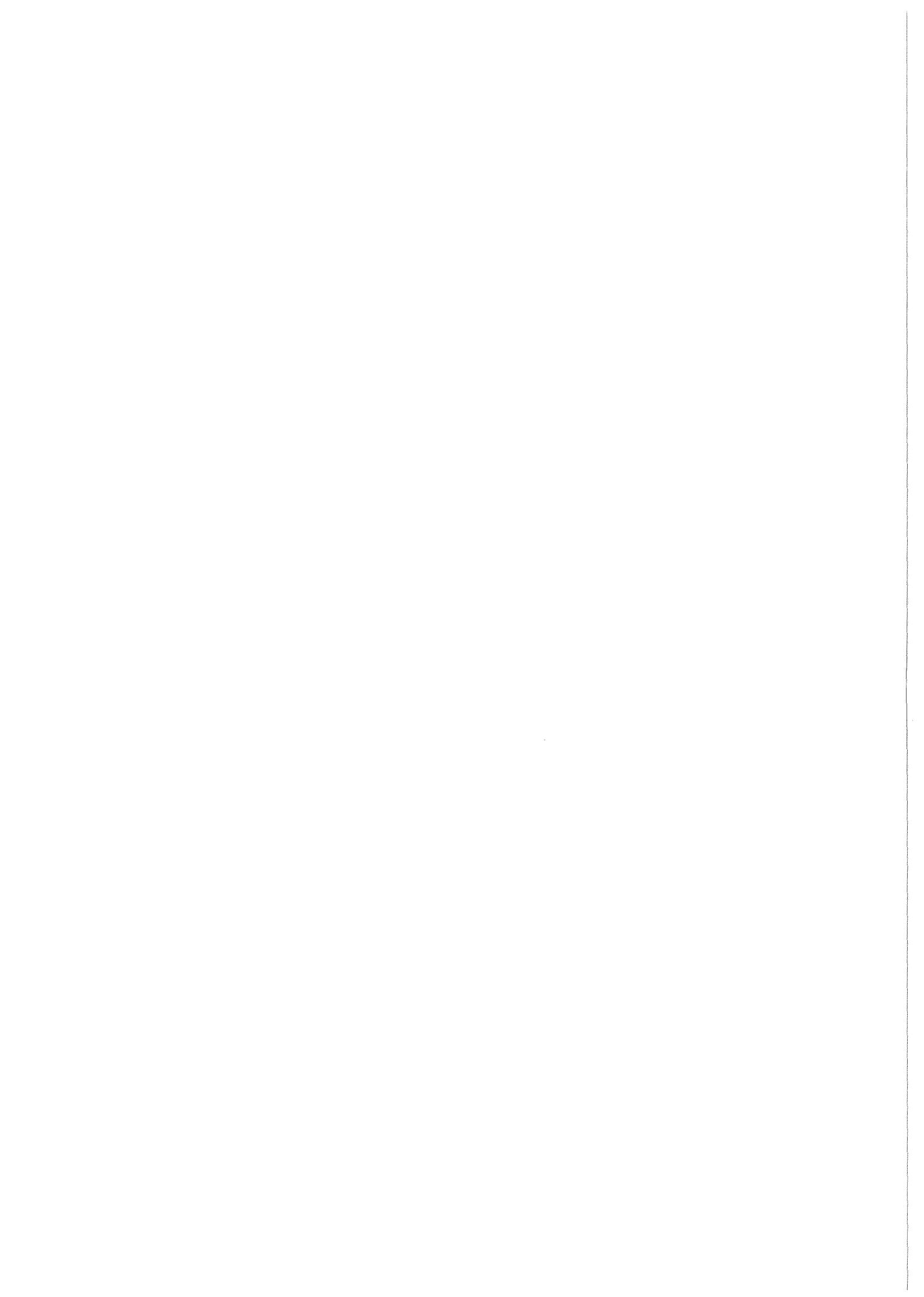


KfK 4307
August 1987

Strukturelle und funktionelle Analyse der 5'Region der Albumingene von *Xenopus laevis*: Identifikation eines zell- spezifischen Promotor-Elementes

M. Schorpp
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4307

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ANALYSE DER 5'REGION
DER ALBUMINGENE VON XENOPUS LAEVIS:
IDENTIFIKATION EINES ZELL-SPEZIFISCHEN PROMOTOR-ELEMENTES

Marina Schorpp

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe G.m.b.H., Karlsruhe

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* besitzt - im Gegensatz zu den Säugern - zwei Albumingene, die für ein 68kd und 74kd Serum Albumin Protein kodieren. Beide Gene werden gewebespezifisch in der Leber exprimiert. Die Sequenzanalyse der 5'Enden beider Gene zeigte, daß beide Gene über weite Bereiche homolog sind. Die Homologie erstreckte sich bis zu 400 bp weit in die 5'flankierende Region. Sequenzvergleiche mit den Albumin- und α -Foetoprotein-Genen der Säuger und des Huhns ergaben nur wenig Homologie für das erste Exon.

Basierend auf den Sequenzdaten konnten Hybridgene aus der 5'flankierenden Region des 68kd Albumingens und einem Indikatorgen hergestellt und zur Untersuchung der regulierten Expression eingesetzt werden. Durch Injektion von Albumin/CAT-Hybridgenen in *Xenopus laevis* Oocyten konnte gezeigt werden, daß 69bp Promotorregion von -50 bis +19 genügen, konstitutive Expression zu vermitteln. Dieser minimale Promotor wurde auch in transfizierten Maus Hepatoma-Zellen schwach exprimiert. Während in den Oocyten zwei Startstellen zur Initiation der Transkription gebraucht werden (+1 und +2), wurde in den transfizierten Maus Hepatoma-Zellen die gleiche Startstelle wie in der Froschleber benutzt (+1). Dies dokumentiert, daß der Albuminpromotor in den Maus Hepatoma-Zellen im Gegensatz zu den Oocyten genauso korrekt gebraucht wird wie in der Froschleber.

Hybridgene mit 5'flankierenden Sequenzen vor dem minimalen Albuminpromotor wurden in transfizierten Maus Hepatoma-Zellen 5-10fach besser exprimiert. Durch Deletions- und Mutationsanalyse konnte ein 13bp großes Promotorelement zwischen Position -67 und

-53 identifiziert werden, das die Transkription in den Hepatoma-Zellen stimuliert. Dieses cis-wirkende Promotorelement vermittelt zellspezifische Expression, denn es ist nur in Hepatoma-Zellen aktiv. Ein ähnliches Sequenz-Element wurde auch in der 5'flankierenden Region der Albumin- und α -Foetoproteingene der Säuger gefunden.

Mit der Identifizierung dieses zellspezifisch wirkenden Promotorelementes, das in Säuger Hepatoma-Zellen erkannt wird, wurde ein sehr konservierter Regulationsmechanismus entdeckt, der möglicherweise eine wichtige Rolle in der Albumin- und α -Foetoprotein-Genexpression spielt.

ABSTRACT

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE 5' REGION OF THE ALBUMIN GENES OF XENOPUS LAEVIS: IDENTIFICATION OF A CELL-SPECIFIC PROMOTER ELEMENT

The frog *Xenopus laevis* - in contrast to mammals - has two albumin genes that code for a 68kd and 74kd serum albumin protein. The sequence analysis of the 5'ends of both genes showed an extensive sequence homology as far as 400bp in the 5'flanking region. Sequence comparisons with the albumin and α -fetoprotein genes of mammals and chicken revealed no obvious homology for the 5'flanking regions and only weak homology for the first and second exon.

By injecting albumin CAT fusion genes into *Xenopus laevis* oocytes I could show that a 69bp promoter region (from -50 to +19) was sufficient to exhibit full transcriptional activity. This minimal promoter was also weakly active after transfection into mouse hepatoma cells (BWIJ).

Mapping the transcription start site revealed two initiation sites (at +1 and +12) in microinjected oocytes, whereas in transfected hepatoma cells initiation at +1 - the site used in *Xenopus* liver - was observed. This documents that mouse hepatoma cells transcribe the albumin promoter more faithfully than *Xenopus* oocytes.

The addition of 5'flanking sequences to the minimal albumin promoter leads to a 5 to 10fold increase in activity in transfected mouse hepatoma cells. By deletion analysis I could identify a 13bp promoter element located between position -67 and

-53 that stimulates transcription at the albumin promoter. This cis-acting element confers cell-specific expression because it is active only in hepatoma cells. A similar sequence element is also present in the 5' flanking region of the albumin and α -fetoprotein genes of mammals.

By identifying this cell-specific promoter element of a frog gene that is recognized in mouse hepatoma cells a conserved regulatory mechanism was detected that may play a general role in albumin and α -fetoprotein gene expression.

ABKÜRZUNGEN

ABB	Abbildung
AFP	α -Foetoprotein
ALB	Albumin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis(oxyethylenenitril)-tetraessigsäure
FCS	foetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HSV	Herpes simplex Virus
IgH	Immunoglobulin heavy chain
kb	Kilobasenpaare
kd	Kilodalton
KTartrat	Kaliumtartrat
MES	2-N-Morpholinoethan-sulfonsäure
MS 222	3-Aminobenzoesäure-ethylester
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaAcetat	Natriumacetat
nt	Nukleotide
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TAB	Tabelle
tRNA	transfer-RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
tk	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	6
MATERIALIEN	
1. Chemikalien, Radioisotope und Arbeitsmittel	16
2. Bakterien und Zellen	19
3. Kulturmedien	20
METHODEN	
Allgemeine Arbeitsmethoden	21
1. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	21
2. Extraktion von Nukleinsäuren	21
3. Fällung von Nukleinsäuren	22
DNA-Klonierungstechniken	22
1. Restriktionsverdau	22
2. Herstellung von Bal31-Deletionen	23
3. Auffüllen von 5'Überhängen	23
4. Dephosphorylierung von DNA	23
4.1. 5'Überhänge	23
4.2. 3'Überhänge	24
5. Auftrennung von DNA-Fragmenten	24
5.1. Agarose-Gel	24
5.2. Polyacrylamidgel	24
6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen	25
6.1. aus Agarose-Gelen	25
6.2. aus Polyacrylamid-Gelen	26
7. Ligation	26
7.1. in wäßriger Lösung	26
7.2. im Agarose-Gel	26

7.3. Ligation von Linkern	26
8. Klonierung von Oligonukleotiden	27
9. Transformation von Bakterien	28
9.1. nach Hanahan	28
9.2. nach der CaCl_2 -Methode	29
10. Präparation von einzelsträngiger DNA aus rekombinanten pEMBL-Plasmiden	29
10.1. Titration und Vermehrung der Helferphagen	30
10.2. Gewinnung der einzelsträngigen DNA	30
11. Präparation von Plasmid-DNA	32
11.1. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA	32
11.2. Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA	32
11.3. Spezielle Präparation von Plasmid-DNA zur Transfektion von eukaryontischen Zellen	33
Versuche mit <i>Xenopus laevis</i>	35
1. Präparation von polyA ⁺ -RNA aus der Froschleber	35
2. Mikroinjektion von Plasmid-DNA in <i>Xenopus</i> Oocyten-Kerne	36
2.1. Extraktion von RNA aus injizierten Oocyten	37
2.2. Extraktion von Proteinen	38
Zellkultur	38
1. Trypsin-Behandlung	38
2. Rekultivierung	39
3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
4. Transiente Transfektion von Zellen	39
4.1. Transfektion	39
4.2. Protein-Präparation	40
4.3. RNA-Präparation	40
Analytische Methoden	41
1. Präparation von radioaktiv markierten Proben	41
1.1. Kinase-Markierung von RNA	41

1.2. Endmarkierung von DNA-Fragmenten	42
1.3. Kinasierung von Oligonukleotiden	42
2. Gelfiltration	42
2.1. Sephadex G50-Säule	42
2.2. "Spin column"	43
2.3. Biogel P60-Säule	43
3. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	44
3.1. Auftrennung von in vitro transkribierter RNA	44
3.2. Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen	45
4. Southern Transfer von DNA	46
5. Hybridisierung von RNA an DNA	47
6. In vitro Transkription	47
7. Sequenzierung von Nukleinsäuren	48
7.1. von einzelsträngiger DNA nach Sanger	48
7.2. von doppelsträngiger Plasmid-DNA	49
7.3. Sequenzierung von RNA mit der Kettenabbruch-Methode	51
7.4. Sequenzierung von DNA nach Maxam und Gilbert	51
8. "primer extension"-Analyse von RNA	53
9. SP6-Analyse von RNA	53
9.1. Herstellung der RNA-Probe	54
9.2. Vorbehandlung der RNA	55
9.3. Analyse	55
10. Bestimmung der CAT-Aktivität	56

ERGEBNISSE

I. Strukturelle Analyse der 5'Enden der Xenopus Albumin-gene	58
1. Subklonierung der genomischen Fragmente, die das 5'Ende enthalten	60
2. Die klonierten Subfragmente enthalten Exon-Sequenzen	62
3. Die Subklone besitzen eine Promotor-Region, die von der RNA-Polymerase II erkannt wird	63
4. Die Sequenzierung der Subklone	66
5. Kartierung der in vivo benutzten Startstelle der Transkription	76
5.1. SP6-Analyse der Albumin mRNAs	76
5.2. "primer extension"-Analyse der Albumin mRNAs	81
6. Die Sequenz der 5'Enden der Xenopus Albumingene	87
6.1. Die Sequenzen der beiden Gene zeigen große Homologie	88
6.2. Das erste Exon der Albumingene zeigt bei Xenopus, Säugern und Huhn den gleichen Aufbau	93
II. Funktionelle Analyse der 5'Region der Albumingene des Xenopus	98
1. 69 bp genügen zur konstitutiven Expression in Oocyten	102
2. Die Xenopus ALB/CAT-Hybridgene werden in den Maus Hepatoma-zellen BWIJ gewebespezifisch reguliert	105
2.1. Ein Promotor-Element vermittelt die hepatoma-spezifische Expression	109
2.2. Das hepatoma-spezifische Promotor-Element (HP1) ist 13bp groß und durch Punktmutationen inaktivierbar	113

DISKUSSION

121

LITERATURVERZEICHNIS

139

Einleitung

Die geordnete Entwicklung eines Lebewesens erfordert die genaue Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Dazu müssen Gene gewebespezifisch aktiviert werden, denn jede neue Zelle geht verändert aus ihrer Vorläuferzelle hervor. Zusätzlich sind Gene erforderlich, die die Fähigkeit besitzen, auf Umweltsignale zu antworten und dann die aktivierten Gene regulieren können. Die Kombination aus aktivierenden und modulierenden Ereignissen, die zeitlich und räumlich exakt koordiniert sein müssen, bestimmt schließlich im sich entwickelnden Organismus den endgültigen Phänotyp einer Zelle.

Die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Differenzierungszustandes verantwortlichen molekularen Mechanismen greifen hauptsächlich auf der Ebene der Gentranskription ein (Darnell, 1982; Serfling et al., 1985a). Aufgrund der neuen Techniken der Genklonierung und in vitro Manipulation an klonierten Genen wurden in den letzten Jahren etliche Informationen über die Regulation der Transkription bei Eukaryonten erhalten. Diese scheint im Prinzip auf ähnlichen Mechanismen zu basieren, die bereits für Prokaryonten beschrieben wurden: auf der Interaktion von cis-wirkenden DNA-Elementen mit trans-wirkenden Faktoren, Proteinen (Ptashne, 1986).

Allerdings scheint die Organisation bei den Eukaryonten viel komplexer zu sein. Zahlreiche, für gewöhnlich in der 5' flankierenden Region lokalisierte cis-wirkende DNA-Elemente,

regulieren im Zusammenspiel mit verschiedenen trans-wirkenden Faktoren die genaue und effiziente Initiation der Transkription (Serfling et al., 1985a). Die Promotorregion eines eukaryontischen, proteinkodierenden Gens besteht in der Regel aus einem konservierten AT-reichen DNA-Sequenzmotiv, der TATA-Box, die sich meist 25-30bp 5' von der mRNA-Startstelle befindet (Übersichtsart. Serfling et al., 1985a). Durch Promotor-kartierungsexperimente wurden für einige eukaryontische Gene zwei wichtige "upstream" DNA-Elemente definiert: eine GG^CCCAATCT Konsensus-Sequenz, die CAAT-Box (Efstratiadis et al., 1980) und eine GGGGCGG^{GGC}_{AAT}-Sequenz, die GC-Box (Benoist und Chambon, 1981; Myers et al., 1981; Lebowitz und Ghosh, 1982; Everett et al., 1983). Diese Elemente befinden sich oft 40-100bp 5' von der Startstelle der Transkription und scheinen für die Effizienz der Initiation der Transkription wichtig zu sein. Die Elemente sind nicht absolut notwendig für die Funktion eines Promotors, können aber auch gemeinsam auftreten, wie z.B. beim Thymidinkinase-Gen des Herpes Simplex Virus (McKnight et al., 1984).

Bei einigen Genen wird die Transkription auch über sogenannte "Enhancer" reguliert. Dies sind ebenfalls cis-wirkende DNA-Elemente, die bis zu 100-200bp groß sein können, und unabhängig von der Orientierung und Entfernung die Transkription eines benachbarten Promotors aktivieren können. In der Regel wird der nächstgelegene Promotor bevorzugt stimuliert (Übersichtsart. Serfling et al., 1985a). Enhancer können 5' oder in manchen Fällen auch 3' von der Transkriptionsstartstelle lokalisiert sein. Es gibt kein Sequenzmotiv, das für alle Enhancer gemeinsam ist, jedoch ist für viele Enhancer das Vorhandensein eines oder mehrerer wiederholter Sequenzmotive charakteristisch.

Es wurden auch etliche DNA-Elemente charakterisiert, die nur unter bestimmten Bedingungen, in Anwesenheit eines Induktors, als Enhancer wirken. Ein klassisches Beispiel dafür ist das HRE (hormone responsive element) des Maus Mammary Tumorvirus (MMTV), das nur in Anwesenheit eines aktivierten Glucocorticoidrezeptors Enhancer-Aktivität ausübt (Chandler et al., 1983; Ponta et al., 1985)

In letzter Zeit ist eine genaue Abgrenzung zwischen Enhancer und "upstream" Element nicht mehr möglich, da gefunden wurde, daß beide strukturell und funktionell überlappen können. Beispielsweise kann die unmittelbare 5'-Region des Maus Metallothioneingens als induzierbarere Enhancer wirken, wenn sie von der TATA-Box losgelöst wird (Serfling et al., 1985b). Möglicherweise ist ein Enhancer gar nicht so sehr eine strukturelle Einheit mit klar definierten Grenzen, wie ursprünglich angenommen, sondern viel eher wird durch die Kombination von verschiedenen DNA-Motiven ein Enhancer-Effekt erzielt (Sassone-Corsi und Borrelli, 1986).

Über Transkriptionsstudien in zellfreien Extrakten konnten in letzter Zeit einige trans-wirkende Faktoren identifiziert werden, die mit spezifischen Promotorsequenzen interagieren. Als erstes wurde der GC-Box bindende Faktor SP1 beschrieben (Dyran und Tjian, 1983; Übersichtsart. Kadonaga et al., 1986). Inzwischen konnten auch Faktoren, die an die TATA- bzw. CAAT-Box binden in Drosophila und Säugerzellen identifiziert und isoliert werden (Davidson et al., 1983; Parker und Topol, 1984; Jones et al., 1985; Cohen et al., 1986; Jones et al., 1987).

Schließlich konnte auch die Wirkung der Enhancer-Elemente auf die Interaktion mit trans-wirkenden Faktoren zurückgeführt werden. Dies war zunächst durch in vitro Kompetitionsexperimente gezeigt worden (Schöler und Gruss, 1984) und dann in in vitro Transkriptionssystemen (Sassone-Corsi et al., 1985), womit dann letztlich die Möglichkeit gegeben war, solche Faktoren zu isolieren. So konnte ein Faktor aus HeLa-Zellen gereinigt werden, der mit einigen Enhancer-Elementen, z.B. dem Enhancer des Adenovirus 2 El-Gens und dem des Immunoglobulin schwere Kette Gens (IgH) interagiert (Sassone-Corsi et al., 1985). Einen generellen Enhancer-bindenden Faktor gibt es jedoch nicht. So kann z.B. der Polyoma Virus Enhancer nicht mit dem SV40 Enhancer in einem Transkriptionsexperiment in zellfreiem Extrakt kompetitieren, obwohl beide Enhancer sehr ähnliche Sequenzmotive beinhalten (Sassone-Corsi et al., 1985; Piette et al., 1985). Mittlerweile konnten weitere Enhancer-bindende Faktoren identifiziert werden: c-fos (Treisman, 1986; Prywes und Roeder, 1986), Octamersequenz im IgH-Gen (Singh et al., 1986), Insulin (Ohlsson und Edlund, 1986) und der Faktor AP1, der an den SV40 Enhancer und den Basal Level Enhancer des Metallothioneingens bindet (Lee et al., 1987).

Neuerdings wurden für viele eukaryontische Gene auch negative Regulationsmechanismen beschrieben, die ebenfalls auf dem Zusammenspiel von cis-wirkenden DNA-Elementen und trans-wirkenden Faktoren beruhen. Das bestcharakterisierte Beispiel eines trans-wirkenden Repressors ist das große T-Antigen von SV40, das die Synthese der frühen Virusproteine und damit auch seine eigene reprimiert (Rio et al., 1980; Myers et al., 1981). In den meisten

Fällen jedoch, wo DNA-Sequenzen mit negativem Effekt auf die Transkription beschrieben wurden, müssen die die Wirkung vermittelnden Faktoren noch identifiziert werden.

