c-myc war spezifisch und verschieden für beide Gene: Während die c-fos mRNA-Konzentration zunächst post-transkriptionell abwärtsreguliert war und nach maximaler Expression dann die Transkription abgeschaltet wurde, stieg im Falle von c-myc die Transkriptionsrate erst auf das Fünffache an, kehrte dann auf ein niedriges Niveau zurück und es setzte eine starke post-transkriptionelle Kontrolle ein.

### 3.2.6. Regulation durch komplementäre RNA

Diese Möglichkeit der Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene wurde für *Escherichia coli* von T. Mizuno<sup>(147)</sup> und für Eukaryonten von I.G. Izant und H. Weintraub<sup>(148)</sup> beschrieben. Danach führt ein zur mRNA komplementäres RNA-Molekül (anti-sense RNA) zur Bildung eines RNA-Doppelstranges, der von den Ribosomen nicht translatiert wird. Obwohl dsRNA auch allgemein die Bindung von mRNA an die Ribosomen herabsetzt<sup>(149)</sup>, kann auf diese Weise spezifisch für ein bestimmtes Gen die Translation gehemmt werden<sup>(150)(151)</sup>. In eukaryontischen Zellen wurde bisher eine Hemmung der Thymidin-Kinase-Aktivität, des Actins und der  $\beta$ -Galaktosidase<sup>(152)(153)</sup> durch künstlich eingeführte Plasmide, die große Mengen an anti-sense RNA hervorbringen, beschrieben. In *Drosophila* entwickelten sich nach Injektion von spezifischer anti-sense RNA in Embryonen die entsprechenden Krüppel-Mutanten<sup>(154)</sup>. Ein Modell für die Regulation durch anti-sense RNA wurde von McCarrey und Riggs beschrieben<sup>(155)</sup>.

Eine natürlich vorkommende komplementäre RNA in Eukaryonten wurde für das Dihydrofolet-Reduktase-Gen der Maus<sup>(156)</sup> und für das 1. Intron des alpha-Föto-Proteins, kodiert von einer Alu-Sequenz, gefunden<sup>(157)</sup>. Alu-Sequenzen mit anti-sense Orientierung wurden innerhalb verschiedener Gene von Maus<sup>(158)(159)</sup> und Mensch<sup>(160)(161)</sup>, unter anderem auch im c-myc Gen<sup>(109)</sup>, identifiziert.

Eigene Versuche, durch S1-mapping mit verschiedenen ssDNA-Proben spezifisch für den Gegenstrang von c-fos und c-myc mRNA (siehe 2.1.7.), eine natürlich vorkommende komplementäre RNA zu diesen Genen in stimulierten Lymphozyten nachzuweisen, führten bisher nicht zu einem positiven Ergebnis.

Alternativ dazu hatte ich Plasmide in 3T6- und L-Zellen durch Transfektion (siehe 2.2.29.) eingeführt, die antisense myc transkribierten. Dafür wurden verschiedene Konstrukte mit SV40- und Metallothionin (MT)-Promotoren kloniert (siehe 2.1.8.).

Transfektion von pSVmyc(M)E2, ein Plasmid, von dem ein 1,5kb langes RNA-Molekül komplementär zum Beginn des translatierten Bereiches von c-myc transkribiert wird, zusammen mit pSV2neo, zur Selektion resistenter Zellklone, in 3T6-Zellen brachte zwar stabil transformierte Klone, die beide Plasmide enthielten, eine Wirkung auf das Zellwachstum konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Transfektion von pMTmyc(M)E2 zusammen mit pSV2neo in Meus-L-Zellen führte zu einem stabil transformierten Klon, der nach Stimulation des MT-Promotors mit  $Zn^{++}$  oder  $Cd^{++}$  antisense RNA transkribierte (Abb.34). Anhand dieses Zellklons und ähnlichen anderen soll in Zukunft die Wirkung von antisense RNA auf die Halbwertszeit der entsprechenden mRNA und das Wachstum des Zellklons untersucht werden.

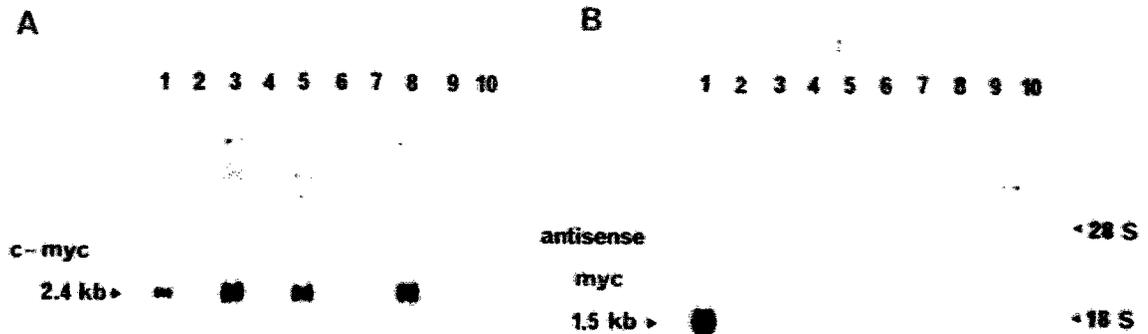


Abb.34: Northern-Blot transfizierter L-Zellklone

$1 \times 10^6$  L-Zellen wurden mit 5  $\mu\text{g}$  pMTamyc(M)E2 und 0,5  $\mu\text{g}$  pSV2neo mit der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert und mit 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 selektiert. 10 Klone wurden isoliert und mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  für 6 Std stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, RNA präpariert und 2 Northern-Blots angefertigt. Der Hybond N-Filter (A) wurde hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten ssDNA-Probe von M13mp18myc(N)E25' (siehe 2.1.7.) und ergibt das Signal der c-myc mRNA bei 2,4 kb. Der Filter (B) wurde hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten ssDNA-Probe von M13mp19myc(M)E25', eine Probe für anti-sense RNA. Nur der Zellklon in Spur 1 produzierte anti-sense myc RNA einer Länge von 1,5 kb.

#### 4. Diskussion

##### 4.1. Expression von c-Onkogenen in Lymphozyten

Ich habe in meiner Arbeit gezeigt, daß normale, aktivierte T-Lymphozyten der Maus mindestens drei zelluläre Onkogene, c-fos, c-myc und c-Ha-ras mit verschiedener Kinetik exprimieren (Abb.35). Die Kinetik und Stärke der c-myc mRNA Expression war abhängig von dem benutzten Mitogen und der T-Zell Subpopulation. ConA-aktivierte, gereinigte T-Zellen exprimierten c-myc mRNA maximal nach 3 Std., LA-aktivierte, gereinigte T-Zellen dagegen maximal erst nach 20 Std. (Abb. 13 und 15). Dabei war die c-myc Expression nach Stimulation mit LA wesentlich schwächer als nach Stimulation mit ConA. Die c-myc Expression in gereinigten  $\text{Lyt2}^+$ -T-Zellen folgte der langsameren Kinetik sowohl nach ConA + IL-2, als auch nach LA + IL-2 Stimulation. Auch bei dieser Subpopulation stimulierte ConA ein stärkeres c-myc mRNA-Signal als LA (Abb.17 und 18). Die langsamere Kinetik der c-myc Expression scheint also gebunden zu sein an die  $\text{Lyt2}^+$ -T-Zellen, da bei den gesamt T-Zellen durch LA nur diese stimuliert werden und bei den gereinigten  $\text{Lyt2}^+$ -T-Zellen sowohl ConA + IL-2, als auch LA + IL-2 die langsamere Expression bewirkten.

Vergleicht man proliferierende und nicht-proliferierende Lymphozyten, unterscheidet sich die Expression der drei zellulären Onkogene c-fos, c-myc und c-Ha-ras wieder dras-

tisch. Die Expression der c-fos mRNA war vollkommen unabhängig von der Proliferationsaktivität der Lymphozyten (Abb.21(A)(B)). Die Expression der c-Ha-ras mRNA dagegen wurde stimuliert nur bei tatsächlich proliferierenden Lymphozyten (Abb.13(b), 15(b), 17(a) und 22(A)). Schwieriger zu interpretieren sind die Daten der c-myc Expression und damit die Bedeutung für die Funktion dieses zellulären Onkogens. Bei den ConA-aktivierten und proliferierenden Milzzellen (Abb.9(B)) und gereinigten T-Zellen (Abb.13(a)), geht eine starke c-myc Expression dem Eintritt der Zellen in die S-Phase voraus. Dies wurde von K.Kelly et. al. (95) so interpretiert, daß das c-myc Genprodukt für den Übergang der Zellen von der G<sub>0</sub>-in die S-Phase benötigt würde. Meine Ergebnisse bei Lyt2<sup>+</sup>-T-Zellen und der verlangsamten c-myc Expression nach Stimulation mit LA (Abb.18) sprechen jedoch

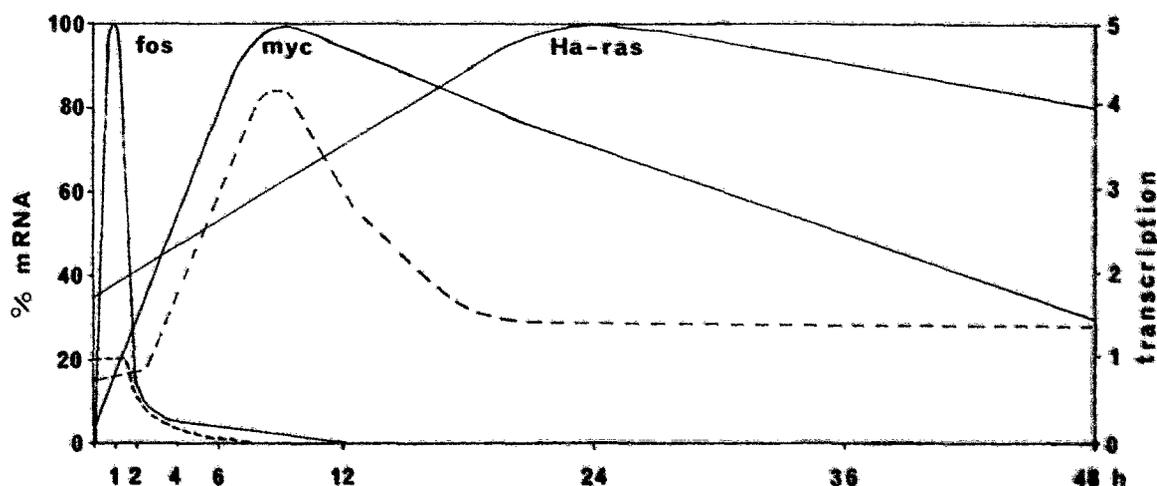


Abb.35: Schema der Expression von c-fos, c-myc und c-Ha-ras bei der Aktivierung von Lymphozyten.

Die durchgezogene Linie stellt die mRNA-Konzentration in % maximaler Expression dar. Die gestrichelte Linie stellt die Transkriptionsrate bezogen auf H-2 dar.

gegen eine solche Annahme, ebenso die Expression von c-myc in nicht-proliferierenden Lymphozyten (Abb.17(a)(ConA) und Abb.19(B)). Meine Befunde zeigen, daß

- 1.c-myc Expression nicht zur nachfolgenden Proliferation ausreicht.
- 2.Eine frühe oder späte c-myc Expressionskinetik nicht mit der Proliferationsfähigkeit korreliert.
- 3.Die Stärke der c-myc Expression nicht mit der Stärke der Proliferation korreliert.
- 4.Wenn c-myc Expression überhaupt für die Transition der Zellen von der G<sub>0</sub>-in die S-Phase notwendig ist, eine sehr geringe Expression ausreicht.

#### 4.2. Regulation über Transkriptionsrate und mRNA-Degradation

Zwei Aspekte der Onkogenexpression sind besonders interessant : Wie wird die Genexpression dieser typischen eukaryontischen Gene reguliert und welche Funktion haben diese Onkogene in der normalen Zelle ?

Experimente von K.Kelly<sup>(95)</sup> und Ch.Dani<sup>(99)</sup> hatten gezeigt, daß Inhibitoren der Proteinbiosynthese wie CHI oder Emetin, die c-myc mRNA-Expression superinduzieren können. Später wurde eine Superinduktion durch CHI auch bei c-fos, IL-2 und einer Reihe von Genen, deren Produkte unbekannt sind, gefunden. Der Effekt der Superinduktion beruht entweder auf einer Erhöhung der Transkriptionsrate oder auf der Stabili-

sierung der mRNA der entsprechenden Gene. Für c-fos und c-myc konnte ich bei normalen Lymphozyten zeigen, daß durch CHI die mRNA-Stabilität drastisch erhöht wurde und daß CHI keinen Effekt auf die Transkriptionsrate dieser Gene hatte (Abb.24, 26 und 33).