Neben diesen beobachteten generellen Kontrollmechanismen für die Expression von Genen, gibt es auch gewebespezifische. Erste Hinweise über die Existenz von gewebespezifisch wirkenden Faktoren bei der Genexpression wurden aus genetischen Studien somatischer Zellen gewonnen (Übersichtsart. Ephrussi, 1972; Weiss, 1982). Durch Zell-Fusionsexperimente wurden im Zytoplasma Faktoren gefunden, die die Expression von gewebespezifisch exprimierten Genen auslöschen oder aktivieren können (Kahn et al., 1981; Mével-Ninio und Weiss, 1981; Blau et al., 1983; Killary und Fournier, 1984; Petit et al., 1986). Es ist jedoch wenig darüber bekannt, wie diese Faktoren ihre sowohl positive als auch negative Wirkung auf die Zielgene ausüben.

Mit Gentransferexperimenten, die die Untersuchungen eines isolierten Gens in vivo erlauben, konnten etliche cis-wirkende Elemente identifiziert werden, die für die gewebespezifische Expression eines Gens verantwortlich sind. Als erstes genetisches Element, das eine Zellspezifität vermittelt, wurde der Enhancer des IgH-Gens von der Maus beschrieben (Gillies et al., 1983; Banerji et al., 1983; Mercola et al., 1983), der innerhalb des ersten Exons lokalisiert ist, also 3' vom Promotor und nur in lymphoiden Zellen funktionell ist. Inzwischen konnten für das IgH-Gen noch weitere Promotorelemente (Mason et al., 1985; Grosschedl und Baltimore, 1985) und sogar intragenische Sequenzen (Grosschedl und Baltimore, 1985) identifiziert werden, die alle zur gewebespezifischen Expression dieses Gens beitragen.

Weitere gewebespezifische cis-wirkende Elemente wurden für folgende Gene entdeckt: Ratten Chymotrypsin und Insulin (Walker et al., 1983; Edlund et al., 1985; Boulet et al., 1986), Maus Immunoglobulin k (Picard und Schaffner, 1984), Ratten Elastase (Ornitz et al., 1985), Ratten Albumin (Ott et al., 1984), Ratten Aktine (Melloul et al., 1984; Shani, 1986); Hühner Krystalline (Okazaki et al., 1985; Hayashi et al., 1985), Maus α A-Krystallin (Chepelinsky et al., 1985), Mensch Retinol Binding Protein (D'Onofrio et al., 1985); Mensch α_1 -Antitrypsin (Ciliberto et al., 1985), Huhn Lysozym (Theisen et al., 1986); Maus α -Foetoprotein (Godbout et al., 1986), Maus Albumin (Gorski et al., 1986), Wachstumshormon von Ratte und Mensch (Nelson et al., 1986; Crew und Spindler, 1986; Cattini et al., 1986) Und Drosophila Dotterprotein 1 (Garabedian et al., 1986).

Einige dieser Elemente besitzen Enhancer-Eigenschaften und konnten auf den Genen in einem Bereich von -300 bis -100 (Insulin, Chymotrypsin, Huhn α -Krystallin) oder sehr weit 5' (α -Foetoprotein, Lysozym) oder innerhalb eines Introns (IgH) lokalisiert werden. Die Gewebespezifität scheint bei einigen Genen unabhängig durch Enhancer- und Promotor-Elemente vermittelt zu werden (IgH, Insulin, Drosophila Dotterprotein), während sie bei anderen nur durch die Kombination beider Elemente erreicht wird (α -Foetoprotein). Bei vielen Genen ist ein kurzes Promotorelement von 100 bis 200 bp ausreichend für die gewebespezifisch regulierte Expression (δ -Krystallin, Elastase, Albumin).

Bisher wurden also etliche Enhancer und Regulationselemente beschrieben, die für die gewebespezifische Regulation von Genen

verantwortlich sind oder dazu beitragen. Allerdings konnte bisher kein genereller Regulationsmechanismus beschrieben werden. Die Gewebespezifität von Genen scheint auf einem sehr komplexen System aus Faktoren und Elementen zu basieren. Ein Ansatz, mehr Einblick in solche komplexe Mechanismen zu gewinnen, könnte die Analyse eines Gens in einem heterologen, aber dennoch gewebespezifischen System darstellen, zum Beispiel die Untersuchung der gewebespezifischen Regulation eines Froschgens in Säugerzellen. Möglicherweise könnten damit sehr wichtige konservierte Regulationsmechanismen entdeckt werden.

Das Albumin, das häufigste Plasmaprotein in Vertebraten (Übersichtsart. Rosenoer et al., 1977), stellt ein gutes Modellgen zur Untersuchung der gewebespezifischen Regulation und der damit involvierten Faktoren dar. Es wird in großen Mengen ausschließlich nur in einem Gewebe, der Leber, synthetisiert und sezerniert. Die Albuminexpression in einigen Amphibienspezies wird im Gegensatz zu Säugern durch verschiedene Faktoren moduliert. So erhöht sich während der Metamorphose die Menge an Albumin mRNA um das Zehnfache (Ledford und Frieden, 1973); dies wird wahrscheinlich durch das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T_3) ausgelöst (Ryffel, unveröffentlicht). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Östrogen die Albuminsynthese drastisch reduziert (Kazmeier et al., 1985; Wolffe et al., 1985).

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Vertebraten zwei Albumingene, die für ein 68kd und 74kd Albuminprotein kodieren. Vermutlich ist das Albumin als Teil einer Genomduplikation, die vor ca. 30 Millionen Jahren stattfand, verdoppelt worden (Bisbee et al., 1977). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Klonierung von DNA (cDNA), die zu zwei engverwandten Albumin mRNAs komplementär ist (Westley et

al.,1981). Außerdem besitzt *Xenopus tropicalis*, der vermutlich dem diploiden Vorfahren des *Xenopus laevis* sehr ähnlich ist, nur ein Albumin mit einem Molekulargewicht vom 68kd (Bisbee,1977; Westley und Weber,1982).

Nach dieser Genomduplikation haben sich die beiden entstandenen Gene so auseinander entwickelt, daß sie nun für zwei Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts kodieren und unterschiedlich exprimiert werden. Der Unterschied im Molekulargewicht dieser beiden Proteine ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß das 74kd Albumin im Gegensatz zum 68kd Albumin glykosyliert ist. Das Translationsprodukt des 74kd Albumin ist nur gerigfügig größer als das des 68kd Albumins (Westley und Weber,1982). Das 74kd Albumin ist im Blut des *Xenopus laevis* zweimal häufiger vertreten als das 68kd Albumin, was darauf zurückzuführen ist, daß die Leber zweimal mehr 74kd mRNA enthält (Westley et al.,1981).

Um die Regulation dieser Albumingene und ihre Unterschiede genau zu untersuchen wurden beide Gene isoliert (May et al.,1982). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Gene zeigten, daß beide 15 Exons besitzen. Die Größen der sich entsprechenden Exons beider Gene sind jeweils fast identisch und sehr ähnlich zu denen der Säugergene. Für die *Xenopus* Albumingene wurde ein ähnliches Muster an wiederholten Exonbereichen gefunden, das bereits schon für das Maus Albumingen entdeckt wurde (May et al.,1983): Im Maus Albumingen bestehen die mittleren 12 der 15 Exons aus einer dreifachen Wiederholung von 4 Exons (Kioussis et al.,1981). Durch Sequenzierung dieser Bereiche im Rattenalbumingen konnte gezeigt werden, daß diese drei aus 4 Exons bestehenden wiederholten Bereiche den drei Strukturdomänen des Serumalbumins entsprechen (Jagodzinski et al., 1981). Aufgrund der Aminosäuresequenz wird vermutet, daß Albumin aus zwei intragenischen Duplikationen einer

primitiven Domäne hervorgegangen ist (Brown, 1976).

Die Albuminvorläufergene der Amphibien und der Säuger haben sich wahrscheinlich erst nach der Evolution der 15 Exon-Struktur weiter auseinander entwickelt (May et al., 1983). Bei den Säugern folgte eine Genomduplikation, durch die das heutige Albumin und α -Foetoproteine entstanden sind (Ingram et al., 1981), während beim Ur-Xenopus eine Genomduplikation zur Entstehung der beiden Albumingene des *Xenopus laevis* führte.

Bei den Säugern werden die beiden engverwandten Albumin- und α -Foetoproteingene entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert. Im Fötus ist das α -Foetoprotein das vorherrschende Protein sowohl in der Amnionflüssigkeit als auch im Serum. Nach der Geburt sinkt im Serum der Anteil an α -Foetoprotein drastisch ab, während die Albuminsynthese um ein Vielfaches ansteigt und das Albumin die Rolle des α -Foetoproteins als Hauptserumprotein übernimmt (Übersichtsart. Tilghman, 1985).

Beim *Xenopus laevis* werden die beiden Albumingene ebenfalls gewebespezifisch in der Leber exprimiert.

Ziel meiner Dissertation war die Definition von DNA-Elementen, die die gewebespezifische Expression der Albumingene des *Xenopus laevis* vermitteln.

Um solche cis-wirkende Elemente zu erfassen, mußte zunächst im ersten Teil meiner Arbeit, das 5'Ende beider Gene charakterisiert werden. Durch Sequenzierung und auf diesen Daten basierenden Untersuchungen der Albumin mRNAs in vivo sollten Promotorregion und Exonsequenzen kartiert werden. Anhand der Sequenzdaten sollten auch Aussagen über die Verwandtschaft der beiden *Xenopus* Albumingene untereinander und zu den Albumin- und α -Foetoproteingenen der Säuger gemacht werden können.

Aufgrund der erhaltenen Daten über die Feinstruktur der Gene war es schließlich möglich Albuminhybridgene zu konstruieren. Diese Hybridgene wurden dann im zweiten Teil der Arbeit zur Identifizierung von Regulationselementen für die konstitutive und gewebespezifische Expression der Gene eingesetzt.

MATERIALIEN

1. Chemikalien, Radioisotope und Arbeitsmittel

Acetyl Coenzym A	Pharmacia, Freiburg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Actinomycin D	Sigma, München
Agarose Typ II, Typ IV	Sigma, München
Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten (9cm)	Greiner, Nürtingen
Bal31-Exonuklease	Gibco-BRL, Karlsruhe
Biogel P60	BioRad, München
Caesiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma, München
desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
didesoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	Gibco-BRL, Karlsruhe
DNA Sequencing Kit	New England Nuclear, Dreieich
DNase (RQ ₁ , RNase frei)	Genofit, Heidelberg
DNA Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Schwalbach
Ethidiumbromid	Sigma, München
Eucaryotic Transcription System	Gibco-BRL, Karlsruhe

FCS	Gibco, Karlsruhe
	Fluka, Frankreich
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glasplatten für Elektrophorese	Renner, Dannstadt
Haftsilan	Wacker Chemie, München
Harnstoff	BioRad, München
HEPES	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Machery und Nagel, Düren
Lachs-Spermien DNA, Typ III	Sigma, München
Linker-DNA	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
M-MLV Reverse Transkriptase	Gibco-BRL, Karlsruhe
M13-Pentadecamer (Primer)	New England Biolabs, Schwalbach
MS 222	Sigma, München
NACS-Prepac-Säulen	Gibco-BRL, Karlsruhe
Nitrozellulose-Filter	Schleicher & Schüll, Dassel
N,N'-Methylen-bisacrylamid	BioRad, München
Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (10U/ μ l)	Gibco, Karlsruhe
Polyethylenglycol	Sigma, München
PIPES	Sigma, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PVP	Sigma, München
Quickszint	Zinsser, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	ABL, Basel
	Boehringer, Mannheim
	Gibco-BRL, Karlsruhe
	Promega Biotec, Heidelberg
	Pharmacia, Freiburg

RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase T ₁	Sigma, München
RNasin	Promega Biotec, Heidelberg
transfer-RNA (Kalbs-Leber)	Boehringer, Mannheim
SP6 RNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4 Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Schwalbach
TEMED	BioRad, München
Tris	Sigma, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Whatman GF/C-Filter	Bender und Hobein, Karlsruhe
Whatman 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Falcon, Becton u. Dickinson, Heidelberg

D-threo-(dichloroacetyl-1- ¹⁴ C)- Chloramphenicol (7.4MBq/ml, 1.96 GBq/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
γ - ³² P ATP (370MBq/ml, >185 TBq/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
α - ³² P GTP (370MBq/ml, >15 MBq/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
α - ³² P UTP (370MBq/ml, >110 MBq/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
α - ³⁵ S dATP (296MBq/ml, >14.8TBq/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig

2. Bakterien und Zellen

Bakterien und Phagen

- E. coli RR1 M15 F⁻, hsd S20, ara-14, pro A2, lac Y1, ton A21,
sup E44, λ⁻;
erhalten von U. Rüter, Heidelberg
- E. coli 71/18 F', lacJ, lacZ, M15, pro⁺, sup E;
erhalten von R. Cortese, Heidelberg
- Phage IR-I erhalten von R. Cortese, Heidelberg

Eukaryontische Zellen

- BWIJ Subklon der Maus Hepatoma-Zelllinie BW (Szpirer
und Szpirer, 1975), isoliert von Cassio und
Weiss (1979)
erhalten von M.C. Weiss, Paris
- LTK⁻ Maus-L-Zellderivat, Thymidinkinase-Defekt,
tumorigen
erhalten von N. Hynes, Bern
- NIH 3T3 entspricht der 3T3-Zelle der American Type
Culture Collection; zeigt Dichte-abhängige
Wachstumskontrolle
erhalten von P. Gruss, Heidelberg

3. Kulturmedien

L-Broth:

2% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 1% NaCl

SOB-Medium:

0.5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bacto-Trypton, 10mM NaCl,
2.5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄

SOC-Medium:

SOB mit 20mM Glucose

EMB-Agar:

1% Bacto-Trypton, 0.1% Bacto-Hefeextrakt, 0.5% NaCl,
2% Lactose, 0.05% K₂HPO₄, 0.1% Eosin Y, 0.0016% Methylen-
blau, 1.5% Bacto-Agar

Minimal-Platten:

1% K₂HPO₄, 0.45% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 1.05%
NaCitratx2H₂O; 0.02% MgSO₄, 0.0005% Vitamin B₁,
0.01% Casaminoacids, 0.1% Glycerin, 1.5% Bacto-Agar

Bakterien-Selektionsmedium:

L-Broth mit 100µg/ml Ampicillin

Kulturmedium für BWIJ-Zellen:

modifiziertes Ham Fl2 Medium (Coon and Weiss, 1969) mit
5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium für LTK-- und NIH3T3-Zellen:

DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

METHODEN

ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

1. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer wäßrigen Lösung wurde über deren optische Dichte bestimmt. Dazu wurde ein Spektrum von 320 bis 220 nm aufgenommen. Einer $OD_{260} = 1$ entsprechen $50\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA, $40\mu\text{g/ml}$ RNA oder $20\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid DNA. Aus dem Verlauf des Spektrums wird die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung ersichtlich: die OD_{280} sollte höchstens 70% der OD_{260} betragen.

2. Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen führt man eine Phenol/Chloroform-Extraktion durch.

Das Extraktionsvolumen sollte mindestens $50\mu\text{l}$ betragen. Ein Volumen nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit einem gleichen Volumen Phenol (gesättigt mit 100mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA) und einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) kräftig durchgemischt und kurz zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige Oberphase wurde noch zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

3. Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit NaAc pH4.8 oder mit NaCl auf eine Endkonzentration von 0.2M gebracht und mit 2.5fachem Volumen absolutem Ethanol oder mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer angemessenen Inkubationszeit von 30min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C wurden die ausgefallenen Nukleinsäuren 10min bei 8800xg abzentrifugiert, in 80%igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend unter Vakuum getrocknet.

DNA KLONIERUNGSTECHNIKEN

1. Restriktionsverdau

Eine Enzymeinheit ist definiert als die Menge Enzym, die 1µg Lambda Phagen DNA in einer Stunde vollständig verdaut. Meist wurde pro µg DNA ein 2-3facher Überschuß an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Bis auf wenige Ausnahmen wurde für die meisten Enzyme als Reaktionspuffer O'Farrells Universalpuffer (3.3mM TrisAcetat pH7.9, 6.6mM KAcetat, 10mM MgAcetat, 0.05mM DTT und 10µg/ml nuklease-freies BSA) bei 37°C verwendet. Das Volumen betrug 10µl/µg zu verdauender DNA. Ansonsten wurden die vom Hersteller für jedes Enzym individuell empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen eingehalten.

2. Herstellung von Bal31-Deletionen

25µg geschnittene und gereinigte Plasmid DNA wurde in 300µl Bal31-Puffer (12mM CaCl₂, 12mM MgCl₂, 600mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1) mit 6 Einheiten Bal31 bei 37°C inkubiert. In 30s-Abständen wurden dem Reaktionsgemisch je 75µl entnommen; diese wurden mit EGTA zu einer Endkonzentration von 20mM versetzt. Auf diese Weise wurden Deletionen von 4 Zeitpunkten erhalten, deren Größen sich um ca. 100Bp unterschieden. Durch Variation der Zeitabstände konnten entsprechend unterschiedlich große Deletionen erzielt werden. Die deletierten DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und nachfolgende Ethanol-fällung gereinigt.

3. Auffüllen von 5'Überhängen

1µg gereinigte Plasmid-DNA wurde in 10µl 7mM Tris-HCl pH7.5, 7mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT mit 0.2-0.5U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) für 5min bei Raumtemperatur vorinkubiert, anschließend mit 0.5µl dNTP-Mix (10mM dNTPs). Nach 30min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1µl 0.2M EDTA pH8.0 abgestoppt. Durch Phenol-Extraktion und anschließende Extraktion mit Ether wurde die DNA gereinigt, und schließlich mit Ethanol ausgefällt.

4. Dephosphorylierung von DNA

4.1. 5'Überhänge

Restriktionsverdauete, gereinigte DNA wurde mit 4 Einheiten alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm in 50µl 50mM Tris-HCl

pH9.0, 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 1mM Spermidin 60min bei 37°C inkubiert. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurden weitere 4 Einheiten Enzym zugegeben.

4.2. 3'Überhänge und blunt end DNA (DNA mit stumpfen Enden)

Die Inkubation erfolgte 15min bei 37°C gefolgt von 15min 56°C ; nach erneuter Enzymzugabe wurde dies noch einmal wiederholt. Sonst waren die Bedingungen wie oben beschrieben.

5. Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung wurden je nach Größe der Fragmente Agarosegele (Fragmente größer als 0.6kb) oder Polyacrylamidgele (Fragmente kleiner als 0.6kb) verwendet.

5.1. Agarosegel

0.8% bis 2% Agarose Typ II oder Typ VII (low gelling temperature) wurden in 50ml Laufpuffer (40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 20mM NaAcetat pH8.2) durch Erhitzen gelöst und der Gellösung wurden 0.3µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Gellösung wurde in eine 7.5x13.5cm große Kammer gegossen und mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen zum Auftrag der Proben ausgespart. Das Gel wurde mit Laufpuffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100V. Über einem UV-Lichtkasten (320nm) konnten die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und photographiert werden.

5.2. Polyacrylamidgel

Es wurden 6%ige Acrylamidgele aus einer Stammlösung mit 29 Gew.% Acrylamid und 1 Gew.% N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Die Endkonzentrationen im Gel waren: 90mM Tris, 90mM Borsäure, 2.5mM EDTA pH 8.3 , 0.03% TEMED und 0.07% Ammoniumperoxodisulfat. Die

Gele waren 12x15cm groß und 0.1cm dick. Die verwendete Gelapparatur entsprach der Vorschrift von Studier (1972). Die Elektrophorese erfolgte in 90mM Tris, 90mM Borsäure, 2.5mM EDTA pH8.3 bei 120-300V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15min in Laufpuffer mit 1µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, um dann die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen.

Für beide Gelarten wurden die DNA-Proben in 10% Glycerol, 10mM EDTA, 0.1% SDS und 0.02% Bromphenolblau aufgetragen.

6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

6.1. aus Agarosegelen

Die DNA wurde in einem Agarosegel Typ VII (low gelling temperature) aufgetrennt. Das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wurde ausgeschnitten und 10min bei 68°C geschmolzen, mit dem 4fachen Volumen 0.25M NaCl in TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) versetzt und nochmals 10min bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf 42°C abgekühlt und über eine NACS Prepac Säule geschickt. Die Säule war zuvor mit 3ml 2M NaCl in TE hydratisiert und mit 5ml Bindungspuffer äquilibriert worden. Der Bindungspuffer bestand für doppelsträngige Fragmente von weniger als 1kb Größe aus 0.2M NaCl in TE und bei Fragmenten größer als 1kb aus 0.5M NaCl in TE. Die DNA-Lösung wurde zweimal über die Säule geschickt, um sicherzustellen, daß das zu reinigende Fragment möglichst quantitativ an die Säule gebunden wurde. Anschließend wurde die Säule mit 5x 1ml 42°C warmem Bindungspuffer gewaschen. Das gebundene Fragment wurde dann mit 4x 100µl Elutionspuffer (1M NaCl oder 2M NaCl in TE) abgelöst und mit 800µl Isopropanol gefällt.