Die tatsächliche mRNA-Konzentration in der Zelle wird reguliert durch ein Zusammenspiel von Transkription und Degradation. Wie meine Ergebnisse zeigten, wird die Transkriptionsrate und der spezifische Abbau der mRNA für die beiden Onkogene c-fos und c-myc unterschiedlich reguliert. Während c-fos schon in nicht-aktivierten Lymphozyten aus Mausmilzen transkribiert wurde und nach Aktivierung die Transkription abgeschaltet wurde, stieg die c-myc Transkriptionsrate erst nach mitogener Aktivierung vorübergehend auf das Fünffache an und blieb dann auf niedrigem Niveau für längere Zeit konstant (Abb.33). Die Ergebnisse des Transkriptionstestes werden bestärkt durch die Nuklease S1-Kartierungen. Vorausgesetzt, daß die Prozessierungsgeschwindigkeit der Vorläufer-mRNA zur reifen mRNA konstant ist, reflektiert die preRNA-Konzentration die Transkriptionsrate eines Gens. Die preRNA von c-fos war in nicht-aktivierten Milzzellen bis 1 Std. nach Stimulation in einer konstanten Konzentration vorhanden, danach war kein Signal mehr für c-fos preRNA nachzuweisen (Abb. 31). Dagegen erreichte die preRNA von c-myc 6 und 12 Std. nach ConA-Stimulation der Lymphozyten maximale Werte und blieb danach in kleiner Konzentration bis 72 Std. nach Stimulation vorhanden (Abb.32).

Die mRNA von c-fos erschien erst 30 bis 60 Min. nach Stimulation, mußte also in nicht-aktivierten Milzzellen posttranskriptionell abwärts-reguliert sein. Daß die natürliche Halbwertszeit der c-fos mRNA von 25 Min. nach 1 Std. auf 70 Min. nach 2 Std. Stimulation anstieg, deutete darauf hin, daß eine c-fos abbauende Aktivität nach Stimulation der Zellen vermindert wurde (Abb.24). Dagegen wurde im Falle des c-myc Onkogens, dessen mRNA erst eine Halbwertszeit von ca. 50 Min., später dann ca. 10 Min. hatte (Abb.26), eine spezifische mRNA-abbauende Aktivität nach Aktivierung der Lymphozyten stimuliert.

Die in Abb.35 dargestellten Expressionskinetiken kommen also durch ein Zusammenspiel von Transkriptions- und Post-Transkriptionsmechanismen zustande. Bei der c-fos Expression herrscht zunächst eine Post-Transkriptionskontrolle vor, die dann durch eine Transkriptionskontrolle ersetzt wird. Ohne die schnelle mRNA-Degradation würde auch noch viele Stunden nach Abschalten der Transkription eine hohe Konzentration an c-fos mRNA vorliegen. Ohne Transkriptionskontrolle würde durch CHI auch zu späteren Zeiten nach Stimulation noch mRNA akkumulieren (Abb.21(A)(B)). Im Falle der c-myc Expression herrscht zunächst eine Transkriptionskontrolle vor und die Transkription wird stimuliert. Dann geht die Transkription von c-myc auf ein Niveau zurück, das bei langen mRNA-Halbwertszeiten immer noch zu 90% maximaler c-myc mRNA führen könnte (vgl. CHI, Abb.20). Aber reguliert durch die

mRNA-Degradation sinkt die c-myc mRNA-Konzentration nach 72 Std. bis auf 20% des Maximalwertes (Abb.20). Eine schnelle und effektive Regulation der Onkogenexpression ist für die Zelle sehr wichtig, wenn die betreffenden Genprodukte nur während bestimmter Zeiten im Zellzyklus notwendig und erlaubt sind und sonst eine Wachstumsregulation nicht mehr möglich ist.

Ein Vergleich mit fünf Tumorzelllinien, deren c-myc mRNA's alle eine relativ lange Halbwertszeit von ca. 60 Min. hatten, zeigte, daß ein Defekt in der Regulation des spezifischen Abbaus einer mRNA zu einer Überexpression eines Onkogens führen könnte und damit zur malignen Entartung einer Zelle beitragen kann (Abb.30). Außerdem wird die Transkription von c-myc, im Gegensatz zu den normalen Zellen, nicht abwärts-reguliert (Abb.29 (CHI)).

Kürzlich wurde von M.Piechaczyk<sup>(101)</sup> und T.Rabbitts<sup>(17)</sup> berichtet, daß bei Burkitt Lymphoma Zelllinien der Verlust des ersten Exons von c-myc zu einer Verlängerung der Halbwertszeit der c-myc mRNA führen kann. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die ungewöhnlich lange, nicht-translatierte Sequenz am Anfang des c-myc Gens (Abb.36) regulatorische Funktion für den spezifischen Abbau besitzen könnte.

M.Linial<sup>(167)</sup> jedoch beschrieb eine Zelllinie (CEF), deren c-myc mRNA auch ohne Exon 1 eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. Dies verstärkt die Vermutung, daß Sequenzen am Ende (3') der mRNA regulatorische Funktion für den Abbau besitzen könnten.

### 4.3. Mögliche Mechanismen post-transkriptioneller Regulation

In der Gegend der beiden c-myc Promotoren (Abb.36) besteht durch umgekehrte Sequenz-Wiederholungen (inverted repeats) die Möglichkeit zur Ausbildung doppelsträngiger RNA in "Bäumchen"-Struktur.

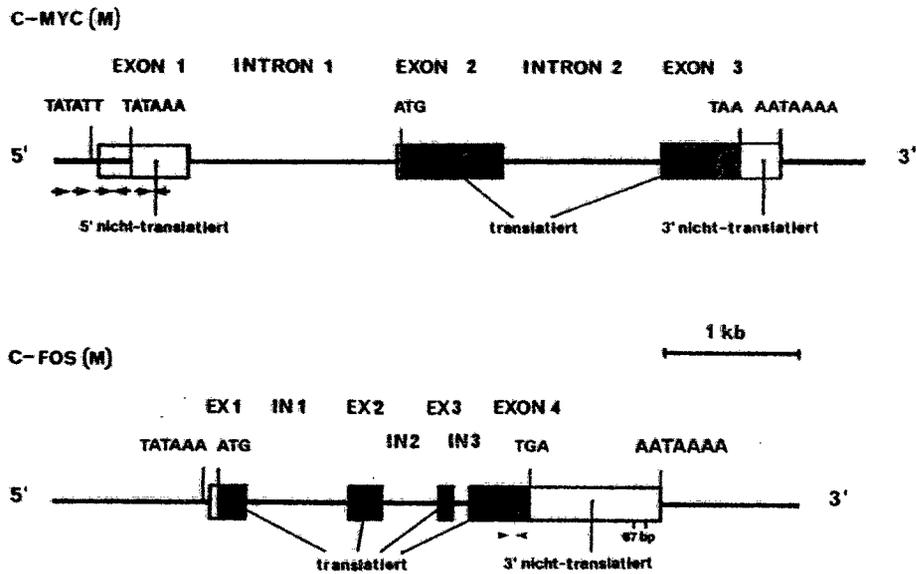


Abb.36: Die Gene von c-myc (oben) und c-fos (unten)

Von dem c-myc Gen werden entsprechend den zwei Promotoren (TATAA-Sequenzen) zwei mRNA-Spezies der Länge 2,15 und 2,4 kb abgelesen. Von dem c-fos Gen werden ebenfalls zwei mRNA-Spezies von etwa den gleichen Längen abgelesen. Jedoch besitzt das c-fos Gen nur eine TATAA-Sequenz, dafür aber (sequenziert bei dem humanen c-fos Gen) zwei Polyadenylierungssignale (AATAAAA-Sequenzen). Die Pfeile unter den Genen bedeuten Sequenzwiederholungen.