6.2. aus Polyacrylamidgelen

Die DNA wurde über Nacht bei 50°C (Oligonukleotide bei 37°C) aus dem Gelstück in 0.2M NaCl in TE oder in H₂O eluiert und anschließend über eine NACS Prepac Säule wie oben beschrieben gereinigt.

7. Ligation

7.1. in wäßriger Lösung

Die DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und mit 0.1 Einheiten T4 DNA Ligase pro pmol Enden versetzt. Die Inkubation erfolgte in 20-50µl 20mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 250µg/ml BSA und 3mM ATP bei 15°C für mindestens 3h.

7.2. im Agarosegel

Häufig wurden die DNA-Fragmente nicht erst aus dem Gel isoliert, sondern noch im Gel ligiert. Dazu wurden die DNAs in Agarose Typ VII (low gelling temperature) aufgetrennt, ausgeschnitten und die miteinander zu ligierenden Fragmente zusammengegeben. Anschließend wurden die Gelstücke 10min bei 68°C geschmolzen, auf 42°C abgekühlt, mit Reaktionspuffer und mit T4 DNA Ligase versetzt. Die Reaktion erfolgte unter sonst gleichen Bedingungen wie oben beschrieben nur in einem etwas größeren Volumen (50-150µl).

7.3. Ligation von Linkern

1µg Linker wurden mit 5 Einheiten Polynukleotidkinase in Anwesenheit von 10mM ATP phosphoryliert. Die Inkubation erfolgte in 10µl 70mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂ über 60min bei 37°C.

2µl dieser phosphorylierten Linker wurden zu 1µg gereinigter blunt end DNA gegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15°C in 10µl 70mM Tris-HCl pH 7.5, 7mM MgCl₂, 0.07mM ATP mit 1 Einheit T4 DNA Ligase. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde die Reaktionsmischung anschließend 10min bei 68°C inkubiert. Durch einen nachfolgenden Restriktionsverdau wurden die Linkerketten getrimmt. Dazu wurde die abgekühlte Reaktionslösung auf das doppelte Volumen gebracht und mit konzentriertem Enzympuffer auf die für das jeweilige Restriktionsenzym notwendige Salzkonzentration gebracht. Der Restriktionsverdau wurde mit 40-60 Einheiten Enzym über 3h durchgeführt. Auf einem Agarosegel wurde die DNA von den überschüssigen Linkern abgetrennt.

8. Klonierung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden auf einem Gene Assembler von Pharmacia nach Gebrauchsanweisung synthetisiert. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden über Nacht in 1ml 25% Ammoniak aus der Kassette losgelöst. Je 1µl der beiden komplementären ammoniakalischen Oligonukleotidlösungen wurden zusammen in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100µl 6.25mM Tris-HCl pH8.5, 3mM MgCl₂ gelöst. Davon wurde eine 1:50 Verdünnung im gleichen Puffer zur Annealing-Reaktion auf 100°C gebracht und anschließend langsam auf 30°C abkühlen lassen. 2µl von diesem Annealing-Ansatz wurden mit 100ng Vektor in 40µl Volumen nach Standardprotokoll ligiert.

9. Transformation von Bakterien

Je nach Klonierungsabsicht und dem entsprechend verwendeten Bakterienstamm erwiesen sich unterschiedliche Transformationsprotokolle als optimal. Zur Erzielung einer besonders hohen Transformationseffizienz (z.B. zur Klonierung von Bal31-Deletionen) wurden Bakterien des Stammes E.coli RRI M15 nach dem Protokoll von Hanahan (1983) transformiert. Während zur Transformation von sauberer Plasmid DNA (z.B. zur Gewinnung von einzelsträngiger DNA) Bakterien des Stammes E.coli 71/18 mit der CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1973) transformiert wurden.

9.1. nach Hanahan (1983)

Eine Einzelkolonie E.coli RRI M15 wurde in 10ml SOB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C unter konstantem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden davon 0.1ml in 50ml SOB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.45-0.55 wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien in 10ml Portionen bei 4°C und 670xg abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 3.3ml TFB (10mM K-MES pH6.2, 100mM RbCl, 45mM MnCl₂, 10mM CaCl₂ und 3mM HexaminCoCl₃) resuspendiert und 10-15min auf Eis gehalten. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 0.8ml TFB aufgenommen und weiterhin auf Eis inkubiert. In 5minütigen Abständen wurden die Zellen mit je 28µl DMSO, 28µl DTT (2.25M) und weiteren 28µl DMSO versetzt.

210µl dieser nun kompetenten Bakterienzellen wurden mit 2-5µl eines Ligationsansatzes (mit höchstens 100ng DNA) versetzt und 30min auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Gemisch 90s bei 42°C und 1-2min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 0.8ml SOB-Medium

zugegeben und der Transformationsansatz wurde 60min bei 37°C konstant geschüttelt. Nach Zugabe von 2ml SOC-Medium wurden die Bakterienzellen 5min bei 670xg abzentrifugiert, in 0.2ml SOB-Medium resuspendiert und auf Selektivagarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert.

9.2. nach der CaCl₂-Methode

Eine Einzelkolonie wurde über Nacht in 10ml LB-Medium bei 37°C hochwachsen gelassen. 1ml dieser Übernachtskultur wurde in 100ml LB-Medium verdünnt und anschließend bei 37°C bis zu einer OD₆₆₀ von 0.2 inkubiert. Die Bakterienzellen wurden 10min bei 4°C mit 1500xg abzentrifugiert, in eiskaltem 100mM CaCl₂ resuspendiert und 30min auf Eis stehen gelassen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Bakterienzellen in 1ml eiskaltem 100mM CaCl₂ aufgenommen.

Zur Transformation wurden 100µl der kompetenten Zellen mit 10-100ng der zu transformierenden DNA oder mit 10 und 40 Vol% eines Ligationsansatzes 15min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz 2min auf 37°C erwärmt, mit 0.5ml LB-Medium versetzt, 2min bei 42°C und schließlich 45min bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe von Top-Agar (0.8% Agar in H₂O) wurden die transformierten Bakterien auf Selektivagarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

10. Präparation von einzelsträngiger DNA aus rekombinaten

EMBL-Plasmiden (Dente et al., 1983)

Bakterien des Stammes E.coli K12 71/18 wurden mit den Plasmiden nach dem oben beschriebenen Protokoll transformiert, jedoch wurde bei der Herstellung der kompetenten Zellen von einer

Einzelkolonie ausgegangen, die auf Glucose/Minimalagarplatten gewachsen war. Auf Minimalmedium können nur solche Bakterien wachsen, die noch das Plasmid besitzen, das ein für die Prolinsynthese nötiges Gen trägt. Auf diesem Plasmid ist gleichzeitig auch die Information für die F-Pili-Synthese gespeichert. Durch die Vorselektion wird also gewährleistet, daß die zu transformierten Bakterien alle F-Pili besitzen. Über diese F-Pili können die Bakterien mit Helferphagen infiziert werden, mit deren Hilfe dann von den transformierten pEMBL-Plasmiden einzelsträngige DNA synthetisiert werden kann (siehe Übersichtsart. von Messing, 1983).

10.1 Titration und Vermehrung der Helferphagen

Eine Stocklösung von IR-I Phagen wurde in 10er Schritten in LB-Medium verdünnt und mit 0.2ml einer frischen E.coli K12 71/18 Kultur, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0.2 gewachsen war, auf EMB-Agarplatten (Marvin and Hohn, 1969) ausgestrichen. Dieser farbstoffenthaltende Agar erwies sich als besonders geeignet, die kleinen trüben Phagenplaques besser sichtbar zu machen.

Zur Herstellung eines größeren Phagenstocks wurde ein einzelner Plaque (auf E.coli K12 71/18) mit 1ml LB-Medium 3h bei 37°C inkubiert und anschließend in 200ml LB-Medium verdünnt. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wurden die Bakterienzellen bei 3500xg abzentrifugiert, der die Phagen enthaltende Überstand titriert und schließlich bei 4°C aufbewahrt.

10.2. Gewinnung der einzelsträngigen DNA

Von einer rekombinanten Bakterienkolonie wurde eine 5ml

Übernachtskultur in LB-Medium mit 100µg/ml Antibiotikum angesetzt. Davon wurden 0.1ml auf 5ml LB-Medium mit 100µg/ml Antibiotikum verdünnt und bis zu einer OD₆₆₀ von 0.2 wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 20 mit dem Helferphagen IR-I infiziert (ca. 4x10⁹ Phagen/ml) und 6h unter Schütteln weiterinkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz je 2x 1.5ml Bakterien- und Phagensuspension 10min bei 8800xg zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, ein zweites Mal zentrifugiert und 1.2ml dieses Überstandes wurden mit 150µl 20% PEG, 2.5M NaCl versetzt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Phagen 10min bei 8800xg abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und die präzipitierten Phagenpartikel wurden nochmals kurz zentrifugiert. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wurde der restliche Überstand vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde in 200µl 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA aufgenommen und 30-60min bei Raumtemperatur lösen gelassen. Anschließend wurde durch eine Extraktion mit 100µl Phenol (gesättigt mit 100mM Tris-HCl pH 9.0, 10mM EDTA) die Proteinhülle der Phagen entfernt. Die wäßrige, einzelsträngige DNA enthaltende, Oberphase wurde 2x mit 200µl Chloroform extrahiert. Die einzelsträngige DNA wurde schließlich in Gegenwart von 0.4M LiCl mit 2.5 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach 10min Zentrifugation mit 8800xg wurde die DNA noch einmal mit 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 30 µl 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA aufgenommen. Um die Ausbeute an einzelsträngiger DNA und deren Qualität abzuschätzen, wurden 5µl der DNA-Lösung auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Das Verhältnis der produzierten einzelsträngigen DNA zur Helferphagen DNA sollte 2:1 betragen.

11. Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien

11.1. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA

1.5ml einer Übernachtskultur (in L-Broth mit 35µg/ml Ampicillin) wurden mit 8800xg zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100µl Lysozylösung (2mg/ml Lysozym, 50mM Glucose, 10mM EDTA und 25mM Tris-HCl pH8.0) resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200µl alkalische SDS-Lösung (0.2M NaOH, 1% SDS) zugegeben, 5min stehen gelassen, mit 150µl 3M NaAcetat versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Nach 5min Zentrifugation mit 8800xg wurde der Überstand mit 1ml Ethanol versetzt, die Plasmid-DNA 30min bei -80°C ausgefällt und schließlich 10min mit 8800xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 100µl 50mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaAcetat aufgenommen und erneut mit Ethanol gefällt. Nach 10min Inkubation bei -80°C wurde die Plasmid DNA abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 50µl 10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA aufgenommen.

11.2. Präparation von großen Mengen Plasmid DNA (Birnboim und Doly, 1979)

200ml einer Bakterien Übernachtskultur wurden bei 4°C mit 3600xg abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10ml Lysozylösung aufgenommen, 30min auf Eis inkubiert, mit 20ml alkalischer SDS-Lösung versetzt, 5min weiterinkubiert und schließlich wurden 15ml 3M NaAcetat pH4.8 zugegeben. Nach 60min Inkubation auf Eis wurden die Zellfragmente und die hochmolekulare DNA 10min bei 4°C mit 16800xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100ml Ethanol versetzt und 30min bei -80°C inkubiert. Die ausgefallene

Plasmid DNA wurde 10min bei 4°C mit 10800xg abzentrifugiert und in 10ml 50mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaAcetat resuspendiert. Nochmals wurde die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt und schließlich in 50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA aufgenommen. Zur DNA-Lösung wurde CsCl zu einer Endkonzentration 4.2M und 0.5ml einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) gegeben. Diese Lösung wurde in einem Beckman Vertikalrotor Typ 65 16h mit 55000rpm zentrifugiert. Durch das CsCl bildete sich ein Dichtegradient aus, in dem die Plasmid-DNA von der verbliebenen genomischen DNA entsprechend ihrer verschiedenen Auftriebsdichten getrennt wurde. Die plasmidhaltige Bande wurde mit einer Spritze abgezogen und erneut unter denselben Bedingungen 6h zentrifugiert. Wiederum wurde die plasmidhaltige Bande abgezogen, mit 2 Volumen H₂O verdünnt, dreimal mit H₂O gesättigtem Butanol extrahiert und ohne Salzzugabe mit Ethanol gefällt.

11.3. Spezielle Präparation von Plasmid-DNA zur Transfektion von eukaryontischen Zellen (Maniatis et al., 1982)

0.5ml einer Übernachtskultur wurden in 500ml LB-Medium mit 35µg/ml Antibiotikum angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-0.7 wachsen gelassen. Dann wurde, um die Plasmide zu amplifizieren, 10µg/ml Tetrazyklin für CAT-Plasmide oder 170µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Bakteriensuspension 10min bei 4°C mit 3600xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5ml 50mM Tris-HCl pH8.0, 25% Saccharose aufgenommen, in ein Polyallomer-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5ml 2mg/ml Lysozym, 100mM EDTA, 0.1% Triton X-100 versetzt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur und weiteren 10min bei 70°C wurden die Zellfragmente von der Plasmid-DNA durch 60min Zentrifugation im Beckmanrotor SW40 oder SW40.1 bei 40000rpm und

4°C getrennt. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit 10ml 20% PEG, 1M NaCl in TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) 30-90min bei Raumtemperatur ausgefällt und anschließend 5min bei 2400xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3ml TE 30-60 min bei 37°C lösen gelassen. Nach Zugabe von 4.2g CsCl und 250µl einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) wurde ebenfalls eine Dichtegradienten-Zentrifugation wie oben beschrieben durchgeführt. Nach den zwei Zentrifugations-Schritten wurde die Plasmid-DNA mit gleichem Volumen Butanol (gesättigt mit 1M NaCl) solange extrahiert, bis alles Ethidiumbromid entfernt worden war (ca. 4-5x). Dann wurde die Plasmid-Lösung gegen 1 Liter 10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA 16-24h dialysiert. Der Puffer wurde 2x gewechselt. Wenn das Volumen nach der Dialyse zu groß war, wurden die Plasmide mit Ethanol gefällt.

VERSUCHE MIT XENOPUS LAEVIS

Die Tiere wurden von der South African Snake Farm (Fish Hoek, Cape Province, Südafrika) bezogen

1. Präparation von polyA⁺-RNA aus der Froschleber

Zur Isolierung von RNA wurde ein Xenopus-Männchen in MS222 (1:200) narkotisiert. Die Leber wurde herauspräpariert und in einer Petrischale mit etwas Homogenisationsmedium (HM: 10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.0, 1.5mM MgCl₂, 50% Glycerin) überführt. Die Leber wurde in kleine Stücke zerschnitten und je eine Hälfte in 20ml HM mit 40mg Hefe-RNA in Eis kurz homogenisiert. Bei -20°C wurde kurz weiter homogenisiert, 100µl 10% Triton X-100 in Glycerin zugegeben und noch einmal homogenisiert. Die Suspension wurde 10min bei -20°C bei 10800xg zentrifugiert, um die Zellkerne zu sedimentieren. Der Überstand wurde zu 30ml Extraktionspuffer (0.15mM Tris-HCl pH9.0, 5mM EDTA, 0.1% SDS) gegeben, sofort mit 40ml Phenol (gesättigt mit 0.5M Tris-HCl pH8.0) versetzt und 30-120min bei 4°C geschüttelt. Die Lösung wurde dann auf zwei 50ml Zentrifugenröhrchen verteilt und 5min bei 2700xg zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit einer Spritze abgesaugt und erneut mit 80ml Phenol/Chloroform 10min bei 4°C geschüttelt. Nach 5min Zentrifugation bei 2700xg wurde die wäßrige Phase erneut mit 40ml Phenol/Chloroform geschüttelt und abzentrifugiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit 1ml 5M NaCl versetzt und die RNA mit 2 Volumen Ethanol ausgefällt.

Zur Isolierung der polyA⁺-haltigen RNA wurde die nach der obigen Methode präparierte RNA über eine Säule mit polyU-Sepharose geschickt.

Die Säule wurde mit 1ml gequollener polyU-Sepharose in Bindungspuffer (BB: 0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4, 10mM EDTA, 0.5% SDS) gepackt und mit BB gespült. Dann wurde die Säule mit mindestens 10ml Elutionspuffer gewaschen (EB: 1 Vol. 10mM Tris-HCl pH7.4, 10mM EDTA und 9 Vol. umkristallisiertes Formamid) und anschließend wieder mit BB äquilibriert.

Die ausgefällte RNA wurde 10min bei 10800xg sedimentiert und getrocknet. Das RNA-Sediment wurde in 7ml BB gelöst und auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Der Durchfluß wurde als polyA⁺-RNA gesammelt. Sobald die RNA-Lösung in die Säule eingedrungen war, wurde mit einem halben Bettvolumen BB gespült. Nach erneutem Spülen wurde die Säule 3x mit einem Bettvolumen gewaschen. Dann wurde sie mit ca. 1.5ml EB überschichtet. Nun wurde der Durchfluß als polyA⁺-haltige RNA in Plastikröhrchen gesammelt. Diese Lösung wurde sofort mit 1/10 Volumen 1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4 versetzt und die RNA mit 3 Vol. Ethanol ausgefällt. Die gefällte polyA⁺-RNA wurde 30min bei 4°C und 16700xg abzentrifugiert, in 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 0.5 ml 0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4 (NT) gelöst und nochmals mit 2.5 Vol. Ethanol ausgefällt.

2. Microinjektion von Plasmid-DNA in Xenopus Oocyten-Kerne (Kressman und Birnstiel, 1980; Etkin und DiBerardino, 1983).

Einem geschlechtsreifen, narkotisierten (mit MS 222, 1:200) Xenopus-Weibchen wurde ein Teil des Ovars entnommen. Das Ovarteil wurde in MBS-H (88mM NaCl, 1mM KCl, 0.33mM Ca(NO₃)₂, 0.41mM

CaCl₂, 0.82mM MgSO₄, 2.4mM NaHCO₃, 10mM HEPES pH7.4, 100U Penicillin/ml, 100µg Streptomycin/ml) in kleine Stücke zerteilt. Große Oocyten wurden ausgelesen und in neues Medium gegeben.

Um genau in den Kern zu injizieren, wurde eine Vorbehandlung nach Kressman et al.(1977) durchgeführt. Die Oocyten wurden in eine 6cm Petrischale mit 3ml Medium auf ein Nylongitter übertragen und 12min bei 800xg zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wird der Zellkern zur Oberfläche gebracht, so daß direkt in den Zellkern injiziert werden kann. Zur Injektion wurden Mikrokapillaren mit einem Durchmesser von 20-30µm benutzt. In der Regel wurden 40-60 Oocyten mit je 50nl DNA-Lösung (2µg/100µl) injiziert.

Die injizierten Oocyten wurden in Kulturschalen mit frischem Medium gegeben und 20-24h bei 25°C inkubiert. Dann wurden die intakten Oocyten ausgelesen. Schließlich wurden ca. 20 Stück in 10µl 0.25M Tris-HCl pH7.8 /Oocyte aufgenommen. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Oocyten zerdrückt.

2.1. Extraktion von RNA aus injizierten Oocyten

150µl Oocytenhomogenat wurde mit 2ml 2xSET (0.3M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA), 1% SDS und 1mg/ml Proteinase K vermischt und 30min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 2ml Phenol/Chloroform (1:1, gesättigt mit 0.5M Tris-HCl pH8.5) 30min im Kühlraum geschüttelt. Nach 5min Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 2700xg wurde die wäßrige Phase abgenommen und mit Ethanol ausgefällt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend mit 16800xg abzentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 500µl dest. H₂O aufgenommen und ihre Konzentration bestimmt.

2.2. Extraktion von Proteinen

Das restliche Oocytenhomogenat wurde 10min mit 10800xg zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen transferiert. Zur Bestimmung der CAT-Aktivität wurden 5µl dieses Überstandes eingesetzt.

ZELLKULTUR

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen (Durchmesser 90mm) unter 6% CO₂ in einem Brutschrank bei 37°C gezogen. Den Zellen wurde je 9cm Kulturschale 10ml Medium zugesetzt, das alle 3-4 Tage gewechselt wurde. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und rekultiviert.

Für die Hepatomazellen waren besondere Kulturbedingungen erforderlich: modifiziertes Ham's Fl2-Medium (siehe Materialien), Serum von sehr guter Qualität, das eine Plattierungseffizienz von 80-100% gewährleistet, und Gewebekulturartikel von der Firma Falcon.

1. Trypsinbehandlung

Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 5ml 0.05%igem Trypsin gewaschen und mit weiteren 5ml 0.05%igem Trypsin abgespült. Die abgelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit dem gleichen Volumen an Kulturmedium überführt und 3min mit 250xg abzentrifugiert.

2. Rekultivierung

Das Zellsediment wurde in 10ml Kulturmedium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Hepatomazellen wurden in der Regel mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² ausgesät, jedoch nie unter 8×10^3 Zellen/cm².

Die Hepatomazellen wurden nicht länger als 2 Monate in Kultur gehalten.

3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen von einer 9cm Gewebekulturschale wurden abtrypsiniert, zentrifugiert und in 1ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und zunächst 30min auf Eis stehen gelassen, 24h bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Aufgetaut wurden die Zellen sehr rasch bei 37°C , in 10ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

4. Transiente Transfektion

4.1. Transfektion

Die Transfektion wurde nach der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik (Graham und van der Eb, 1973 ; modifiziert von Wigler et al., 1979) durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, daß sie bei der Transfektion zu 70-80% konfluent waren: BWIJ Zellen mit einer Zellzahl von 3×10^6 /9cm Gewebekulturschale, LTK⁻ und NIH 3T3 Zellen mit 2×10^6 /9cm

Gewebekulturschale. 2h vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt. 10-20µg DNA wurden mit 125mM CaCl₂ in HSB (8g/l NaCl, 0.37g/l KCl, 0.125g/l Na₂HPO₄x2H₂O, 0.1g/l Dextrose und 5g/l HEPES pH7.05) in einem Volumen von 1ml für 20min copräzipitiert. Das Präzipitat wurde in das Medium gegeben und 6h auf den Zellen (in 9cm Gewebekulturschalen mit 10ml Kulturmedium) gelassen. Dann wurden die Zellen gewaschen, für 2min mit 25% Glycerol (in Kulturmedium ohne Serum) geschockt, 3x mit Kulturmedium ohne Serum gewaschen und schließlich mit frischem Medium inkubiert. 24h nach Entfernen des Präzipitats wurden die Zellen durch Abtrypsinieren geerntet.

4.2. Protein-Präparation

Die Zellen wurden abtrypsiniert und mit 1ml serumfreiem Medium gewaschen. Das Zellsediment wurde in 150µl 250mM Tris-HCl pH7.6, 5mM DTT und 5% Glycerol resuspendiert und durch dreimaliges Frieren und Tauen (Trockeneis/Methanol-Bad und 37°C) aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden 10min mit 8800xg abzentrifugiert, der proteinhaltige Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt.

4.3. RNA-Präparation (modifiziert nach Auffray und Rougeon, 1980)

16h nach Entfernen des Präzipitats von den Zellen wurde RNA präpariert. Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2.5mM KH₂PO₄, pH7.3) gewaschen. Bis zu 4 Gewebekulturschalen wurden dann in 5ml PBS mit einem Gummispatel abgeschabt und 5min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml PBS resuspendiert und mit 1ml 2xPK-Puffer (0.2M Tris-HCl pH7.5, 25mM EDTA, 0.3M NaCl und 2%

SDS) versetzt. Durch mehrfaches Aufziehen der Lösung durch eine Kanüle wurde die hochmolekulare DNA geschert. Es wurden dann 50µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben und das Ganze 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Choroform-Extraktion durchgeführt. Nach 10min Zentrifugation bei 18°C mit 9500xg wurde die nukleinsäurehaltige Oberphase abgenommen und mit einem Volumen 4M LiCl versetzt. Die RNA wurde bei 4°C über Nacht ausgefällt und 15min bei 4°C mit 16800xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde 1x mit 80%igem Alkohol gewaschen und schließlich unter Vakuum getrocknet.

ANALYTISCHE METHODEN

1. Präparation von radioaktiv markierten Proben

1.1. Kinase-Markierung von RNA

Zuerst wurde die RNA in NaOH partiell hydrolysiert, so daß freie OH-Enden entstanden. Dazu wurden 2µg polyA⁺-RNA aus der Froschleber in 20µl 0.25N NaOH für 30min bei 0°C inkubiert. Dann wurde 1M Tris-HCl pH7.6 zu einer Endkonzentration von 0.25M zugegeben und die Lösung mit 1M HCl neutralisiert (Endkonzentration: 0.1M HCl). Anschließend wurde die Kinase-Reaktion durchgeführt. Das Volumen der Reaktionsmischung wurde auf 50µl vergrößert. Dann wurden 1 Einheit T4 Polynukleotid-Kinase und 50µCi γ-(³²P)ATP (spez. Aktivität ca. 5000Ci/mmol) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30min bei 37°C in 30mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 50mM DTT. Durch Zugabe von 10µl

Stopplösung (2% SDS, 50mM EDTA, 0.01% Bromphenolblau) wurde die Reaktion beendet. Die markierte RNA wurde über eine 2ml Sephadex G50-Säule von den freien, nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt.

1.2. Endmarkierung von DNA-Fragmenten

Zur Endmarkierung von 0.5-1 μ g dephosphorylierter DNA wurden 5 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase und 100 μ Ci γ -(32 P)ATP eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 30min bei 37°C in 30 μ l 50mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.1mM Spermidin, 0.1mM EDTA. Die radioaktiv markierte DNA wurde durch Gelfiltration über eine Biogel P60-Säule von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt.

1.3. Kinasierung von Oligonukleotiden

Zur Markierung von 3pmol Oligonukleotid wurden 6pmol γ -(32 P)ATP (30 μ Ci) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren ansonsten wie oben beschrieben. Über eine NACS prepac Säule wurde das markierte Oligonukleotid von den freien Nukleotiden getrennt.

2. Gelfiltration

2.1. Sephadex G50-Säule

Sephadex G50 wurde in TE autoklaviert und somit gequollen. Eine 2ml Pipette wurde mit Glaswolle gestopft und mit dem Säulenmaterial gefüllt. Die Säule wurde zweimal mit TE, 0.2% SDS gewaschen, dann wurde die Probe aufgetragen. Unter ständigem Nachfüllen von Puffer (TE, 0.2% SDS) wurden 150 μ l Fraktionen eluiert. Von jeder Fraktion wurde je 1 μ l auf GF/C-Filter aufgebracht, mit Quickszint versetzt und im Szintillationszähler

gemessen. Die RNA sollte vor den freien Nukleotiden von der Säule eluiert worden sein, daher wurden die ersten stark radioaktiven Fraktionen gesammelt.

2.2. "Spin column"

Zur Herstellung einer sog. "spin column" wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße folgendermaßen vorbereitet: Mit einer Nadel wurde in den Boden des Eppendorf-Röhrchens ein Loch gestoßen, das anschließend mit Quarzsand bedeckt wurde. Dann wurde das Röhrchen silikonisiert und autoklaviert.

Ein so vorbehandeltes Eppendorf-Röhrchen wurde auf ein 10ml-Plastikröhrchen gesteckt und mit Sephadex G50 (in TE) gefüllt. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurde das Ganze 2min bei 1500xg zentrifugiert. Dies wurde ungefähr dreimal wiederholt, bis das Eppendorffgefäß ca. 1ml Säulenvolumen beinhaltete. Dann wurden ca. 100-200µl Kalbsthymus-DNA (1mg/ml) auf die Säule gegeben und die Säule mit die TE gewaschen. Die fertige Säule wurde dann auf ein Eppendorffreaktionsgefäß gesteckt und mit diesem wiederum auf ein 10ml-Plastikröhrchen. Dann wurde Reaktionslösung in einem Volumen von 100µl aufgetragen. Anschließend wurde das Ganze 2min bei 1500xg zentrifugiert. Dadurch wurde die Nukleinsäure über die Säule geschickt und im Eppendorffröhrchen unter der Säule aufgefangen, während die freien Nukleotide in der Säule verblieben.

2.3. Biogel P60-Säule

Biogel P60 (Fraktionierbereich zw. 3000-60000 Dalton) wurde über Nacht in 50ml NaCl, 0.5mM EDTA gequollen. Als Säule wurde eine

mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette verwendet. Die Pipette wurde bis oben mit Säulenmaterial gefüllt und mit 2ml Puffer (50mM NaCl, 0.5mM EDTA) gewaschen. Die Reaktionslösung wurde in einem Volumen von 100 µl aufgetragen. Unter stetigem Nachfüllen von Puffer wurden 100µl Fraktionen gesammelt. Die DNA-enthaltenden Fraktionen wurden durch Cerenkov-Zählung identifiziert.

3. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.1. Auftrennung von in vitro transkribierter RNA (McMaster und Carmichael, 1977)

Die getrockneten RNA-Proben wurden in 5µl sterilem dest. H₂O und 15µl Denaturierungslösung aufgenommen. Die Denaturierungslösung wurde immer frisch angesetzt und bestand aus: 50µl 20xPB (0.2M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH6.85), 500µl DMSO und 195µl 30% Glyoxal. Das Glyoxal war zuvor dreimal über AG 501-X8 deionisiert worden. Anschließend wurden die Proben 3min auf 50°C erhitzt, auf Eis gestellt und mit 5µl RNA-Ladelösung (50% Glycerol, 10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH6.85, 0.1% Bromphenolblau) versetzt.

Die so vorbereiteten RNA-Proben wurden auf einem vertikalen 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde zwischen zwei hitzesterilisierte Glasplatten (12x15x0.1cm) ein ca. 2cm hohes Polyacrylamidgel (30 Gew.% Acrylamid, 0.8 Gew.% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.05% TEMED, 0.125% Ammoniumperoxodisulfat) gegossen. Dieses Acrylamidkissen diente sicherheitshalber dazu, das Agarosegel während der Elektrophorese zwischen den Glasplatten zu fixieren. Über dieses Kissen wurde das Agarosegel (1.4%ig in 1x PB) gegossen.

Die Elektrophorese wurde bei 4°C mit 1x PB als Laufpuffer bei

30mA über 3 h durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde die RNA 15min in PB mit 0.03mg/ml Acridinorange gefärbt. Unter kurzem UV-Licht (260nm) wurde das Gel fotografiert und schließlich auf Whatman 3MM Papier 90min unter Vakuum getrocknet.

3.2. Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen

Die getrockneten Nukleinsäuren wurden in 3µl Sanger Probenpuffer (100ml deionisiertes Formamid, 20mM EDTA, 0.03g Xylencyanol, 0.03g Bromphenolblau) aufgenommen, 3min gekocht, sofort auf Eis gestellt und möglichst rasch auf das Gel aufgetragen.

Ein Gel war folgendermaßen vorbereitet worden: 30ml einer Gellösung bestehend aus: 6% Acrylamid (19 Teile Acrylamid, 1 Teil N,N'Methylen bisacrylamid), 8M Harnstoff in TBE (90mM Tris-HCl pH8.3, 90mM Borsäure, 2.5mM EDTA) wurden nach Zugabe von 0.05% TEMED und 0.1% Ammoniumperoxodisulfat zwischen zwei Glasplatten mit Abstandshaltern (20x40x0.015cm) gegossen.

Eine der Glasplatten war zuvor mit 2ml Dimethyldichlorsilan silikonisiert worden, die andere war mit 5ml 0.3% Haftsilan (in Ethanol mit 0.15ml 100% Essigsäure) beschichtet worden.

Die Gele wurden 20min bei 25W vorelektrophoresiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte ebenfalls bei 25W, als Laufpuffer diente TBE (90mM Tris-HCl pH8.3, 90mM Borsäure, 2.5mM EDTA).

Nach der Auftrennung wurde die silikonisierte Glasplatte abgehoben, das Gel blieb auf der mit Haftsilan behandelten Platte. Es wurde 10min in 10%iger Essigsäure fixiert, unter fließendem Wasser abgespült, bei 80°C auf die Glasplatte getrocknet und autoradiographiert.

4. Southern Transfer von DNA (Southern, 1975)

Restriktionsverdaute DNA wurde auf einen Agarosegel bei einer Spannung von 40V langsam aufgetrennt. Das Gel wurde markiert, gefärbt und schließlich photographiert.

Die DNA im Gel wurde bei Raumtemperatur 30min in 0.5M NaOH, 1.5M NaCl unter Schütteln denaturiert. Dann wurde das Gel kurz gewässert und 30min in 1M Tris-HCl pH5.0, 1.5M NaCl neutralisiert. Für den Transfer der DNA auf ein Nitrocellulose-Filter wurde eine etwas modifizierte Apparatur nach Maniatis et al. (1982) verwendet.

In eine Plastikwanne mit 20xSSC (3M NaCl, 0.3M tri-Natrium-citrat-2-hydrat pH6.5) wurden zwei übereinandergestapelte Ständer für Gilson-Pipettenspitzen (Fa. Gilson) gesetzt. Darüber wurde eine Glasplatte gelegt. Diese Glasplatte wurde mit zwei befeuchteten Whatman 3MM Papierstücken (16x30cm) bedeckt, deren Enden in die 20xSSC-Lösung reichten. Darauf wurde das vorbehandelte Gel gelegt. Der freigebliebene Raum um das Gel herum wurde mit Parafilm abgedichtet. Ein mit 20xSSC benetztes Nitrozellulose-Filter wurde auf das Gel gelegt. Darüber wurden eine weitere Lage feuchtes Whatman 3MM Papier und dann Papierhandtücher geschichtet. Das Ganze wurde schließlich mit einem schweren Gegenstand bedeckt.

Der Transfer erfolgte über Nacht. Danach wurde das Filter in 10xSSC gewaschen und 2h bei 80°C getrocknet.

5. Hybridisierung von RNA an DNA, die auf Nitrozellulose- Filtern fixiert ist

Zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen wurde das NC-Filter vorhybridisiert. Dann wurde das Filter je nach Größe des transferierten Gels mit 5, 10 oder 20ml einer Mischung aus 88.5 Vol% Hybridisierungslösung und 11.5Vol% denaturierter Kalbsthymus-DNA (1mg/ml) 2-4h bei 37°C inkubiert. Die Hybridisierungslösung bestand aus: 40ml 20xSET (3M NaCl, 1M Tris-HCl pH8.0, 0.1M EDTA), 100ml Formamid p.a., 10ml 100x Denhardtts (2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA), 2ml 20% SDS, 20ml Hefe-RNA (2.5mg/ml in 0.1% SDS) und 5ml 4% Na-Pyrophosphat (0.5M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH7.3, 1.5% Na₄P₂O₇).

Die eigentliche Hybridisierung mit kinasierter RNA erfolgte dann über 20h bei 37°C in 88.5 Vol% Hybridisierungslösung und 11.5 Vol% Kalbsthymus-DNA (4.3mg/ml) mit 5.10⁶ cpm kinasierter RNA.

Unspezifisch gebundene RNA wurde durch mehrmaliges Waschen der Filter entfernt: je zweimal 30min bei 65°C in 2xSSC, 0.1% SDS und 10µg/ml Kalbsthymus-DNA und je dreimal 45min bei 37°C in 2xSSC, 0.1% SDS.

Das Filter wurde naß in Folie eingeschweißt und autoradiographiert.

6. In vitro Transkription

Für die in vitro Transkriptions-Experimente wurde das "Eucaryotic Transcription System"-Kit der Firma Gibco-BRL, Karlsruhe, verwendet.

0.5-1µg DNA wurden jeweils mit 15µl HeLa-Lysat und je 0.5µl 7mM EDTA; 50mM Creatin-Phosphat; 25mM rATP; 25mM rGTP; 25mM rCTP;

2.5mM rUTP und mit 0.75 μ Ci α -(32 P)UTP versetzt. Das Volumen wurde mit sterilem dest. H₂O auf 25 μ l gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde 1h bei 37°C inkubiert, anschließend wurde ein gleiches Volumen Transkriptions-Stopplösung (20mM EDTA, 2% SDS, 100 μ g/ml tRNA, 200mM Tris-HCl pH8.0, 0.01% Bromphenolblau) zugesetzt. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Proben über eine "spin column" gegeben. Die in vitro transkribierte RNA wurde mit Ethanol ausgefällt und anschließend auf einem 1.4%igen Agarose-Gel aufgetrennt.

7. Sequenzierung von Nukleinsäuren

7.1. von einzelsträngiger DNA nach Sanger (1978)

7.5 μ l der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA wurden mit 5 μ l primer-Mix (50mM Tris-HCl pH8.5, 25mM MgCl₂, 12ng M13 Sequenzierprimer, Pentadecamer) 1h bei 60°C inkubiert. Je 2 μ l dieses Hybridisierungsansatzes wurden für jede der 4 Sequenzierreaktionen (G,A,C,T) eingesetzt. Die Reaktionen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zu den 2 μ l des Hybridisierungsansatzes wurden je 2 μ l einer für die jeweilige Sequenzierreaktion spezifischen dNTP/ddNTP-Reaktionslösung zugegeben. Diese Reaktionslösung war für 5 zu sequenzierende DNAs berechnet und bestand aus 5 μ l NTP^o-Lösung, 5 μ l ddNTP-Lösung, 5 Einheiten DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) und 8 μ Ci α -(35 S)dATP (600Ci/mmol).

Das Reaktionsgemisch wurde 20min bei 30°C gehalten, mit 2 μ l Chase-Lösung (0.25mM dNTPs) versetzt und weitere 20min bei 30°C inkubiert. Mit diesem Schritt sollen vorzeitige Kettenabbrüche verhindert werden, die aufgrund von zu niedrigen Nukleotidkonzentrationen auftreten könnten.

Mit 4 μ l Sanger-Probenpuffer (100ml deionisiertes Formamid, 0.1g Xylencyanol FF, 0.1g Bromphenolblau, 2ml 0.5M EDTA pH8.0) wurde die Reaktion beendet. Die Proben wurden 3min bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Schließlich wurden 2 μ l des Reaktionsgemischs auf einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt.

Die einzelnen NTP^o-Lösungen waren:

G^o: 12.5 μ M dGTP + 250 μ M dCTP + 250 μ M dTTP

A^o: 250 μ M dGTP + 250 μ M dCTP + 250 μ M dTTP

C^o: 250 μ M dGTP + 12.5 μ M dCTP + 250 μ M dTTP

T^o: 250 μ M dGTP + 250 μ M dCTP + 12.5 μ M dTTP

Die Lösungen wurden jeweils aus 1mM dNTP-Stocklösungen hergestellt.

Die ddNTP-Lösungen waren:

ddGTP 0.32mM ddATP 0.02mM

ddCTP 0.16mM ddTTP 0.5 mM

7.2. Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA (Chen und Seeburg, 1985)

20 μ g gereinigte Plasmid-DNA wurde zunächst in 100 μ l TE mit 100 μ g/ml RNase (10mg/ml in 10mM Tris-HCl pH 7.5, 15mM NaCl) 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem RNase-Verdau wurde das Volumen auf 400 μ l erhöht. Die DNA wurde über eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit 2 Volumen Ethanol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wurde 10min bei 8800xg abzentrifugiert, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Das Sediment wurde in 20µl TE aufgenommen und die Konzentration der DNA bestimmt.

2µg DNA wurden getrocknet und einer alkalischen Denaturierung unterzogen. Dazu wurde die DNA in 40µl Denaturierungspuffer (0.2M NaOH, 0.2mM EDTA pH8.0) aufgenommen und 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Neutralisierung wurden 4µl Ammoniumacetatlösung (2M Ammoniumacetat pH4.5) zugegeben und die DNA mit 2 Volumen Ethanol über Nacht gefällt. Nach 10min Zentrifugation bei 8800xg wurde die denaturierte Plasmid-DNA mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Die so vorbehandelte DNA wurde mit 5µl primer (0.5pmol/µl), 1.5µl 10x Annealing-Puffer (70mM Tris-HCl pH7.5, 70mM MgCl₂, 300mM NaCl, 100mM DTT, 1mM EDTA) und 2µl α-(³⁵S)dATP (8µCi/µl, 660 Ci/mmol) und 6.5µl H₂O versetzt. Während der Hybridisierung, 15min bei 37°C, wurden 4 Eppendorf-Röhrchen, mit für jede Sequenzierreaktion entsprechenden dNTP/ddNTP-Lösungen vorbereitet. Zum Hybridisierungsansatz wurden dann 2 Einheiten DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) gegeben und je 3µl dieses Gemischs wurden auf die vorbereiteten Eppendorfröhrchen verteilt. Die Reaktion wurde über 30min bei 30°C durchgeführt. Nach Zugabe von 1.5µl Chase-Lösung (0.125mM dNTPs) wurden die Proben weitere 15min bei 30°C inkubiert.

Schließlich wurden die Proben unter Vakuum getrocknet und in 4µl Sanger-Probenpuffer aufgenommen. Es wurde je 1µl auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt.

Die einzelnen dNTP/ddNTP-Lösungen hatten folgende Nukleotidkonzentrationen, in 1x Annealing-Puffer:

A-Mix: 100 μ M dTTP	C-Mix: 100 μ M dTTP
100 μ M dCTP	10 μ M dCTP
100 μ M dGTP	100 μ M dGTP
und 100 μ M ddATP	und 100 μ M ddCTP
G-Mix: 100 μ M dTTP	T-Mix: 5 μ M dTTP
100 μ M dCTP	100 μ M dCTP
5 μ M dGTP	100 μ M dGTP
und 120 μ M ddGTP	und 500 μ M ddTTP

7.3. Sequenzierung von RNA mit der Kettenabbruchmethode

Entsprechend der Analyse von RNA mit der "primer extension" Methode wurden die RNA-Sequenzierungsreaktionen durchgeführt, jedoch in Anwesenheit von ddNTPs (Endkonzentration 1.7mM).

7.4. Sequenzierung von DNA nach Maxam und Gilbert (1980)

Es wurde das Sequencing-Kit der Firma NEN, England verwendet. 20pmol DNA-Fragment, das an einem Ende radioaktiv markiert war, wurde in 40 μ l H₂O aufgenommen, für die jeweiligen Reaktionen auf 5 Eppendorfröhrchen verteilt und mit je 8 μ g Träger-DNA (Lachs-Spermien-DNA) versetzt.