Diese Sequenzen könnten als Erkennungsstruktur für spezifische RNasen dienen. Bei der c-fos mRNA finden sich keine

entsprechenden Sequenzen am Anfang des Gens. Dagegen besteht am Ende (3') der mRNA, noch in der translatierten Region, die Möglichkeit zur Ausbildung solcher "Bäumchen"-Strukturen (stem loops). Fehlt ein Teil der 3' nicht-translatierten Region der c-fos mRNA (67 Basen), so wird aus dem Gen ein transformierend wirkendes Gen<sup>(80)(105)</sup>. Dieses Phänomen könnte auch durch eine erhöhte Stabilität der mRNA erklärt werden .

Doppelsträngige RNA setzt allgemein die Bindung der mRNA an das Ribosom herab<sup>(149)</sup> oder kann spezifisch die Translation eines Gens inhibieren<sup>(150)(151)</sup>. Möglicherweise ist diese doppelsträngige RNA aber auch das Signal zum Abbau der mRNA und die Translation findet deswegen nicht statt.

Doppelsträngige RNA kann entweder auf einem mRNA-Molekül durch umgekehrte Sequenzwiederholungen entstehen, oder sich durch Hybridisierungen mit komplementärer RNA bilden. Die Suche von mir nach natürlich vorkommender anti-sense RNA zu c-fos und c-myc mit Proben für das 3' Ende und die mittleren Teile der Gene in Lymphozyten verlief bis jetzt nicht erfolgreich. Von D.Bentley und M.Groudine<sup>(168)</sup> wurde kürzlich die Synthese kurzlebiger anti-sense RNA, komplementär zu Teilen des 1. Exons von c-myc und 5' Sequenzen, in HL60-Zellen beschrieben. Allerdings hat diese anti-sense RNA eine Inhibition der Elongation der Transkription zur Folge, wirkt also auf transkriptioneller Ebene.

Post-transkriptionelle Regulation könnte auch auf der Ebene des Transports von mRNA aus dem Zellkern zu den Ribosomen stattfinden. In diesem Falle würde man zwar viel mRNA (im Zellkern) aber kein Genprodukt finden. Diese Situation wurde für das c-fos Gen in differenzierten Makrophagen von R.Müller<sup>(92)</sup> beschrieben. Ob tatsächlich der Transport von mRNA dabei eine Rolle spielt, bleibt aufzuklären. Für stimulierte Lymphozyten trifft diese Art post-transkriptioneller Regulation jedoch nicht zu, da die mRNA-Konzentration (in totaler RNA) rasch variiert. Zu zeigen bleibt aber, ob die vorübergehende, hohe Konzentration an mRNA auch im Zytoplasma nachzuweisen ist und ob eine vorübergehende Expression auch auf Proteinebene stattfindet.

Denkbar wäre auch der gerichtete Transport von spezifischen mRNA-Molekülen in ein Kompartiment der Zelle, wo der Abbau stattfindet. Dieses Modell setzt keine spezifischen RNasen in der Zelle voraus, benötigt würde jedoch ein modifizierbares Signal für den Transport in das "Abbaukompartiment". Die Ribosomen selbst könnten bei der Proteinbiosynthese auch an dem spezifischen Abbau von mRNA beteiligt sein, was den stabilisierenden Effekt des Proteinbiosynthese-Inhibitors CHI erklären würde<sup>(167)</sup>.

Meine Ergebnisse mit CHI und der Akkumulierung von mRNA, nicht aber preRNA, sprechen gegen eine Regulation auf der Ebene der Prozessierung von preRNA, also Cap-Bildung, Polyadenylierung und Spleißen. Die post-transkriptionelle Regulation setzt erst an der reifen mRNA im Zytoplasma ein.

#### 4.4. Funktion der c-fos und c-myc Onkogenprodukte

Über die Funktion der c-fos und c-myc Genprodukte in normalen Zellen ist nur sehr wenig bekannt. Die von mir bestimmte Expressionskinetik von c-fos in nicht-proliferierenden Zellen (Abb.21(B) zeigte, daß c-fos Expression nicht zur Proliferation der Zellen führt. B.Verrier<sup>(77)</sup> konnte mit Antikörpern gegen das c-fos Protein(p55<sup>fos</sup>) und Fluoreszenzfärbung zeigen, daß nach Beschädigung eines Fibroblasten-Monolayers durch Kratzen von den umliegenden Zellen c-fos exprimiert wurde. Dagegen konnte in temperatursensitiven Zellen nach Beendigung der Arretierung durch Senken der Temperatur und darauf folgender Proliferation keine Expression von c-fos gefunden werden (R.Müller<sup>(17)</sup>).

Das zelluläre fos Onkogen scheint also eher mit der Zellorganisation und Differenzierung, als mit der Proliferation assoziiert zu sein. Bei den Lymphozyten aus Mausmilzen könnte c-fos in den sogenannten "nicht-aktivierten" Zellen durch Zerstörung der Milz-Organstruktur stimuliert worden sein. Die Aufarbeitungszeit von ca. 30 Min. zwischen dem Zerreiben der Milzen und Auflösen der Lymphozyten im Guanidin-SCN Puffer würde ausreichen zur Stimulation der Transkription des c-fos Gens. Daß die mRNA aber erst 1 Std. danach maximal exprimiert wird, kann nur durch eine posttranskriptionelle Abwärtsregulation in den nicht-aktivierten Zellen erklärt werden.

Das zelluläre myc Onkogen wird bei praktisch allen proliferierenden Zellen, aber in unterschiedlichem Maße, exprimiert. Bei Lymphozyten wurde nach Behandlung mit serumhaltigem Medium eine c-myc Expression auf niedrigem Niveau hervorgerufen, nach Stimulation mit ConA dagegen wurde vorübergehend sehr stark c-myc exprimiert (Abb.19(A)(B) und 20). Ähnlich, wenn auch mit anderer Kinetik, verhielt es sich bei der Stimulation von  $\text{Lyt2}^+$  zytotoxischen T-Zellen mit LA und ConA (Abb.17(A)), wo als zweites, zur Proliferation führendes Signal, IL-2 zugegeben werden mußte. Dies läßt zum einen darauf schließen, daß niedrige c-myc mRNA-Konzentration alleine nicht ausreicht, die Lymphozyten zur Proliferation zu stimulieren. Zum anderen könnte die hohe c-myc mRNA Konzentration in ConA-stimulierten T-Zellen zu der Proliferation der Zellen beitragen, da Zellen durch überhöhte c-myc Expression ja auch transformiert werden können, aber die hohe c-myc mRNA-Konzentration ist nicht notwendig für die Proliferation der  $\text{Lyt2}^+$ -T-Zellen (Abb.16 und 17, LA + IL-2). Die Abstufung der zellulären Antwort zeigt, daß die Stimulation mit FCS und LA, oder ConA entweder über verschiedene Wege der Signalübertragung läuft, oder zumindest, daß das Signal zur c-myc Expression verschieden stark weitergegeben wird.