Die einzelnen Kettenabbruchreaktionen waren:

a) G-Reaktion: 5 μ l DNA-Lösung wurden mit 200 μ l G-Reaktionspuffer und 1 μ l DMS 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 μ l G-Stopplösung, 750 μ l Ethanol und Transfer der Probe in ein Trockeneis/Methanol-Bad wurde die Reaktion beendet.

b) G+A-Reaktion: 10 μ l DNA-Lösung wurden mit 2 μ l Piperidin-Formiat versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde das Reaktionsgemisch in einem Trockeneis/Methanol-Bad auf -70°C abgekühlt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt. Schließlich wurde die DNA in 20 μ l H₂O aufgenommen und nochmals gefriergetrocknet.

c) A+C-Reaktion: 10 μ l DNA-Lösung wurden mit 100 μ l 1.2N NaOH, 1mM EDTA für 10min bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 150 μ l 1N NaOH neutralisiert und die DNA nach Zugabe von 4 μ g tRNA mit Ethanol ausgefällt.

d) C-Reaktion: 5 μ l DNA-Lösung wurden mit 15 μ l 5M NaCl und 30 μ l Hydrazin 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ l Hydrazin-Stopplösung beendet. Die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt.

e) T+C-Reaktion: 10 μ l DNA-Lösung wurden mit 10 μ l H₂O und 30 μ l Hydrazin versetzt und ebenfalls 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde genau wie die C-Reaktion beendet.

Die ausgefällten DNA-Proben der Reaktionen a,c,d und e wurden 10min bei 8800xg abzentrifugiert und getrocknet. Die DNA-Sedimente wurden jeweils in 250 μ l 0.3M NaAcetat pH4.8 aufgenommen und erneut mit Ethanol ausgefällt. Nach der

Zentrifugation wurden die Proben zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Die DNA-Proben aller Reaktionen wurden jeweils in 100µl 1M Piperidin aufgenommen, 30min bei 90°C erhitzt und über Nacht in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Um alles Piperidin zu entfernen, wurden die Proben noch zweimal in 30µl H₂O aufgenommen und zur Trockne eingeengt.

Durch Cerenkov-Zählung wurde die verbliebene Radioaktivität der Proben bestimmt. Anschließend wurden die Proben in Sanger-Probenpuffer aufgenommen, wobei das zugegebene Volumen so gewählt wurde, daß alle Einzelreaktionen die Aktivität von 1000cpm/µl und die Doppelreaktionen von 2000cpm/µl hatten. Davon wurden dann je 2µl auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt.

8. "primer extension"-Analyse von RNA (McKnight und Kingsbury, 1982)

Ein synthetisches Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zur zu analysierenden RNA wurde endmarkiert (Punkt 1.3.). Die spezifische Aktivität des markierten Oligonukleotids betrug meist zwischen $2.8 - 7 \cdot 10^8$ cpm/µg DNA. Zur Hybridisierung wurden 50.000-60.000cpm primer mit 10-20µg Gesamt-RNA mit Ethanol gefällt, in 20µl Hybridisierungslösung (250mM KCl, 10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA) resuspendiert. Die Hybridisierung wurde für 1-2h bei 60°C durchgeführt. Danach wurden die Proben 2min auf Eis abgekühlt und anschließend bei Raumtemperatur mit 40µl Reverse-Transkriptase-Mix versetzt. Dieser Mix bestand für 10 Reaktionen aus: 120µl Nukleotidmix (2.5mM dNTPs), 120µl Actinomycin D (250µg/ml), 80µl 5x RT-Puffer (375mM Tris-HCl pH7.5, 75mM DTT, 60mM MgCl₂), 4µl RNasin(= RNase-Inhibitor;120U)

und 10µl M-MLV Reverse Transkriptase (5U/µl).

Das Reaktionsgemisch wurde 30-45min bei 37°C inkubiert und anschließend die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt. Das Sediment wurde in 3µl Sanger-Probenpuffer aufgenommen und auf einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt.

9. SP6-Analyse von RNA (Melton et al., 1984)

9.1. Herstellung der Probe

5µg rekombinante SP6-Plasmid-DNA wurden mit einem Restriktionsenzym linearisiert, dessen Erkennungssequenz im Polylinkerbereich lag, und zwar zwischen inserierter Sequenz und dem SP6-Promotor. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt und in einer Konzentration von 0.25µg/µl in H₂O gelöst. Zur Herstellung der radioaktiv markierten RNA-Probe wurden in einem Eppendorfröhrchen zunächst 100µCi α-(³²P)GTP zur Trockne eingeengt. Diese wurden dann in 4µl 5x SP6-Puffer (200mM Tris-HCl pH7.5, 30mM MgCl₂, 10mM Spermidin), 1µl DTT, 0.75µl RNasin (40U/µl), 4µl 5x rNTP (2.5mM rNTPs), 1µl 0.25mM rGTP, 7.25µl H₂O und 2µl DNA-Lösung aufgenommen und 60min bei 37°C inkubiert. Die als Matrize verwendete DNA wurde durch einen anschließenden DNase-Verdau von der synthetisierten SP6-Probe entfernt. Dazu wurde die Reaktionslösung mit 5µl 10x DNase-Puffer (500mM Tris-HCl pH7.5, 50mM MgCl₂), 20µl DEPC-H₂O (0.1% DEPC in H₂O), 4µl RNase-freie DNase (RQ₁-DNase, 1U/µl) und 1µl RNasin (40U/µl) versetzt und 10min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-H₂O auf 100µl gebracht und die RNA-Probe durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Die Probe wurde in 2.5M NH₄Acetat und in Gegenwart von 10µg tRNA mit Ethanol ausgefällt.

Meist wurden ca. 10% der angebotenen Radioaktivität eingebaut. Zur Hybridisierung mit der RNA wurde die SP6-Probe in 60µl FAB-Puffer (80% deionisiertes Formamid, 400mM NaCl, 40mM PIPES pH6.4, 1mM EDTA) gelöst.

9.2. Vorbehandlung der RNA

Gesamt-RNA, die aus transient transfizierten Zellen isoliert worden war, wurde vor der SP6-Analyse mit DNase behandelt. Damit sollten Verunreinigungen durch Plasmid-DNA, die noch von der Transfektion stammte, beseitigt werden. Eine Verunreinigung mit Plasmid-DNA könnte in der SP6-Analyse ebenfalls mit der SP6-Probe hybridisieren und somit zu unspezifischen Hybridisierungssignalen führen.

20µg Ethanol-gefällte, getrocknete RNA wurde in 43µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 5µl 10x DNase-Puffer, 1µl RNasin, 2µl RNase-freier DNase 10min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde gleiches Volumen DEPC-H₂O zugegeben und die RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt.

9.3. Analyse

Die getrocknete, vorbehandelte RNA wurde in 17µl FAB-Puffer aufgenommen und mit 3µl SP6-Probe versetzt. Das Gemisch wurde 5min bei 85°C erhitzt und anschließend über Nacht bei 45°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 300µl Verdau-Puffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 0.3M NaAcetat pH7.0, 40µg/ml RNase A, 600U/ml RNase T₁) versetzt und 30min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch Zugabe von

2.5µl Proteinase K (10mg/ml) und 3.2µl 20% SDS für 15min bei 37°C inaktiviert. Durch Phenol/Choloroform-Extraktion wurden die Hybride gereinigt und mit Ethanol ohne Zugabe von Salz in Gegenwart von 5µg tRNA gefällt. Schließlich wurden die Proben auf einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt.

10. Bestimmung der CAT-Aktivität (CAT-Assay; Gorman et al., 1982)

Die Proteinkonzentration der Extrakte aus transient transfizierten Zellen wurden nach der Methode von Lowry et al.(1951) bestimmt. Dazu wurden 5µl Extrakt mit 995µl Lösung I (2% Na₂CO₃ in 0.1N NaOH) gemischt und mit 2ml Lösung IV (1ml 2% KTartrat = Lösung II, 1ml CuSO₄ = Lösung III, 100ml Lösung I) versetzt und 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden 0.2ml frisch angesetzte 50%ige Folin-Lösung (in H₂O) zugegeben und die Reaktionslösung 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 600nm bestimmt. Aus parallel angesetzten Standard-Proben mit 5,10,20,30,40,50 und 60µg BSA wurde eine Eichkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentrationen in den Proben abgeleitet wurden.

Für den CAT-Assay wurden 1.25µCi ¹⁴C-Chloramphenicol zur Trockne eingeengt und in einer bestimmten Proteinmenge aufgenommen. Mit 0.25M Tris-HCl pH7.6 wurde das Volumen auf 180µl gebracht. Nach 5min Vorinkubation bei 37°C wurden 20µl 4mM Acetyl Coenzym A (in 0.25M Tris-HCl pH7.6) zugegeben und die Reaktionslösung für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Chloramphenicol mit 1ml Ethylacetat aus der wäßrigen Phase extrahiert. Das Ethylacetat wurde dann in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Das Chloramphenicol wurde in 20µl Ethylacetat wieder gelöst und

punktweise auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetropft. Als Laufmittel dient ein Chloroform-Methanol-Gemisch (9:1). Nach der Chromatographie wurde die Platte an der Luft getrocknet und autoradiographiert.

Zur Bestimmung der umgesetzten Mengen Chloramphenicol wurden die nicht-acetylierte und die acetylierten Formen ausgeschnitten, mit 5ml Quickszint versetzt und im Szintillationszähler 5min gezählt. Die spezifische Enzymaktivität in pmol/mg·h läßt sich nach folgender Formel bestimmen:

$$\frac{4750 \text{ pmol Chloramphenicol} \times \text{cpm acetyl. Chloramphenicol}}{2 \text{ h} \times \text{mg Proteinextrakt} \times \text{cpm eingesetztes Chloramphenicol}}$$

Ergebnisse

I. STRUKTURELLE ANALYSE DER XENOPUS ALBUMINGENE

Die Exon/Intron-Struktur der genomischen Klone für die beiden Xenopus Albumingene war durch R-Loop Experimente von May et al. (1983) charakterisiert worden. Bei solchen R-Loop Experimenten wird RNA mit genomischer DNA hybridisiert, fixiert und im Elektronenmikroskop analysiert. Dort, wo Exon-Sequenzen sind, bildet die denaturierte DNA mit komplementärer RNA ein Hybrid. Zwischen den kodierenden Sequenzen befindliche nicht-kodierende DNA-Sequenzen können nicht mit der RNA hybridisieren und bilden Schleifen (sog. loops) aus. Durch elektronenmikroskopische Vermessung der Hybride und der dazwischen liegenden Schleifen konnte die Anzahl und Größe der Exons und das ungefähre 5' und 3' Ende der Gene vorhergesagt werden. Durch zusätzliche Analyse von genomischen Restriktionsfragmenten konnten die Exonbereiche in einen Bezug zur genomischen Restriktionskarte gebracht werden. Dazu trugen ebenfalls die Ergebnisse aus Untersuchungen mit der cDNA (Westley et al., 1981) bei. Bei einer solchen Angleichung von Exon/Intron-Karte zu Restriktionskarte kann es durchaus methodisch bedingt zu Ungenauigkeiten kommen. So mußte für das 74kd Gen die ursprüngliche Restriktionskarte im Bereich des 5' Endes revidiert werden. Die Größenangaben für die beiden Eco RI/Bam HI- bzw. Bam HI/EcoRI-Restriktionsfragmente war auf der ursprünglichen Karte vertauscht worden. In ABB.1 ist das Ergebnis der obigen R-loop Untersuchungen, zusammen mit den im 5' Bereich verbesserten Restriktionskarten dargestellt.

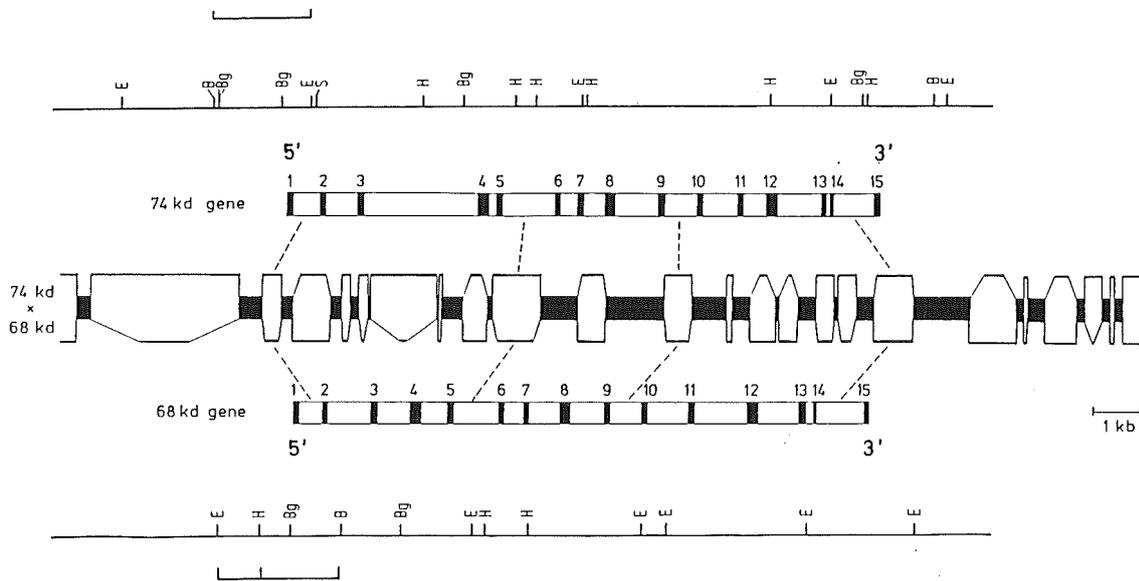


ABB1: Restriktions- und Exon/Intronkarte der Albumingene des *Xenopus laevis*.

In der Mitte ist ein Heteroduplexmolekül gezeichnet, das aus der Renaturierung von Einzelsträngen der beiden Albumingene entstanden ist. Die gepaarten Bereiche sind in schwarzen Blöcken dargestellt. Darüber und darunter befinden sich jeweils die Exon/Intronkarten beider Gene. Die Exons sind schwarz dargestellt und nummeriert.

In Angleichung an diese sind vereinfachte Restriktionskarten für die jeweiligen Gene angegeben. Es wurden nur die für das weitere Verständnis wichtigen Restriktionsschnittstellen angegeben:

Eco RI (E), Bam HI (B), Bgl II (Bg), Hind III (H) und Sal I (S)

1. Subklonierung der genomischen Fragmente, die das 5'Ende enthalten

Aufgrund der in ABB1 gezeigten, kombinierten Exon/Intron- und Restriktionskarten beider Albumingene wurden die genomischen Fragmente, die das 5'Ende enthalten sollten, subkloniert. Für das 68kd Gen wurde ein 2.7kb EcoRI/BamHI-Fragment in den Vektor pEMBL9⁺, für das 74kd Gen ein 2.0kb BamHI/EcoRI-Fragment in den Vektor pEMBL8⁺ subkloniert. Die beiden klonierten Fragmente sind in ABB1 hervorgehoben. Die verwendeten pEMBL-Vektoren (ABB2, Dente et al., 1983) sind Abkömmlinge der pUC-Vektoren (Vieira und Messing, 1982) und sind zur DNA-Sequenzierung besonders gut geeignet, da sie eine F₁-Region besitzen, die die Synthese von einzelsträngiger DNA, nach Zugabe eines Helferphagen, ermöglicht. Im Gegensatz zu den üblichen einzelsträngigen Sequenzierungsvektoren, die von dem Phagen M13 abstammen, zeichnen sich die pEMBL-Vektoren durch ihre kleine Größe und ihre Stabilität aus. Außerdem können sie als doppelsträngige Plasmide vermehrt werden.

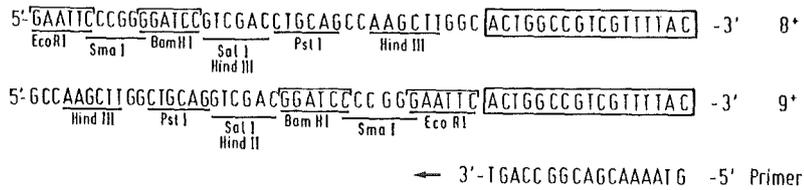
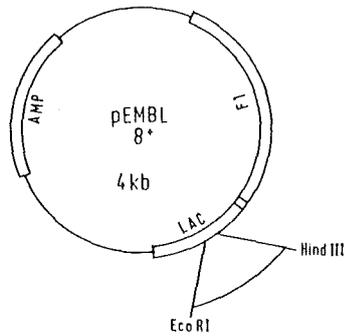


ABB2: pEMBL8⁺-Vektor und Polylinker-Bereich der pEMBL-Vektoren

Oben ist der pEMBL8⁺-Vektor abgebildet (Dente et al., 1983).
 Unten ist die Sequenz im Polylinkerbereich des pEMBL8⁺- bzw. pEMBL9⁺-Vektors angegeben. Die eingerahmte Sequenz zeigt die Bindungsstelle des M13 Sequenzierprimers. Der Pfeil gibt die Richtung der Sequenzierreaktion an. Die Klammern über den einzelnen Sequenzen markieren die Restriktionsschnittstellen, in die subkloniert wurde.

2. Die klonierten Subfragmente enthalten Exon-Sequenzen

Die klonierten Fragmente sollten noch transkribierte Albuminsequenzen enthalten und daher mit Albumin mRNA hybridisieren können. Um dies sicherzustellen, wurden die erhaltenen rekombinanten Subklone einer "Southern-Blot"-Analyse unterzogen. Dazu wurden die Klone entweder linearisiert oder die inserierten Fragmente ausgeschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und gegen radioaktiv markierte polyA⁺-RNA aus der Xenopus-Leber hybridisiert (ABB3). PolyA⁺-RNA aus der Leber enthält 10% spezifische Albumin mRNA, die mit Exon-Sequenzen auf dem Subklon hybridisieren sollte.

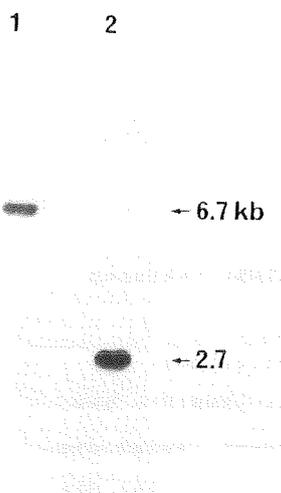


ABB3: Das 68kd Subfragment enthält Exonsequenzen

Autoradiographie einer Southern Analyse des 68kd Subklons (68kd Eco RI/Bam HI-Fragment in pEMBL9⁺). 1µg Eco RI linearisierter Subklon (1) bzw. 1µg EcoR/BamHI-geschnittener Subklon (2) wurden mit kinasierter polyA⁺-RNA aus der Frosch-Leber hybridisiert. Die Größe der Fragmente, die hybridisierten, ist angegeben.

ABB3 zeigt das Ergebnis der Analyse für den 68kd Subklon. Der mit Eco RI linearisierte 6.7kb große, gesamte Subklon hybridisierte mit der mRNA (Spur 1). Diese Reaktion war spezifisch für die Albuminsequenzen, denn in Spur 2 hybridisierte nur das 2.7kb große, ausgeschnittene Albumin-Fragment. Für den 74kd Subklon wurde das gleiche Resultat erhalten (Daten nicht gezeigt). Die subklonierten DNA-Fragmente beider Gene enthalten also transkribierte Sequenzen.

3. Die Subklone besitzen eine Promotor-Region, die von der RNA-Polymerase II erkannt wird.

Die klonierten Subfragmente sollten den Albuminpromotor mit der Startstelle der Transkription besitzen.

Die Transkription der meisten eukaryontischen Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Die korrekte Initiation der Transkription ist abhängig von einem konservierten AT-reichen Sequenzmotiv (TATA-Box), das sich ca. 30bp 5' von der Transkriptions-Startstelle befindet (Serfling et al., 1985a).

Mit "in vitro Transkriptions"-Experimenten wurde untersucht, ob von den subklonierten DNA-Fragmenten Transkripte erhalten werden können, d.h. ob sie eine TATA-Box besitzen.

Dazu wurden die isolierten Fragmente mit HeLa-Zellextrakt unter Zugabe von Ribonukleotiden und $\alpha(^{32}\text{P})\text{rUTP}$ inkubiert. Der verwendete HeLa-Zellextrakt enthielt RNA-Polymerase II und andere für die Transkription wichtige Faktoren. Wenn das eingesetzte DNA-Stück eine TATA-Box, wie oben beschrieben, enthält, sollte in vitro eine radioaktiv markierte RNA von der eingesetzten DNA transkribiert werden (Manley, 1980). Aufgrund der Größe der in

in vitro transkribierten RNA und der des eingesetzten DNA-Fragments kann man Rückschlüsse auf die Lage des Transkriptionsstarts ziehen.

Für das Experiment wurden die beiden isolierten 68kd und 74kd Subfragmente und außerdem ein vom 68kd Subklon abgeleitetes HindIII/Bam HI-Fragment, das vom 5'Ende her um 1kb verkürzt war, verwendet.

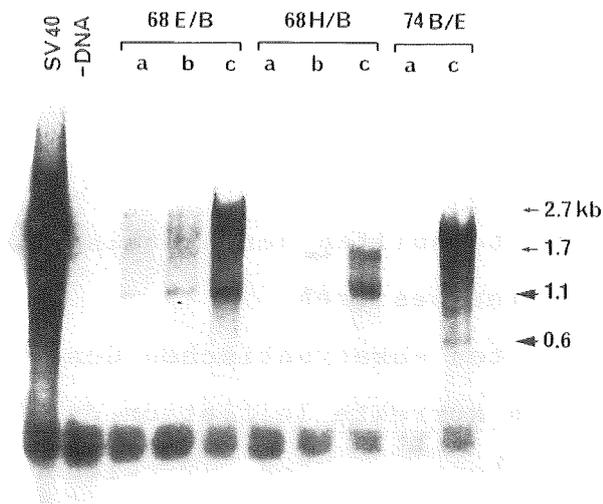


ABB4: Die subklonierten Albuminfragmente enthalten Promotorelemente

Autoradiogramm eines 1.4%igen Agarosegels. Die Transkription wurde mit HeLa-Zellextrakt unter Standardbedingungen durchgeführt. Von links nach rechts sind die Transkripte von folgenden DNA-Fragmenten aufgeführt: 1µg PstI-geschnittene SV40 DNA(SV40), keine DNA (-DNA), 68kd Albumin EcoRI/BamHI, 68kd HindIII/BamHI und 74kd BamHI/EcoRI. Die verschiedenen, eingesetzten Konzentrationen waren: a=500ng, b=750ng, c=1000ng. Die dicken Pfeile zeigen auf die spezifischen Transkripte.

ABB4 zeigt das Ergebnis der durchgeführten *in vitro* Transkription. Von den Albumin-Subfragmenten wurden jeweils zwei RNAs transkribiert. Die spezifischen RNAs für den 68kd Subklon und den abgeleiteten, verkürzten Klon waren gleich groß: 1.1kb; das spezifische Transkript vom 74kd Subklon war 0.6kb groß (große Pfeile). Durch Transkription von Anfang bis Ende der Fragmente wurden neben den spezifischen auch unspezifische Transkripte (kleine Pfeile) erzeugt, deren Größe mit der der eingesetzten DNA-Stücke übereinstimmte (Manley, 1983). Von einer als Kontrolle eingesetzten, linearisierten SV40-DNA wurden vier RNAs der erwarteten Größen von 2.04, 1.94, 1.86 und 1.67kb transkribiert (vergl. Handa et al., 1980), während aus dem Ansatz ohne DNA kein Transkript erhalten wurde (SV40, -DNA).

Beide genomische Subfragmente enthalten also Transkriptions-Startstellen, die von der RNA-Polymerase II erkannt werden und von denen aus *in vitro* Transkripte initiiert werden können. Die Startstelle im 68kd-Subfragment befindet sich ca. 1.1kb von der Bam HI-Schnittstelle. Die vom 74kd Fragment transkribierte RNA ist wesentlich kleiner, ihre Startstelle befindet sich ca. 0.6kb 5' von der Eco RI-Schnittstelle.

4. Die Sequenzierung der Subklone

Die soweit überprüften genomischen Subfragmente wurden zur Herstellung weiterer Subklone herangezogen, dabei wurde von internen Restriktions-Schnittstellen ausgegangen. Alle erhaltenen Klone wurden zur DNA-Sequenzierung herangezogen (ABB5a,b). Die beiden Methoden der DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977; Maxam und Gilbert, 1980) erfassen maximal nur Sequenzen bis zu einer Größe von 350bp. Um die gesamte Sequenz der Klone abdecken zu können, wurde eine gerichtete Sequenzierung mit Hilfe von fortschreitenden 5'Deletionsmutanten durchgeführt (Poncz et al., 1982).

Mit Hilfe der Exonuklease Bal31 wurden am 5'Ende der Subklone verschieden große Deletionen eingeführt und kloniert. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei so gewählt, daß sich die Deletionen in ihrer Größe um jeweils 100-150bp unterschieden. Durch das Ansequenzieren dieser Deletionsmutanten nach der Sanger-Methode erhält man nacheinander abfolgende, überlappende Sequenzen.

Zunächst wurde versucht die erzeugten Bal31-Deletionsmutanten direkt in die Polylinkerregion der pEMBL-Vektoren (in die SmaI- und BamHI- bzw. EcoRI-Schnittstelle) einzubringen. Diese Art der Klonierung war nicht sehr effizient. Zur direkten Klonierung der durch Bal31 erzeugten stumpfen Enden (blunt ends) benötigte man 10x mehr DNA als zur Klonierung von überstehenden Enden (sticky ends) nötig war. Auf diese Art wurden nur drei unterschiedliche Deletionsklone vom 68kd Subklon (-1425, -211 und +449) erhalten. Aufgrund dieser niedrigen Ausbeute an Deletionsmutanten wurden zur weiteren Klonierung synthetische Linker-Sequenzen verwendet. Die Linker-Sequenzen wurden an die stumpfen Enden ligiert und

durch nachfolgenden Restriktionsverdau konnten dann überstehende Enden erzeugt werden, die sich schließlich leicht klonieren ließen. Es wurden jeweils die Restriktions-Schnittstelle als Linkersequenz eingebracht, von der aus deletiert worden war.

Ein bedeutender Vorteil dieser gerichteten Unterteilung der DNA-Fragmente für die Sequenzierung lag auch darin, daß diese Bal31-Deletionsmutanten später zur Untersuchung der Regulation der Gene herangezogen werden konnten.

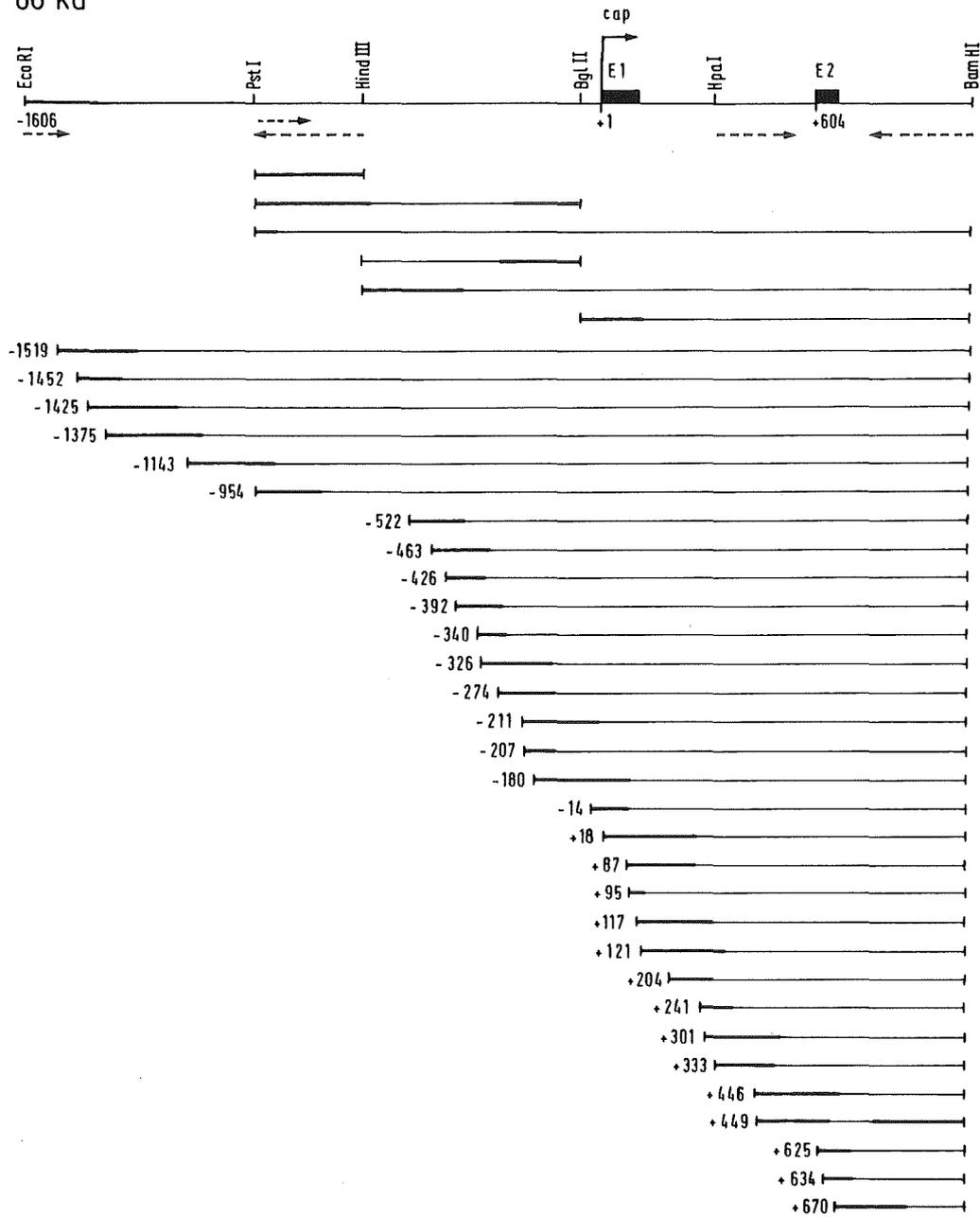
ABB5: Restriktionskarten der 68kd und 74kd Subklone und deren Sequenzierungsstrategie

5a: 68kd Subklon

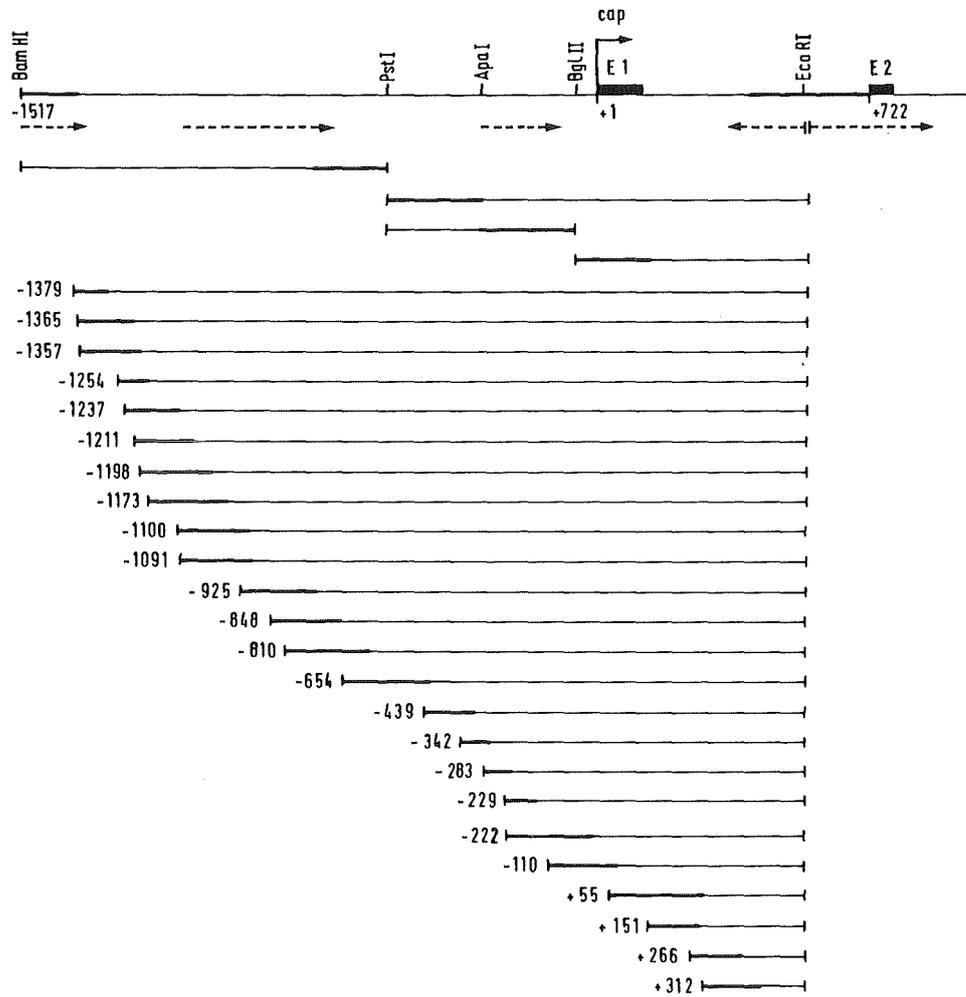
5b: 74kd Subklon

Die Restriktionskarten mit den wichtigsten Schnittstellen sind angegeben. Die erstellten Subklone und 5'Deletionsmutanten sind entsprechend ihrer Lage eingezeichnet. Die Anfangspunkte der einzelnen Deletionen sind angeschrieben. Die nach Sanger sequenzierten Bereiche sind durch einen dickeren Strich hervorgehoben, die gestrichelten Pfeile markieren die nach Maxam und Gilbert sequenzierten Bereiche.

68 kd



74 kd



Die Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) erlaubte es bis auf wenige Ausnahmen die gesamte Sequenz der Subklone sicher aufzuklären. In ABB6 ist als Beispiel einer Sequenzierung nach der Methode von Sanger die Autoradiographie eines Sequenziergels gezeigt.

Einige Bereiche, z.B. sehr AT-reiche oder GC-reiche Regionen (homopolymer Regionen), konnten mit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) nicht sequenziert werden (Smith, 1980). Ein Teil dieser Problemstellen konnte durch Sequenzierung mit Reverser Transkriptase (BioRad Bulletin 1205) oder durch geänderte Reaktionsbedingungen (Inkubation mit Hinc II-Puffer bei 56°C; Gomer et al., 1985) aufgekärt werden. Wenige Bereiche konnten jedoch trotz verschiedener, angewandter Variationen nicht eindeutig analysiert werden. Diese Bereiche (ABB5a,b: gestrichelte Pfeile) wurden daher mit der Basenmodifikations-Methode (Maxam und Gilbert, 1980) sequenziert. Ausgehend von Restriktions-schnittstellen wurden die Subklone oder Deletions-mutanten vor dem zu sequenzierenden Bereich linearisiert, dephosphoryliert und mit einem weiteren Restriktionsenzym hinter dem zu analysierenden Bereich nachgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde isoliert, an der dephosphorylierten Schnittstelle radioaktiv markiert und der Sequenzanalyse unterzogen. Auf diese Art wurde die Sequenz einiger Bereiche vollständig abgesichert.

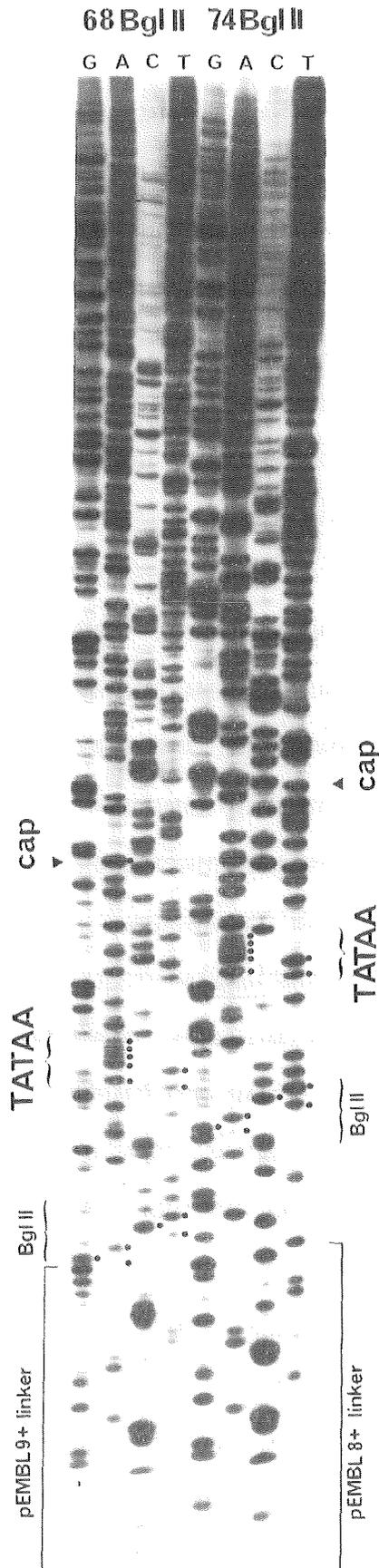


ABB6: Nukleotidsequenz beider Xenopus Albumingene im Bereich der TATA-Box und des Transkriptionsstarts

Autoradiographie eines Sequenziergels. Die Nukleotidsequenz wurde nach der Methode von Sanger von den Bgl II-Subklonen des 68kd und 74kd Gens aus erstellt. Wichtige Sequenzbereiche sind durch Klammern markiert und angeschrieben, einzelne Basen dazu sind durch Punkte hervorgehoben.

68kd Albumin

GAATTCAGGTTTGGAGGCAAGTTTGGTTGTATAAACTCAGGTGCACGCGCAACACAGAGCCCTCAATGTAGGGTGCACATCCCATAGGGCTACCAAT
 GGCCAATCACAGCACTTATTTGGCAGCCAGGGAACTTTTTCATGCATGCTGTTGCTCCCACTCCTGTACTTCTGCATGTTGCACACGGTTCAA
 AGGTTGGGATTCCTGCTTAGAGGCAAGAGGAGACTTTAAACATTTTATTACTATTAGGACCAATAATGAGAGATGAGATGGTGCACAAAAAG
 GTGTGCCATAGGCAAGGAGGGCATGTTTTTCTATTATAGCCCTTCTAGAGACTAGTGTCTATCTCATATTAAGGAAAAATGATCTGTAGT
 CAAGAGATGTGGTTGAAAAGGGCAACTTTTGTATATTCACCAATGATGAGACTCAGCAATAGAAAACCCAGGGAAAAATATGATGTTGCTGTAGCA
 AGTGTGGCTGTTTTATTGTCAGCTCAGGAAAAAGATAAATAGGCTCTGAGTGGATGGAGGAGAGCAGGGTGGACCTCCATTCCATACTCCATTTA
 GGGTTTTACAGTTGCCCAACTAGAGGTAGCTATCTGATAGGCTCCAGGTGAGCTGCAGTCTATAAAGAGGTTGAAACTACAGCTCAGTCCCTTGA
 TACCTGGAGGGTGTGTGTATTATAGCTCTCTGTGTATTCCCATGCTGAACTAAAGTGTGGAGAGAGCTTCAAGTACTGGAGGGAGGAAACAGAA
 AGTCTAACAGAGGATTTGAGACTTGTATGTCCAAGGCTGTAAGTGCAGGATATATTGTTACTGTGTACACCAATGTGGTGTGAATTGGGACTGT
 CAATATGTAAGCAAGTTGATTTTTTCCATAAAAAGCCAGCAAGGCTTTAAACTTTAAACTTTAAAGGTTGGTGCAGACTCCATTTGTGCTTTAA
 CTGTGCTGTGGCTATGGTCTCACTCTCAACTAATACACACAATAGCTACAAGTCTACCATATATATACCATTAAACATTGGCAACGGGTTAAGATTCA
 AAGCCAACTAAGTGGTGGAGAAAGTGTATCAAGCCTACATGGAAATAATATGACAAATATTAGCAAAATATACCCAGTGAATATTACAGTAAACAT
 ATTTAGAAATATGGTAAATAAATGCTTTTACAAGAAACATGCACAGATAAAGAAATCACATAAGGCTATTGAACTTGCATATAATTAGACTAAATG
 AAGATTTGGGCACATACCAATACACTAGTATACACAAGATCAGTTTGGCTTAACCTTTTGTTCAGCAATTACCAAGAGCGTTGACTAGCCCATGCTAGGT
 TTTTTTCCAAATTTAAAGGTTTTTCAAATTCAGAAAACCAATATAGAGCAACAGCAATACGTTATTGACCTTAAAGGTTGATTGACATTAGGAAAT
 TCCACAAGGCTAAACAACCTGCAACAGAAACAATTTGATAGGTTAATAATTTCCAGATCTCTGAGCAATAGTATAAAACAAGAGGTATCACTCATT
 CAGATCAGGCTTCTCAGAGGTCACCAACCAATACATCTCCAGTCAAGTGGATCAGGCTCATTGTTGTTAATTAGCTCCACTTTAATAGAAATCAG
 AATAATTTCAAAGAGATCAGGTAAGCCTTTAAATGCATTCATGTTATTGAAATCCAAAGCCTCCCTTCAATAAAGAAATTTTATGTAACTTT
 GAGAAAAACATTCTACTTTGAGGATTAAGTATTACATATTGTTATGTTTGTAGTATAAAATAAATTTTTAATAAAGAAAAACAGGATTTGAAA
 GCATGGAAAAATAGAAATGATTTAAAGTAGTTAACAGTGAATAGAAAAAATATTTTACCATACAGTAGCACAAAAGATGCAATCATTTTTAAAAAGTT
 TTGCTATATCCAGTTAATCCCAATTACATACTATTACTAGGCTGTTGGGGATTTTTGCTGTATATTCTTAATATTCTTGATAGTCATTACAGACT
 GCTTCTCTTCTGTATCTTTCATATTTCCATACTGTTCTGTTGATGATGTTCTCTTCATTTTATATTCATATATATTGATAACTTTATTATGCT
 TTCATACAGATGTAGCCATCACAAAGCATATTGCTGACATGTACAATTTATTGACTGAGCGGACCTTCAAAGGACTGTAAGAATTGTATCTAAATTTACA
 ATATATGCAAAATAATTACTTTTCTTTTGTAGTCTAGGATGTAAATGGATTAACCTTGCATGCACATCCTGGAGGCAATTAATACATAATATCTGGCTAT
 AGATGAAGATTTTATATTGTTATTGACTTTTACAGTTTCCCCAAGCAGTATAGTTTATTCTTTGGGATGTTATGTTTTATATAAATGTTTATA
 TAGAAAGTGGATGAGCTTATATTCAATTTGCTATGTCACCATGTTTTATGAATTTGTTTACTTTGCTTTTTACTTTATGCTATTATGGACAATACAAT
 GAATGCTTAAGTACTTATGACTACTTCAGTTATATAAATGCTTCTGTTTGGGATCC

ABB7: Die Nukleotidsequenzen der 5'Enden der beiden Xenopus Albumingene

7a: 68kd Albumingen

7b: 74kd Albumingen

Die TATA-Box ist umrahmt. Der Start der Transkription ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Der sequenzierte Bereich des 68kd Subklons umfaßte 2656bp (ABB7a), der des 74kd Subklons 2074bp. Um für das 74kd Albumingen einen zum 68kd Gen vergleichbaren Bereich abdecken zu können, wurde noch ein zum sequenzierten 74kd Subklon benachbartes, genomisches Eco RI/Bgl II-Fragment subkloniert und vom 5'Ende her ansequenziert. (vergl. ABB1, ABB5b). Somit wurde für das 74kd Gen ein ähnlicher Bereich von insgesamt 2350bp sequenziert (ABB7b). Aus den erstellten Sequenzdaten kann durch Auffinden der für die RNA-Polymerase II transkribierten Gene typischen konservierten Sequenzen, der TATA-Box und der CAAT-Box, die Promotorregion kartiert werden. Der Anfang der proteinkodierenden Sequenz liegt 3' von der TATA-Box und ist durch ein Methionincodon ATG, dem sich offenes Leseraster anschließt, gekennzeichnet.