Ob die Expression von c-myc notwendig ist für die Proliferation, kann nur durch spezifische Inhibition durch komplementäre RNA oder Antikörper gegen das Genprodukt gezeigt

werden. Für das Protein p21 des c-Ha-ras Gens konnte mit Injektion von Antikörpern gezeigt werden, daß das c-Ha-ras Genprodukt für den Eintritt in die S-Phase bei 3T3-Zellen<sup>(162)</sup> und für die Wachstumsfaktor-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen<sup>(164)</sup> notwendig ist. Auch bei der Transformation von 3T3-Zellen durch Rezeptor-ähnliche Onkogene wird p21<sup>ras</sup> benötigt<sup>(163)</sup>. Entsprechende Experimente sollten auch mit Antikörpern gegen die c-fos und c-myc Genprodukte durchgeführt werden.

Die Regulation der Genexpression über den spezifischen Abbau von mRNA wird in Zukunft sicherlich zu einem viel bearbeiteten Thema werden. Dabei wird sich herausstellen, ob Signalsequenzen am 5'-oder 3'-Ende der mRNA eine Rolle spielen. Ich möchte mich weiterhin mit der Funktion der anti-sense RNA bei der Regulation und der spezifischen Inhibition von Onkogenen befassen und die Ebene der Untersuchungen mit Hilfe von Antikörpern erweitern auf die Genprodukte der zellulären Onkogene.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Urdal D.L., March C.J., Gillis S., Larsen A., Dower S.K.,  
PNAS 81 (1984) 6481-6485
- (2) Cosman D., Carretti D.P., Larsen A., Park L., March C.,  
Dower S., Gillis S., Urdal D., Nature 312 (1984) 768-771
- (3) Efrat S., Kaempfer R., PNAS 81 (1984) 2601-2605
- (4) Taniguchi T., Matru H., Fujitu T., Takaoka C., Kashima N.,  
Yoshimoto R., Hamuro J., Nature 302 (1983) 305-310
- (5) Larsson E.L., Coutinho A., Eur.J.Imm. 10 (1980) 93
- (6) Cohn M., Cell 33 (1983) 657-669
- (7) Saito H., Kranz D.M., Tagagaki Y., Hayday A.C., Eisen H.N.,  
Tonegawa S., Nature 309 (1984) 757-762
- (8) Schimpl A., Wecker E., Nature 237 (1972) 15
- (9) Schimpl A., Wecker E., J.exp.Med. 137 (1973) 547
- (10) Hübner L., Schimpl A., Wecker E., Molecular Immunology 17  
(1980) 591-599
- (11) Scribner D.J., Weiner H.L., Moorhead J.W., J.Immunology 121  
(1978) 377
- (12) Schimpl A., Tony H.P., Wecker E., Systems Theory in  
Immunology (1979) Springer Verlag
- (13) Howard M., Farrar J., Hilfiker M., Johnson B., Takatsu K.,  
Hamaoka T., Paul W.E., J.exp.Med. 155 (1982) 914
- (14) Chen-Bettecken U., Wecker E., Schimpl A., PNAS 82  
(1985) 7384-7388
- (15) Berridge M.J., Irvine R.F., Nature 312 (1984)
- (16) Nishizuka Y., Nature 308 (1984) 693-698
- (17) 37. Mosbacher Kolloquium 10.-12. April 1986  
"Cell Cycle and Oncogenes"

- (18) Farrar W.L., Anderson W.B., Nature 315 (1985) 233-235
- (19) Farrar W.L., Thomas P.T., Anderson W.B., Nature 315  
(1985) 253-257
- (20) May W.S., Sahyonn N., Jacobs S., Wolf M., Cuatrecasas P.,  
J.Biol.Chem. 260 (1985) 9419-9426
- (21) Wolf M., Levine H., May S., Cuatrecasas P., Sahyonn N.,  
Nature 317 (1985) 546-551
- (22) Cambier J., International Conference on Lymphocyte  
Activation and Immune Regulation, 28.2.-3.3. 1986
- (23) Rodriguez-Pena A., Rozengurt E., EMBO J. 4 (1985) 71-76
- (24) Truneh A., Albert F., Goldstein P., Schmitt-Verhulst A.-M.,  
Nature 313 (1985) 318-320
- (25) Klaus G.B., O'Garra A., Bijsterbosch M.K., Holman M.,  
Eur.J.Immunol. 16 (1986) 318-320
- (26) Lau L.F., Nathans P., EMBO J. 4 (1985) 3145-3151
- (27) Cochran B.H., Reffel A.C., Stiles C.D., Cell 33  
(1983) 939-947
- (28) Bishop M.J., Cell 42 (1985) 23-28
- (29) Wong-Staal F., Gallo R.C., Nature 317 (1985) 395-403
- (30) Fisher A.G., Feinberg M.B., Josephs S.F., Harper M.E.,  
Marselle L.M., Reyes G., Gonda M.A., Aldovini A.,  
Debouk C., Gallo R.C., Wong-Staal F., Nature 320  
(1986) 367-371
- (31) Duesberg P.H., Nature 304 (1983) 219-226
- (32) Klein G., Klein E., Nature 315 (1985) 190-195
- (33) Slamon D.J., deKernion J.B., Verma J.M., Cline M.J.,  
Science 224 (1984) 256-262
- (34) Heldin C.-H., Westermark B., Cell 37 (1984) 9-20

- (35) Shinizu K., Goldfarb M., Suard Y., Perucho M., Li Y.,  
Kamata T., Feramisco J., Stavnezer E., Fogh J., Wigler M.,  
PNAS 80 (1983) 2112-2116
- (36) Wang J.Y.J., Nature 304 (1983) 400
- (37) Wyke J., Nature 304 (1983) 491-492
- (38) Gallwitz D., Donath C., Sander C., Nature 306 (1983) 704-707
- (39) DeFeo-Jones D., Scolnick E.M., Koller R., Dhar R.,  
Nature 306 (1983) 707-709
- (40) Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T.,  
Broek D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K., Wigler M.,  
Cell 40 (1985) 27-36
- (41) Hoffmann F.M., Fresco L.D., Hoffmann-Falk H., Shilo B.-Z.,  
Cell 35 (1983) 393-401
- (42) Waterfield M.D., Scrace G.T., Whittle N., Stroobant P.,  
Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C.-H.,  
Huang J.S., Denel T.F., Nature 304 (1983) 35-39
- (43) Robbins K.C., Leal F., Pierce J.H., Aaronson S.A.,  
EMBO J. 4 (1985) 1783-1792
- (44) Schechter A.L., Stern D.F., Vaidyanathan L., Decker S.J.,  
Drebin J.A., Greene M.I., Weinberg R.A., Nature 312 (1984) 513
- (45) Privalsky M.L., Ralston R., Bishop J.M., PNAS 82 (1984) 704
- (46) Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N.,  
Stockwell P., Ulrich A., Schlessinger J., Waterfield M.D.,  
Nature 307 (1984) 521-527
- (47) Schwartz D.E., Tizard R., Gilbert W., Cell 32 (1983) 853-869
- (48) Takeya T., Hanafusa H., Cell 32 (1983) 881-890
- (49) Rassoulzadegan M., Cowie A., Carr A., Gleichenhaus N.,  
Kamen R., Cuzin F., Nature 300 (1982) 713-718