Eine TATA-Box konnte in den für beide Gene (68kd bzw. 74kd) erstellten Sequenzen identifiziert werden. Sie befindet sich 19 bzw. 18bp 3' von der Bgl II-Schnittstelle entfernt. Damit ist sie für beide Gene ungefähr an der Position, die aufgrund der anfangs durchgeführten *in vitro* Transkriptions-Experimente erwartet wurde, für das 68kd Gen 1.1kb 5' von der Bam HI-Schnittstelle und für das 74kd Gen ca. 0.6kb 5' von der Eco RI-Schnittstelle. 70bp 3' von der TATA-Box entfernt, findet sich für beide Gene ein offenes Leseraster, das für 26 Aminosäuren kodieren könnte und mit der üblichen Konsensussequenz für eine Exon/Intron-Grenze AGGT enden könnte (Gannon et al., 1979). Dieser Bereich ist bis auf wenige Nukleotide für beide Gene identisch (ABB7a,b).

5. Kartierung der in vivo benutzten Startstelle der Transkription

Der Start der Transkription, der sich meist 20 bis 30 Nukleotide 3' von der TATA-Box und vor dem Translationsstart befindet, kann aufgrund der Sequenzdaten allein nicht bestimmt werden. Aufgrund dessen wurden dazu die in vitro Transkriptions-Experimente herangezogen, sowie SP6-Analyse- und "primer extension"-Analysen der in vivo vorkommenden Albumin mRNAs durchgeführt.

Die zur Überprüfung der Subklone durchgeführten in vitro Transkriptions-Experimente (ABB4) für den 68kd Klon deuteten auf einen Transkriptionsstart hin, der 3' von der HindIII-Schnittstelle liegt und ca. 1.1kb von der BamHI-Schnittstelle entfernt ist. Für den 74kd Klon wurden Transkripte erhalten, die 0.6kb 5' von der EcoRI-Schnittstelle initiiert wurden. Mit Hilfe von SP6- und "primer extension"-Analysen sollte der Transkriptionsstart genauer festgelegt, und das erste und zweite Exon charakterisiert bzw. identifiziert werden.

5.1. SP6-Analyse der Albumin mRNAs

Mit einer zur zu untersuchenden RNA komplementären markierten RNA-Probe (SP6-Probe) können Transkripte spezifisch entdeckt und analysiert werden. Durch geschickte Wahl einer SP6-Probe, die sich über die vermuteten Exon-Bereiche erstreckt, kann die Größe des Exons und auch die Position der Transkriptions-Startstelle bestimmt werden. Zur Herstellung einer solchen Probe werden DNA-Fragmente, die die zu untersuchenden Bereiche enthalten, so in die SP6-Vektoren kloniert, daß die davon synthetisierte

RNA-Probe komplementär zur zellulären RNA ist. Nach Hybridisierung der SP6-Probe mit der zu untersuchenden RNA, entstehen dort, wo sich die Sequenzen entsprechen, doppelsträngige RNA-RNA-Hybride. Diese Hybride sind gegen einen nachfolgenden RNase-Abbau resistent. Die Größe der geschützten Hybride ist ein direktes Maß für die Größe des Exons.

Für das 68kd und das 74kd Gen wurden verschiedene SP6-Proben hergestellt, die das vermutete 5'Ende enthalten (ABB8), und zur Untersuchung der Albumin mRNAs eingesetzt wurden. Die SP6-Analyse der beiden *Xenopus* Albumin mRNAs ist nicht ganz einfach, da die beiden mRNAs einander sehr ähnlich sind (Westley et al., 1981). Aufgrund dessen kann eine SP6-Probe mit beiden RNAs kreuz hybridisieren. Die durch die Kreuzhybridisierung entstehenden Hybride sind dann allerdings instabiler. Durch die Wahl von verschiedenen Temperaturen beim RNase-Verdau kann man auf die stabileren korrekten Hybride selektionierten. Daher wurde bei zwei parallelen Analysen der RNase-Verdau bei unterschiedlichen Temperaturen, 30°C und 45°C, durchgeführt.

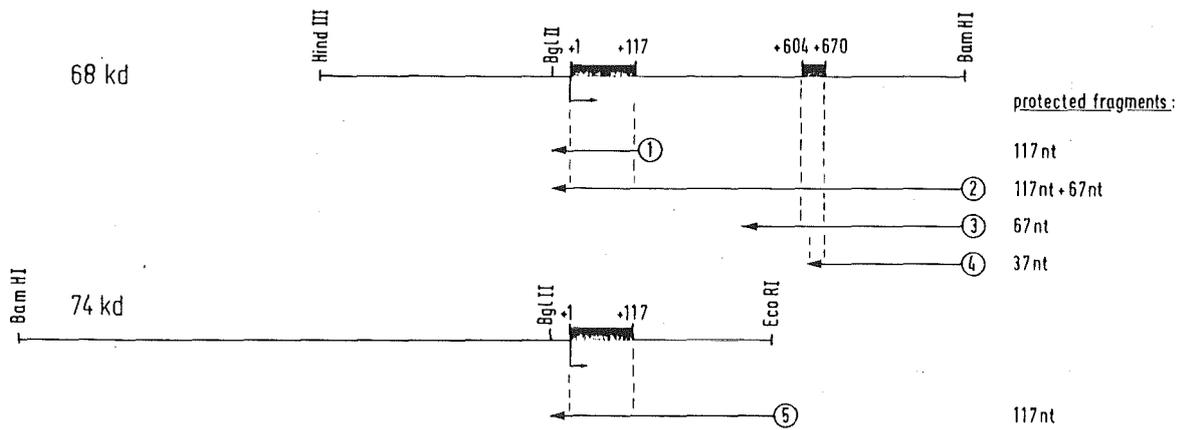


ABB8: Die zur Kartierung des Transkriptionsstartes verwendeten SP6-Proben

Die spezifischen SP6-Proben sind entsprechend ihrer Lage zur genomischen DNA eingezeichnet. Die schwarzen Blöcke stellen die Exons dar. Der Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

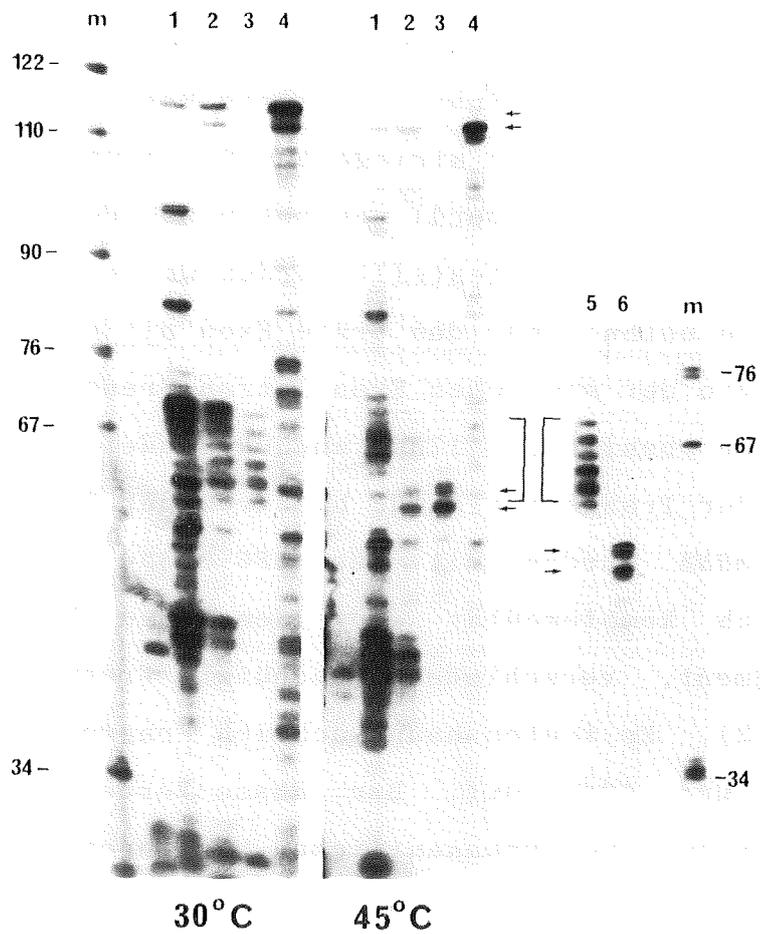


ABB9: Identifizierung von transkribierten Sequenzen in den Subklonen

Autoradiogramm der SP6-Analyse der Xenopus Albumin mRNA. Die Analyse wurde mit 0.6µg polyA⁺-RNA aus der Frosch-Leber durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45°C, der RNase-Verdau wurde entweder bei 30°C oder bei 45°C durchgeführt. Von links nach rechts wurden folgende SP6-Proben eingesetzt: Probe 1 (1), Probe 2 (2), Probe 3 (3), Probe 5 (4), Probe 3 (5), Probe 4 (6). m = DNA-Größenmarker

Die indikativen Fragmente sind durch Pfeile markiert. Durch eine Klammer sind die für das zweite Exon spezifischen Fragmente hervorgehoben.

ABB9 zeigt das Ergebnis der Analysen. Bei der Untersuchung der 74kd mRNA mit Probe 5, die zum 74kd Bgl II/Eco RI-Restriktionsfragment komplementär war, wurden geschützte Fragmente von 116/117nt Größe gefunden (Spur 4). Dieses Resultat wurde durch die zweite Analyse, die unter stringenten Bedingungen stattfand, noch verdeutlicht (45°C, Spur 4) und entsprach den Erwartungen, die aufgrund Sequenzdaten aufgestellt worden waren.

Der 74kd Subklon enthält nur das erste Exon mit einer Größe von 117bp. Wenn man von der möglichen Exon/Intron-Grenze, die nur auf Sequenzvergleichen basiert, 117bp zurückrechnet, befindet sich die Startstelle der Transkription 32 bp 3' von der TATA-Box.

Für die 68kd mRNA wurden mit der SP6-Probe 2, die zu einem ähnlichen Bereich komplementär war, dem 68kd Bgl II/Bam HI-Restriktionsfragment, verschiedene geschützte Fragmente entdeckt (jeweils Spur 2). Es traten hauptsächlich Fragmente der Größen 117nt, 65-70nt und 40nt auf. Der RNase-Verdau bei höherer Temperatur führte zu einer unwesentlichen Verringerung der Banden im Größenbereich zwischen 40 und 60nt (45°C, Spur 2). Es war deutlich zu erkennen, daß spezifisch Fragmente der Größen 116/117nt, 65-70nt und 40/42nt geschützt werden.

Dieses Resultat führte zunächst zu der Vermutung, daß der untersuchte Bereich des 68kd Gens im Gegensatz zum 74kd Gen noch weitere Exonsequenzen enthält.

Daher wurden weitere Analysen mit SP6-Proben durchgeführt, die aufgrund der Sequenzdaten spezifisch für das erste (Probe 1) und zweite Exon (Probe 3 u. 4) sein sollten (vergl. ABB8).

Die für das zweite Exon spezifischen Proben wurden von Deletionsmutanten erhalten. Probe 3 sollte das ganze zweite Exon umfassen, sie war dem Bereich von +449 bis +1050 (BamHI-Schnittstelle komplementär. Probe 4 dagegen sollte ungefähr bis zur

Mitte des zweiten Exons reichen, sie war komplementär zur Region von +634 bis +1050 (BamHI-Schnittstelle).

Probe 4 schützte ein Fragment der Größen von 48-50nt (Spur 6), während mit Probe 3 Fragmente der Größe 63-67nt entdeckt wurden (Spur 3 u. 5), von diesen blieben nach der stringenten Analyse nur noch Fragmente der Größen 63 u. 64nt übrig (45°C, Spur 3).

Diese mit den für das vermutete zweite Exon spezifischen SP6-Proben 3 und 4 erhaltenen Resultate bestätigen die ursprüngliche Annahme, daß der von Probe 2 abgedeckte Bereich und somit der 68kd Subklon noch zusätzlich das zweite Exon enthält.

Die Analyse mit der für das erste Exon spezifischen Probe 1 brachte kein klares Ergebnis. Diese Probe entsprach einem BglII/Aha III-Fragment und umfaßte damit den Bereich des vermuteten ersten Exons und 10bp des nachfolgenden Introns. Mit dieser kurzen Probe 1 wurden wider Erwarten mehrere Fragmente geschützt, die hauptsächlich 70 und 40nt groß waren (Spur 1). Die stringente Analyse bei höherer Temperatur brachte keine Veränderung im Bandenmuster (45°C, Spur 1).

Das Auftreten dieser Banden läßt sich zunächst nur dadurch erklären, daß das erste Exon des 68kd Gens vermutlich kleiner als angenommen und daher möglicherweise unterschiedlich zu dem des 74kd Gens ist.

Um diese Daten zu überprüfen und das erste Exon des 68kd Gens besser zu charakterisieren, wurde eine "primer extension"-Analyse der RNA durchgeführt.

5.2. "primer extension" - Analyse der Albumin mRNAs

Bei der "primer extension" Analyse wird ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid, das komplementäre Sequenzen zur zu untersuchenden

mRNA hat, an die RNA hybridisiert und als Primer benutzt. Mit der mRNA als Matrize wird vom Primer aus mit dem viralen Enzym Reverse Transkriptase eine Kettenverlängerung (extension) in 5' Richtung durchgeführt. Die Extension bricht dort, wo die mRNA beginnt, also bei der Transkriptions-Startstelle, ab, weil danach für die Reverse Transkriptase keine Matrize mehr vorhanden ist. Aus der Größe der verlängerten Ketten kann die genaue Initiationsstelle der in vivo vorkommenden Transkripte bestimmt werden.

Basierend auf den DNA-Sequenzdaten und den aus der SP6-Analyse gewonnenen Erkenntnissen wurden Primer synthetisiert, die zu transkribierten Bereichen komplementär sein sollten (ABB10). Um zwischen den beiden sehr homologen Albumin mRNAs unterscheiden zu können, wurden vor allem auch Primer für einen Bereich der beiden Albumin mRNAs hergestellt, die sich aufgrund der Sequenzdaten um eine Base unterscheiden sollten (primer b und d). Mit diesen Primern sollten die Startstellen der Transkription der beiden Gene und die Exon/Intron-Übergänge charakterisiert werden.

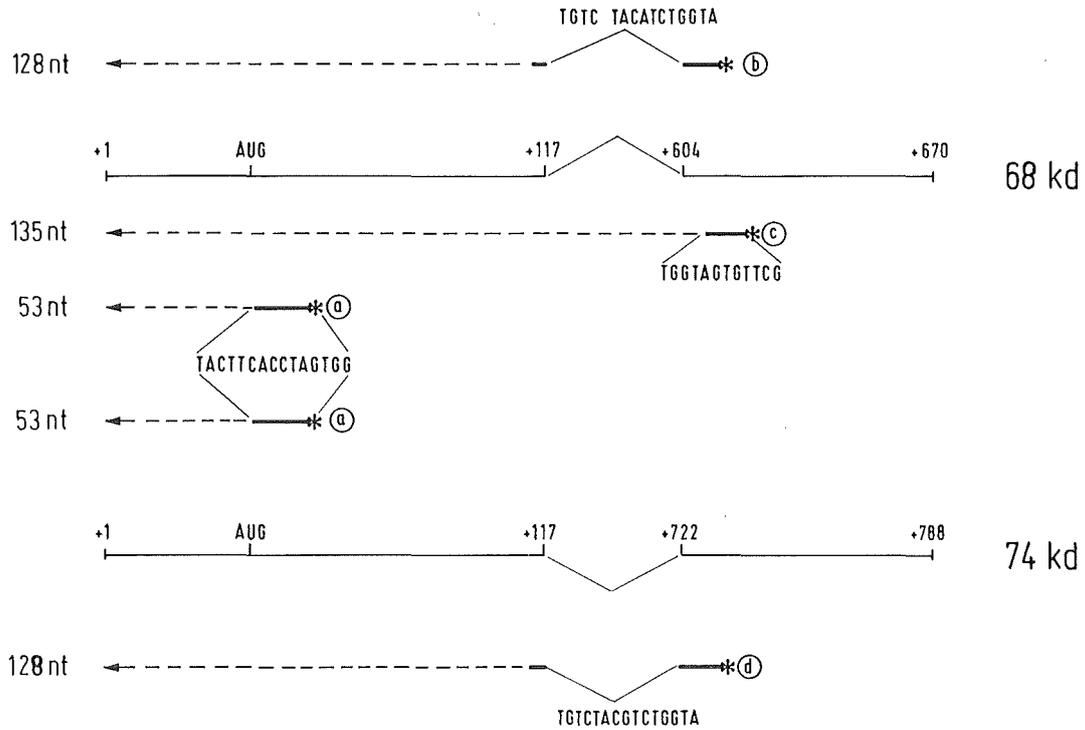


ABB10: Die zur "primer extension"-Analyse verwendeten Oligonukleotidprimer.

Erstes und zweites Exon des 68kd sowie des 74kd Albumingens sind dargestellt. Die Zahlen über den kodierenden Sequenzen geben die Anfangs- und Endpunkte der Exons an. Die dünn gezeichneten Klammern symbolisieren die Intronsequenzen. Die verwendeten Primer mit ihrer spezifischen Sequenz sind entsprechend ihrer Lage zu den kodierenden Sequenzen eingezeichnet. Die Extensionsprodukte sind durch die gestrichelte Linie verdeutlicht, ihre erwartete Größe ist jeweils angegeben.

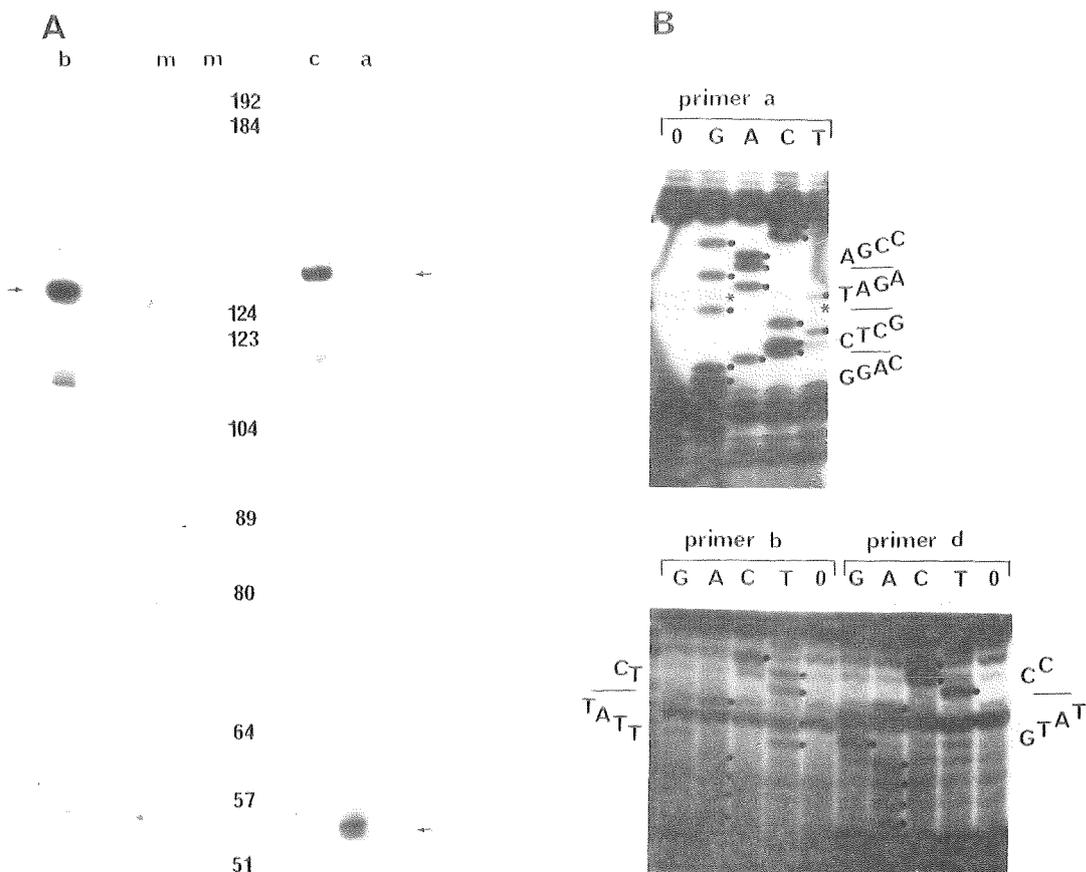


ABB11: In vivo Transkriptionsstart und partielle Sequenz der Xenopus Albumin mRNAs

A: 1.25 μ g polyA⁺-RNA aus der Frosch-Leber wurden mit verschiedenen primern (a,b,c) analysiert. Die Extensionsprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet. m = DNA-Größenmarker (pBR322/Hae III-geschnitten).