- (50) Courtneidge S.A., Smith A.E., Nature 303 (1983) 435-437
- (51) Papageorge A., Lowy P., Scolnick E.M., J.of Virology 44  
(1982) 509-519
- (52) Newbold R., Nature 310 (1984) 628-629
- (53) Tabin C.J., Bradley S.N., Bargmann C.J., Weinberg R.A.,  
Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.,  
Chang E.H., Nature 300 (1982) 143-149
- (54) Reddy E.P., Reynolds R.K., Santos E., Barbacid M.,  
Nature 300 (1982) 149-152
- (55) McGrath J.P., Capon D.J., Goeddel D.V., Levinson A.D.,  
Nature 310 (1984) 644-649
- (56) Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J.-M.,  
Argos P., Chambon P., Nature 320 (1986) 134-139
- (57) Probst F., Vandewoude G.F., Nature 315 (1985) 516-518
- (58) Schmidt A., Setoyama C., Crombrugghe B., Nature 314  
(1985) 286-289
- (59) Baldwin G.S., PNAS 82 (1985) 1921-1925
- (60) Evan G.I., Hancock D.C., Cell 43 (1985) 243-251
- (61) Donner P., Greiser-Wilke I., Moelling K., Nature 296  
(1982) 262-266
- (62) Rotter V., Abutbul H., Ben-Zeev A., EMBO J. 2 (1983) 1041-1047
- (63) Yoshinaga S., Dean N., Han M., Berk A.J., EMBO J. 5  
(1986) 343-354
- (64) Vaessen R.T.M.J., Houweling A., Israel A., Kourilsky P.,  
van der Eb A.J., EMBO J. 5 (1986) 335-341
- (65) Adams J.M., Harris A.W., Pinkert C.A., Corcoran L.M.,  
Alexander W.S., Cory S., Palmiter R.D., Brinster R.L.,  
Nature 318 (1985) 533-538

- (66) Marx J.L., Science 223 (1984) 40-41
- (67) Little C.D., Nau M.M., Carney D.N., Gazdar A.F.,  
Minna J.D., Nature 306 (1983) 194-196
- (68) Schwab M., Alitalo K., Klempnauer K.-H., Varmus H.E.,  
Bishop J.M., Gilbert F., Brodeur G., Goldstein M.,  
Trent J., Nature 305 (1983) 245-248
- (69) Calabi F., Neuberger M.S., EMBO J.4 (1985) 667-674
- (70) Mushinski J.F., Potter M., Bauer S.R., Reddy E.P.,  
Science 220 (1983) 795-798
- (71) Rechavi G., Givol D., Canaani E., Nature 300 (1982) 607-611
- (72) Payne S.G., Bishop J.M., Varmus H.E., Nature 295 (1982) 209
- (73) Hayward W.S., Neel B.G., Astrin S.M., Nature 290 (1981) 475
- (74) Land H., Parada L., Weinberg R., Nature 304 (1983) 596-602
- (75) Eli jahn D., Raz A., Gruss P., Givol D., Oren M.,  
Nature 312 (1984) 646-649
- (76) Parada L., Land H., Weinberg R., Wolf D., Rotter V.,  
Nature 312 (1984) 649-651
- (77) Verrier B., Müller D., Bravo R., Müller R.,  
EMBO J. 5 (1986) 913-917
- (79) Reddy E.P., Reynolds R.K., Watson D.K., Schultz R.A.,  
Lautenberger J., Papas T.S., PNAS 80 (1983) 2500-2504
- (80) Miller A.D., Curran T., Verma J.M., Cell 36 (1984) 51-60
- (81) Slamon P.J., Cline M.J., PNAS 81 (1984) 7141-7145
- (82) Probst F., VandeWoude G.F., Nature 315 (1985) 516-518
- (83) Zimmermann K.A., Nau M.M., Witte O.N., Toran-Allerand D.,  
Gee C.E., Minna J.D., Alt F.W. Nature 319 (1986) 780-783
- (84) Pfeifer-Ohlsson S., Goustin A., Rydnert J., Wahlström T.,  
Bjersing L., Stehelin D., Ohlsson R., Cell 38(1984)585-596
- (85) Makino R., Hayashi K., Sugimura T., Nature 310 (1984) 697

- (86) Goyette M., Petropoulos C.J., Shank P.R., Fausto N.,  
Science 219 (1983) 510-512
- (87) Müller R., Slamon D.J., Tremblay J.M., Cline M.J.,  
Verma I.M., Nature 299 (1982) 640-644
- (89) Müller R., Tremblay J.M., Adamson E.D., Verma I.M.,  
Nature 304 (1983) 454-456
- (90) Müller R., Müller D., Guilbert L., EMBO J. 3 (1984) 1887-1890
- (91) Mitchell R.L., Zokas L., Schreiber R.D., Verma I.M.,  
Cell 40 (1985) 209-217
- (92) Müller R., Curran T., Müller D., Guilbert L.,  
Nature 314 (1985) 546-547
- (93) Greenberg M.E., Ziff E.B., Nature 311 (1984) 433-437
- (94) Müller R., Bravo R., Burckhart J., Curran T.,  
Nature 312 (1984) 716-720
- (95) Kelly K., Cochran B.H., Stiles C.D., Leder P.,  
Cell 35 (1983) 603-610
- (96) Reed J.C., Nowell P.C., Hoover R.G., PNAS 82  
(1985) 4221-4224
- (97) Kaczmark L., Calabretta B., Baserga R., PNAS 82  
(1985) 5375-5379
- (98) Coughlin S.R., Lee W.M.F., Williams P.W., Giels G.M.,  
Williams L.T., Cell 43 (1985) 243-251
- (99) Dani Ch., Blanchard J.M., Piechaczyk M., Sabouty S.,  
Marty L., Janteur P., PNAS 81 (1984) 7046-7050
- (100) Taub R., Moulding C., Battey J., Murphy W., Vasicek T.,  
Lenoir G.M., Leder P., Cell 36 (1984) 339-348
- (101) Piechaczyk M., Yang J.-Q., Blanchard J.M., Janteur P.,  
Marcu K.B., Cell 42 (1985) 589-597

- (102) Knight E., Anton E.D., Fahey D., Friedland B.K.,  
Jonak G.J., PNAS 82 (1985) 1151-1154
- (103) Einat M., Resnitzky D., Kimchi A.  
Nature 313 (1985) 597-599
- (104) Treisman R., Cell 42 (1985) 889-902
- (105) Meijlink F., Curran T., Müller A.D., Verma I.M.,  
PNAS 82 (1985) 4987-4991
- (106) Rütter U., Wagner E.F., Müller R.,  
EMBO J. 4 (1985) 1775-1781
- (107) Van Beveren C., van Straaten F., Curren T., Müller R.,  
Verma I.M., Cell 32 (1983) 1241-1255
- (108) Subkloniert von Chantal Meyers, Inst. für Virologie  
und Immunbiologie der Universität Würzburg
- (109) Battey J., Moulding C., Taub R., Murphy W., Stewart T.,  
Potter H., Lenoir G., Leder P., Cell 34(1983) 779-787
- (110) Eine Gabe von G. Bornkamm, Inst. für Virologie der  
Universität Freiburg
- (111) Bernard O., Cory S., Gerondakis S., Welb E.,  
Adams J.M., EMBO J. 2 (1983) 2375-2383
- (112) Shih T., Weinberg R.A., Cell 29 (1982) 161-169
- (113) Ellis R.W., DeFeo D., Maryak J.M., Young H.A., Shih T.,  
Chang E.H., Lowy D.R., Scolnick E.M.,  
J. of Virology 36 (1980) 408
- (114) Wirth T., Glöggler K., Baumruker T., Schmidt M.,  
Horak I., PNAS 80 (1983) 3327
- (115) Brégègère F., Abestado I.P., Krist S., Rask L.,  
Lalanne J.L., Garoff H., Cami B., Wiman K., Larhammer D.,  
Peterson P.A., Gachelin G., Kourilsky P., Dobberstein B.,  
Nature 292 (1981) 78

- (116) Eine Gabe von I.Grummt, Inst. für Biochemie der  
Universität Würzburg
- (117) Oi V.T., Morrison S.L., Herzenberg L.A., Berg P.,  
PNAS 80 (1983) 825-829
- (118) Eine Gabe von I.Horak, Inst. für Virologie und  
Immunbiologie der Universität Würzburg
- (119) Carter A.D., Felber B.K., Walling M.-J., Jubier M.-F.,  
Schmidt C.J., Hamer D.H., PNAS 81 (1984) 7392-7396
- (120) Julius M.H., Simpson E., Herzenberg L.A.,  
Eur. J. Immunol. 3 (1973) 645
- (121) Cantor H., Boyse E.A., J. Exp. Med. 141 (1975) 1376
- (122) Hünig T., Eur. J. Immunol. 13 (1983) 596-601
- (123) Robb R.J., Immunology Today 5 (1984) 203
- (124) Rosenberg S.A., Grimm E.A., McGorgan M., Doyle M.,  
Kawasaki E., Koths K., Mark D., Science 223(1984)1412-1414
- (125) Pierres A., Naquet P., van Agthoven A., Bekkhoneha F.,  
Denizot F., Michal Z., Schmitt-Verhulst A.-M.,  
Pierres U., J. Immunol. 132 (1984) 2775-2782
- (126) Molecular Cloning, a laboratory manual, T.Maniatis,  
E.F.Fritsch, J.Sambrook (1982)
- (127) Stanton L.W., Watt R., Marcu K.B.,  
Nature 303 (1983) 401-406
- (128) Favaloro J., Treisman R., Kamen R.,  
Methods in Enzymology 65 (1980) 718
- (129) Vannice J.L., Taylor J.M., Ringold G.M.,  
PNAS 81 (1984) 4241-4245
- (130) McNight D.S., Palmiter R.D.,  
J. of Biol. Chem. 254 (1979) 9050-9058

- (131) Schibler U., Hagenbüchle O., Wellauer P.K.,  
Pittet A.C., Cell 33 (1983) 501-508
- (132) Carneiro T., Schibler U., J.Mol.Biol. 178(1984)869-880
- (133) Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R.,  
Cell 14 (1978) 725-731
- (134) Copeland N., Cooper G., Cell 16 (1979) 347-356
- (135) Weber F., deVilliers J., Schaffner W.,  
Cell 36 (1984) 983-992
- (136) Eine Gabe von K.Schäfer, Inst. für Virologie der  
Universität Tübingen
- (137) Breitzkreuz D., Boukamp P., Lueder M., Fusenig N.E.,  
Front. Matrix. Biol. 9 (1981) 57-82
- (138) Sugiura K., Stock C., Cancer 5 (1952) 382-402
- (139) Eine Gabe von K.Goerttler, DKFZ Heidelberg
- (140) Goerttler K., Lührke H., Virchows Archiv,  
A Path. Anat. and Histol. 376 (1977) 117-132
- (141) Thompson C.B., Challoner P.B., Neiman P.E.,  
Grougine M., Nature 319 (1986) 374-379
- (142) Thompson C.B., Challoner P.B., Neiman P.E.,  
Grougine M., Nature 314 (1985) 363-366
- (143) Hann S.R., Thompson C.B., Eisenman R.N.,  
Nature 314 (1985) 366-369
- (144) Keller W., Cell 39 (1984) 423-435
- (145) Krainer A.R., Maniatis T., Cell 42 (1985) 725-736
- (146) Black D.L., Chabot B., Steitz J.A.,  
Cell 42 (1985) 737-750
- (147) Mizumo T., Chou M.-Y., Inouye M., PNAS 81(1984)1966-1970
- (148) Izent J.G., Weintraub H., Cell 36 (1984) 1007-1015
- (149) DeBenedetti A., Baglioni C., Nature 311 (1984) 79-81

- (150) Pestka S., Daugherty B.L., Jung V., Holta K.,  
Pestka R.K., PNAS 81 (1984) 7525-7528
- (151) Coleman J., Hirashima A., Inokuchi Y., Green P.J.,  
Inouye M., Nature 315 (1985) 601-603
- (152) Izant J.G., Weintraub H., Science 229 (1985) 345-352
- (153) Kim S.K., Wold B.J., Cell 42 (1985) 129-138
- (154) Rosenberg U.B., Preiss A., Seifert E., Jäckle H.,  
Knipple D.C., Nature 313 (1985) 703-706
- (155) McCarrey J.R., Riggs A.D., PNAS 83 (1986) 679-683
- (156) Farnham P.J., Abrams J.M., Schimke R.T.,  
PNAS 82 (1985) 3978-3982
- (157) Adeniyi-Jones S., Zasloff M., Nature 317 (1985) 81
- (158) Gonzales F.J., Kimura S., Nebert D.W.,  
J. of Biol. Chem. 260 (1985) 5040
- (159) Larhammar D., Hammerling U., Denaro M., Lund T., Flavell R.,  
Rask L., Peterson P.A., Cell 34 (1983) 179-188
- (160) Myers J.C., Dickson L.A., deWet W.J., Bernard P.,  
Chu M.-L., J. of Biol. Chem. 258 (1983) 10128
- (161) Lee M., Loomis C., Cowan J.,  
Nucleic Acids Research 12 (1984) 5823
- (162) Mulcahy L.S., Smith M.R., Stacey D.W.,  
Nature 313 (1985) 241-243
- (163) Smith M.R., De Gubicibus S.J., Stacey D.W.,  
Nature 320 (1986) 540-542
- (164) Hagag N., Halegona S., Viola M., Nature 319 (1986) 680-682
- (165) Wecker E., Schimpl A., Hünig T., Nature 269 (1977) 598-600
- (166) Klenner D., Horak I., Schimpl A., Wecker E.,  
PNAS 79 (1982) 1250-1253

(167) Linial M., Gunderson N., Groudine M.,

Science 230 (1985) 1126-1131

(168) Bentley D.L., Groedine M.,

Nature 321 (1986) 702-706

Anhang A : Verzeichnis der Abkürzungen

ActD	: Actinomycin A
APS	: Ammoniumpersulfat
ATP	: Adenosintriphosphat
BFP	: BSA/Ficoll/Polyvinylpyrrolidon
BSA	: Bovine Serum Albumine
BSS	: Balanced Salt Solution
cAMP	: zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	: Curie
CIP	: Calf Intestinal Phosphatase
CHI	: Cycloheximid
ConA	: Concanavalin A
cpm	: counts per minute
CTL	: zytotoxischer T-Lymphozyt
CTP	: Cytidintriphosphat
DEPC	: Diethylpyrocarbonat
DG	: Diacylglycerin
DKFZ	: Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
ds	: Doppelstrang
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylendiamineteraessigsäure
EGTA	: Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EMBO J.	: European Molecular Biology Organisation Journal
Eur. J. Immunol.	: European Journal of Immunology
FCS	: Fötales Kälberserum
g	: Normfallbeschleunigung (980,665 cm/sec <sup>2</sup> )
GTP	: Guanosintriphosphat

h	: Stunde
HEPES	: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HTLV	: humanes T-Zell lymphotropes Virus
IFN	: Interferon
IL-2	: Interleukin 2
IL-2R	: Interleukin 2-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	: Inosittriphosphat
IPTG	: Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid
J. Exp. Med.	: Journal of Experimental Medicine
J. Mol. Biol.	: Journal of Molecular Biology
LA	: Leukoagglutinin
LB	: Luria Broth
LPS	: bakterielles Lipopolysaccharid
mA	: milli Ampere
Min.	: Minuten
MHC	: Haupthistokompatibilitätskomplex
MT	: Metallothionin-Gen
MOPS	: Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	: Boten (messenger) Ribonukleinsäure
NaOAc	: Natriumacetat
OD	: optische Dichte
PBS	: Phosphate Buffered Salt Solution
PEG	: Polyethylenglycol
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PHA	: Phytohämagglutinin
PIP <sub>2</sub>	: Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat
PMSF	: Phenylmethansulfonylfluorid
PNAS	: Proceedings of the National Academy of Sciences

preRNA	: Vorläufer (precursor)mRNA
Py mT	: Polyoma mittel T-Antigen
Py t	: Polyoma klein T-Antigen
Py T	: Polyoma groß T-Antigen
RNA	: Ribonukleinsäure
RNase	: Ribonuklease
rpm	: Umdrehungen pro Minute
SDS	: Natriumdodecylsulfat
ss	: Einzelstrang
SSC	: Natriumchlorid/Natriumcitrat
Std.	: Stunde
SV40	: Simian Virus 40
TCA	: Trichloressigsäure
TE	: Tris/EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	: Tris/EDTA/SDS
T <sub>H</sub>	: T-Helferzellen
TPA	: 1-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	: Trishydroxymethylamionmethan
TTP	: Thymidintriphosphat
U	: Einheiten
UTP	: Uridintriphosphat
XGal	: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Anhang B : Lebenslauf

Am 7. März 1956 Geburt als zweites Kind meiner Eltern Irmgard und Karl Schneider-Schaulies in Würzburg.

September 1962 Eintritt in die Pestalozzi-Grundschule in Würzburg.

Ab September 1966 Besuch des neusprachlichen Siebold-Gymnasiums in Würzburg.

Juni 1975 Abitur.

Juli 1975 bis September 1976 Ableistung des Wehrdienstes.

Ab Wintersemester 1976/77 Studium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.

Oktober 1978 Diplom-Vorprüfung.

August 1979 bis Mai 1980 Studienjahr an der State University of New York at Buffalo mit Schwerpunkt Biochemie und theoretische Chemie.

Juli 1981 Diplomprüfung im Studiengang Chemie.

September 1981 bis September 1982 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Würzburg bei Prof. F.Grummt mit dem Thema : Metabolismus von Diadenosin-5',5''-p<sup>1</sup>,p<sup>4</sup>-tetraphosphat.

November 1982 bis August 1986 Dissertation am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bei Prof. E.Wecker mit dem Thema : Expression von zellulären Onkogenen in T-Lymphozyten der Maus und Regulation der c-fos und c-myc Genexpression.

Jürgen Schneider-Schaulies

Anhang C : Eigene Veröffentlichungen

Veröffentlichte Arbeiten :

Grummt F., Weinmann-Dorsch C., Schneider-Schaulies J., Lux A. (1986)

Zinc as a Second Messenger of Mitogenic Induction.

Experimental Cell Research 163, 191-200

Schneider-Schaulies J., Knauer R., Hünig T., Schimpl A., Wecker E. (1984)

Induction of c-onc expression in polyclonally activated mouse lymphocytes.

Immunobiology 167, 62

Schneider-Schaulies J., Hünig T., Schimpl A., Wecker E. (1986)

Kinetics of cellular oncogene expression in mouse lymphocytes I. Expression of c-myc and c-Ha-ras in T lymphocytes induced by various mitogens.

Eur. J. Immunology 16, 312-316

Schneider-Schaulies J., Wecker E. (1986)

Regulation of c-fos and c-myc gene expression in normal mouse lymphocytes.  
in Vorbereitung

Poster-Präsentationen :

Schneider-Schaulies J., Knauer R., Hünig T., Schimpl A., Wecker E.

Induction of c-onc expression in polyclonally activated mouse lymphocytes.

16. International Leucocyte Culture Conference

August 1984, Cambridge, England und

10. EMBO annual Symposium: Control of Transcription in Eukaryotes

September 1984, Heidelberg, BRD.