B: Die "primer extension"-Sequenzierung der Albumin mRNAs mit den Primern a, b und d wurde wie die "primer extension"-Analyse durchgeführt, doch in Gegenwart der entsprechenden ddNTPs (1.7mM Endkonzentration).

Es sind die Sequenzbereiche dargestellt, in denen sich die beiden ansonsten homologen mRNAs unterscheiden. Bei der mit Primer a erstellten Sequenz ist die für die 74kd mRNA spezifische Basenfolge angeschrieben, während die schwach zu lesende, überlagerte 68kd Sequenz durch Sternchen hervorgehoben ist. Primer b und d erkennen spezifisch die 68kd bzw. 74kd Albumin mRNA, die dafür typische Basenfolge ist angeschrieben.

ABBl1A zeigt das Ergebnis der Analyse. Mit allen eingesetzten Primern wurden Extensionsprodukte erhalten, d.h. alle konnten an transkribierte Sequenzen hybridisieren.

Mit dem für das erste Exon spezifischen Primer a, der aufgrund der Sequenzhomologie in diesem Bereich beide mRNAs erkennen sollte, wurde ein 53nt großes Extensionprodukt erhalten (Spur a). Ein Extensionsprodukt dieser Größe wurde auf Grund der SP6-Analyse der 74kd mRNA auch erwartet. Dieses Resultat bestätigt zumindest für das 74kd Gen, daß sich die Startstelle der Transkription 32bp 3' von der TATA-Box befindet.

Mit Primer c, der seine komplementäre Sequenz im zweiten Exon der Gene haben sollte, wurde ein Extensionsprodukt mit der Größe von 135nt gefunden (Spur c). Dieses Resultat bestätigt zum einen den obigen Befund über die Lage des Transkriptions-Starts und zum anderen die Präsenz des zweiten Exons.

Mit Primer b, der spezifisch für die 68kd mRNA sein und der über die vermuteten Exon/Exon-Grenze hybridisieren sollte, wurde ebenfalls eine Kettenverlängerung erhalten (Spur b). Die Größe des Extensionsproduktes betrug 128nt. Damit befindet sich die Startstelle der Transkription des 68 kd Gens an gleicher Stelle wie beim 74kd Gen. wird. Die aufgrund der Sequenz angestellten Vermutungen über den Verlauf der Exon/Exon-Grenzen waren also richtig.

Dieses mit Primer b erhaltene Resultat könnte allerdings auch darauf zurückzuführen sein, daß dieser Primer mit der sehr homologen 74kd mRNA hybridisierte, denn die Sequenzen unterscheiden sich im Bindungsbereich des Primers eben nur um eine Base. Um zu beweisen, daß mit Primer b spezifisch die 68kd mRNA analysiert wurde, wurde mit diesem Primer eine "primer extension"-Sequenzierung der mRNA durchgeführt. Parallel dazu

wurde, mit dem entsprechenden um ein Nukleotid unterschiedlichen Primer d, der spezifisch die 74kd mRNA erkennen sollte, die gleiche Analyse vorgenommen.

Mit der RNA-Sequenzierung konnte nicht der ganze Exonbereich abgedeckt werden, da oft unspezifische Kettenabbrüche erhalten wurden. Dennoch konnten für einige Bereiche ganz deutlich lesbare Sequenzen erhalten werden. (ABB11B)

Mit Primer b wurde eine RNA-Sequenz erhalten, die der 68kd DNA-Sequenz entsprach., während mit Primer d, eindeutig die 74kd mRNA erkannt wurde (11B, primer b u. d). Mit dem Primer a, der aufgrund der homologen Sequenz an beide mRNAs hybridisieren sollte, wurde eine Hybridsequenz erhalten, die sich aus den überlappenden Sequenzen der 68kd und 74kd mRNAs zusammensetzt (ABB11B, primer a).

An einigen Stellen wurden Unterschiede in der RNA-Sequenz zur DNA-Sequenz entdeckt, die trotz nochmaliger Überprüfung bestehen blieben. Dies wurde vor allem für die 68kd-Sequenzen gefunden bei Position +83, +86 und +95 (Daten nicht gezeigt). Es könnte möglich sein, daß die DNA und damit auch die RNA (vor allem beim 68kd Gen) an einigen Stellen genetisch polymorph sind. Die Unterschiede könnten allerdings auch infolge von Klonierungs-Artefakten entstanden sei. Diese Befunde erklären möglicherweise die Daten, die für das 68kd Gen mit der SP6-Analyse erhalten wurden. Durch die Sequenzunterschiede war die SP6-Probe nicht über den ganzen Bereich des ersten Exons zur zu untersuchenden RNA homolog. Aufgrund dessen wurden statt des erwarteten großen Fragments hauptsächlich zwei kleinere beobachtet.

Die aus der "primer extension"-Analyse erhaltenen Resultate beantworten die eingangs gestellten Fragen:

Die untersuchte 5'Region beider Xenopus Albumingene enthält die

ersten zwei Exons.

Die in vivo benutzte Startstelle der Transkription konnte aufgrund der sich deckenden Daten der Sequenzierung, der in vitro Transkriptions-Experimente, der SP6- und der "primer extension" Analyse eindeutig kartiert werden. Sie befindet sich für beide Gene 32bp 3' von der TATA-Box entfernt (ABB7). Diese Anordnung stimmt mit der für eukaryontische Promotoren postulierten Struktur überein (Serfling et al., 1985a).

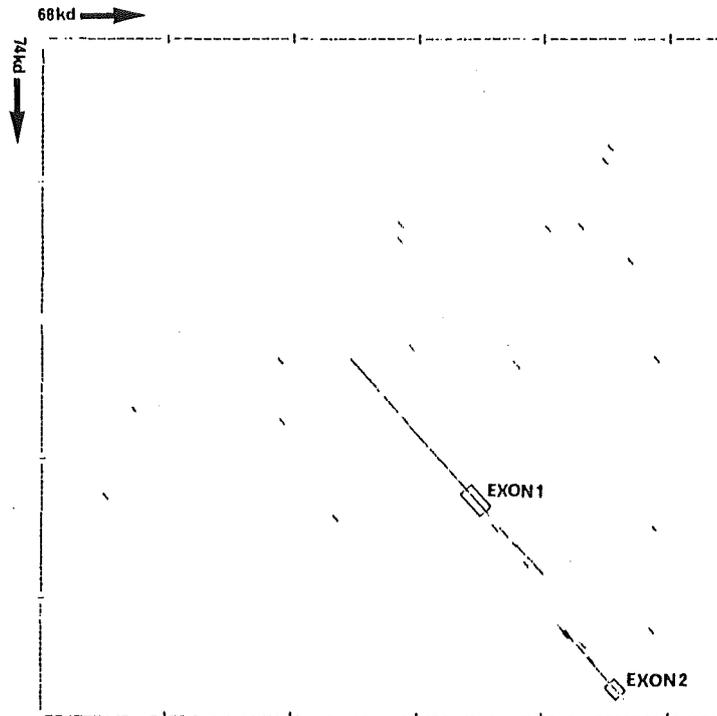
6. Die Sequenz der 5' Enden der Xenopus Albumingene

Die erstellten DNA-Sequenzen für beide Xenopus Albumingene umfaßten für das 68kd Gen 2656bp und für das 74kd Gen 2350bp (2074bp für den genomischen BamHI-EcoRI-Subklon und die ersten 276bp des 3' benachbarten EcoRI-BglII-Fragmentes). Darunter waren 1606bp 5' flankierende Region für das 68kd Gen bzw. 1517bp für das 74kd Gen. Das erste Exon ist bei beiden Genen 117bp groß. Es enthält eine nicht-translatierte Region von 38bp, der nachfolgende translatierte Bereich kodiert für 26 Aminosäuren. Der Translationsstart stimmt mit der Kozak'schen Regel überein. Mit der Sequenz CAGTC unmittelbar vor dem Translation-Startcodon entsprechen 3 der 5 möglichen Basen der aufgestellten Konsensus-Sequenz CCA/GCC (Kozak, 1984). Das erste Exon endet mit der Sequenz AG/GT, einer Konsensussequenz für Exon/Intronübergängen, die u.a. auch für das menschliche Albumingen definiert wurde (Gannon et al., 1979; Sakai et al., 1986). Danach folgen 486bp (68kd Gen) bzw. 604bp (74kd Gen) Intronsequenzen. Das zweite Exon könnte für beide Gene wieder gleich groß, 67bp, sein. Es kann für 22 Aminosäuren kodieren und endet zumindest für das 68 kd Gen (vergl. SP6-Daten) wiederum mit

einer Konsensussequenz CT/GT. Schließlich folgen für beide Gene noch 380 bzw. 45bp Intronsequenzen (ABB7 und 13).

6.1. Die Sequenzen der beiden Gene zeigen große Homologie

Bei einem Vergleich der 68kd Sequenz mit der des 74kd Gens wurden sehr große Homologien festgestellt. In ABB12 wird diese Sequenzhomologie der beiden Gene in einer "dot matrix" verdeutlicht. Für diese Darstellungsform wird mit einem speziellen Computerprogramm immer eine Sequenzfolge von 10bp der einen Sequenz mit der gesamten anderen Sequenz verglichen. Dort wo eine Sequenzfolge mit der zu vergleichenden Sequenz zu 80% homolog ist, wird ein Punkt gesetzt. Im Idealfall, wenn beide Sequenzen identisch sind, entsteht eine Gerade.



ABD12: Die Sequenzen der beiden Xenopus Albumingene sind sehr homolog

Es ist ein Dot Matrix-Vergleich der beiden Albuminsequenzen gezeigt. Die von links nach rechts verlaufende 68kd Sequenz wurde gegen die von oben nach unten aufgezeigte 74kd Sequenz verglichen. Eine zwischen beiden Genen zu 80% homologe Folge von 10 Basen wurde durch einen Punkt gekennzeichnet. Der die kodierende Sequenzen umfassende Bereich ist eingerahmt.

Der Homologiebereich erstreckt sich über 550bp. Er beinhaltet ca. 400bp 5'flankierende Sequenzen mit Promotorregion, das erste Exon und noch 40bp des nachfolgenden Introns. Am größten - ca. 91% - ist die Homologie im Bereich der TATA-Box, des Transkriptionsstarts und des ersten Exons. Ansonsten liegt die Homologie zwischen beiden Genen bei 86%. Ein zweiter Bereich mit 75% Homologie beginnt im ersten Intron ca. 180bp vor dem zweiten Exon und endet ca. 40bp nach dem zweiten Exon. Die Homologie für die kodierenden Sequenzen des zweiten Exons beträgt 88% (ABB13).

ABB13: Die homologe Nukleotidsequenz der 68kd und 74kd Albumingene.

Die Sequenzen der beiden Albumingene sind einander angeglichen, um ihre große Homologie in diesem Bereich zu verdeutlichen. Die konservierten Bereiche umfassen die Promotorregion, das erste und zweite Exon.

Der Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die TATA-Box ist eingerahmt. Die Klammern markieren die Exon/Intron- ([) bzw. die Intron/Exon-Struktur (]).

68kd albumin
74kd albumin

```

1160      TATTTAGCAAATATACCCAGTGAAATATTTACAGTAAACATATTTTABAATTATGGTAAA      -397
          |||
1118      TTT
          TTATTGTTAA

1220      TAAATGCTTTTACAAAGAAACATGCACAGATAAAAGAATCACATAAGGCTATTTGAACCT
          |||
1131      TAAATGCTTTTACAAAGAAAATGTGCAAAACAAAATGATCATATGAGGCTATTTGAACCT

1280      TGCATATAATTAGACTAATGAAGATTTGGGCACATACCAATACACTAGTATACACAAG
          |||
1191      TGCATATAATTGGACCAAATGAAGATGTGGGCCAGACCAATACACTAGCATACGCAAG

1340      ATCAGTTTGTCTAACCTTTTGTTCAGCAATTACCAAAGACGTTGACTAGCCCATGCTAGG
          |||
1251      ATCAGTTTGTCTAACCTTTTGTCTGCAATTACCAAAGACTTTGATTAGCCCATGCTAGT

1400      TTTTTTTTCCACAATTTAAAAGGTTTTT CAAAATTCAGAAAACCAATATAGAGCAACAG
          |||
1311      TTTTTCCCTTTAATTTACAAGGCTTTAAAAAAAAGCAGCAAATCAATATACAGCAACAG

1458      CAATACGTTATTTGACCTTAAAAGTTGATTGACATTAGGAAATCCACAAAGCTAAAACA
          |||
1371      CAATACATTATTTGACCTTAAAAGTTATTTGACTTTAGG AACTCCACAAAGCTAAAACA

1518      ACTGCAAAACAGAACAAATTTGATAGGTTAATAATTTTCCAGATCTCTCTGAGCAATAGTAT
          |||
1430      ACTGCAAAACAAACACATTTTATAGGTTAATCATTTTCCAGATCTCTCT AGGAATGATAT

1578      AAAACAAGAGGTATCACTCATTTCAGATCAGGCTTCTCAGAGBTCCCCACCAATACATC
          |||
1489      AAAACAAGTGATATCAATCATTCTGATCAGGCTTCTACGAGBTCCCCACCTAATACATC

1638      TCCAGTCATGAAGTGGATCACCCCTCATTGTCTGTTAATTAGCTCCACTTTAATAGAATC
          |||
1549      TCCAGTCATGAAGTGGATCACCCCTGATTGTCTGTTAATTAGCTCCTCTTTCATTGAATC

1698      AAGAATAATTTCAAAGAGATACAGGTAAGCCTTTAAATGCATTCATCGTTATTGAAAT
          |||
1609      AAGGATACTTTCAAAGAGATACAGGTAAGCCTTTAAATGCATTCATCGTTATTGAAAT

1758      CCAAAGCCTCCCCCTTCAATAAAGAATTTTATGTAACCTTTT      +183
          |||
1669      CCAAAGACATCCAAATCTAATATTTAAAATAT

2000      TT TGCCTAT AT CCAAGTAAATCCCAA TTA CATACTATT
          |||
2000      ATATTATAACTTTAATTTGAAAGTTCTGCCCTATTTTACTATATCCAGBTTTCATTTAACT

2037      +431 TAG GTGCTGTGGGGATTTTGTCTTGATATTCTTAATATTCTTGATAGTCA
          |||
2060      TACCAATTAGAATCTGTTTGGGATTTTACTTGATATTCTCAATACTCTTCAT A
          |||
2092      TTACAGACTGCTTTCTCTTTCTGTATCTTTTCATATTTCCATACTGTTTCTGTTCATGAT
          |||
2116      TT CAGCCTGCTTTCTCTTTCTGTGTCTTTTCATGTTTTCATACTGTTTCTGTGCATGTC

2152      GTTCTCT TCATTTTATATTCATATATATTGATAACTTTATTATGCCTTTTCAT
          |||
2175      GACCTATTTGGTATAAATTTATATATATATATTTATAATGCTTAATTATGGCTATCTT

2206      ACAGATGTAGACCATCACAAAGCATATTGCTGACATGTACAATTTATTGACTGAGCGGACC
          |||
2235      GTAGATGCAGACCATCACAAAGCATATTGCTGATGTATACCCGCATTGACTGAGCGGACC

2266      TTCAAAGGACTGTAAGAATTGTATCTAAATTTACAATATATGCAAATAATTACTCTTTTC
          |||
2295      TTCAAAGGACTGTAAGAATTATATCCAAATATACATTATA CTAATAAAACATATAA
          |||
          +715
          +830
    
```

Der große konservierte Bereich zwischen den beiden Albuminsequenzen wird in ABB12 durch eine lange, im Bereich des ersten Introns unterbrochene Gerade symbolisiert. Da sich diese Homologie vor allem auch ca. 400bp weit in den 5'flankierenden Bereich beider Gene erstreckt, kann man annehmen, daß in dieser Region Sequenzen lokalisiert sind, die für die Regulation der Gene außerordentlich wichtig sind.

Eine Computeranalyse dieses Sequenzbereichs zur Auffindung von bekannten, konservierten Regulationselementen endete erfolglos. Der untersuchte Bereich enthält nur die schon charakterisierte TATA-Box. Zwar sind in beiden Albuminsequenzen CCAAT-Motive (Efstradiatis et al., 1980) zu finden, jedoch sind diese nach den allgemein gültigen Definitionen zu weit vom Transkriptionsstart entfernt: in der 68kd Sequenz wurde ein Motiv bei Position -160, in der 74kd Sequenz eines mit der Sequenz bei Position -315 (ABB13). Obwohl die Regionen, in denen diese beiden Sequenzmotive zu finden waren, noch zu dem zwischen den beiden Genen konservierten Bereich gehören, waren diese Motive jeweils nur in einer der beiden Sequenzen zu finden. Ob sie tatsächlich funktionell von Bedeutung sind, bleibt noch zu beweisen.

6.2. Das erste Exon der Albumingene zeigt bei Xenopus, Huhn und Säugern den gleichen Aufbau

Ein Vergleich der Xenopus Albuminsequenzen mit bekannten Sequenzen aus dem 5'Bereich der Albumin- und α -Foetoproteingene verschiedener Spezies ergab für die 5'flankierende Region keine offensichtliche Sequenzhomologien.

Beim Vergleich der leader-Sequenzen, d.h. der nicht-translatierten Sequenzen des ersten Exons wurde in beiden Xenopus Albuminsequenzen ein Pentanukleotid der Sequenz CCCAC gefunden, das schon für die Albumine der Säuger und des Huhns beschrieben wurde (Sargent et al., 1981; Dugaiczky et al., 1982; Haché et al., 1983). Dieses Pentanukleotid hat seine komplementäre Sequenz GTGGG (bei den Xenopus Albuminen nur GTGG) innerhalb der translatierten Region der mRNAs. Durch Computeranalysen kann man eine "stem und loop" Struktur vorhersagen, bei der die einzelsträngige mRNA teilweise mit sich selbst hybridisiert und eine doppelsträngige Region ausbildet, von der eine einzelsträngige RNA-Schleife = "loop" ausgeht. Dieser "loop" enthält das Translationsstartcodon AUG und eine Sequenz, die komplementär zum 5'Ende der 18S rRNA ist (ABB14). Solche Strukturen wurden auch schon für die Rattenalbumin, Hühneralbumin, und menschliche mRNA vorhergesagt. In wieweit diese mögliche Sekundärstruktur für die Translationseffizienz und die Genauigkeit, mit der das Initiationscodon abgelesen wird, wichtig ist, ist noch nicht geklärt.

```

Xenopus 68kd alb :      +1
AGGCTTCTCAGAGGTCCCACCCAATACATCTCCAGTCATGAAGTGGATC
Xenopus 74kd alb : +1  AGGCTTCTCAGAGGTCCCACCTAATACATCTCCAGTCATGAAGTGGATC
chicken alb : AGCATT TTTGAATAATTTAGCCCACATCATAATCTGCAGCCATGAAGTGGGTA
rat alb : GACCACCTTTCCCTGGCAACCCCACTGCCTCTGGCAACAATGAAGTGGGTA
human alb : GCTTTTCTTCTGTCAACCCCACACGCCTTTGGCACAAATGAAGTGGGTA
    
```

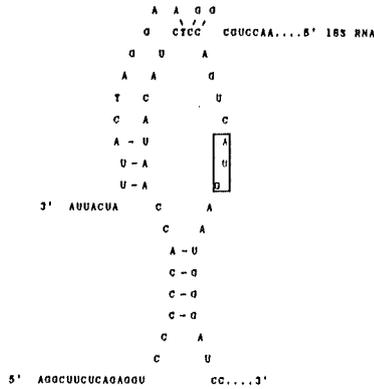


ABB14: Die "leader"-Sequenzen verschiedener Albumingene besitzen ein konserviertes Pentanukleotid

Die "leader"-Sequenzen der Albumingene von Huhn (Hache et al., 1983), Ratte (Sargent et al., 1981) und Mensch (Dugaiczky et al., 1982) wurden mit denen der Xenopus Albumingene verglichen. Das Translationsstartcodon ist eingerahmt. Das konservierte Pentanukleotid CCCAC und seine komplementäre Sequenz im translatierten Bereich sind unterstrichen.

Darunter ist eine hypothetische stem und loop - Struktur der Xenopus Albumin mRNA, zusammen mit der Xenopus 18S RNA gezeigt. Die möglichen Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Sequenzen sind durch Striche verdeutlicht.

Albumine und α -Foetoproteine sind sezernierte Proteine und besitzen daher ein Signalpeptid aus 18-19 überwiegend hydrophoben Aminosäuren, das vor der Sekretion abgespalten wird. Dieses Signalpeptid wird im ersten Exon kodiert. Weiterhin besitzen Albumine ein basisches Propeptid, das im Golgi-Apparat vom reifen Protein abgespalten wird. Dieses Propeptid besteht meist aus 6 basischen Aminosäuren - mit Ausnahme des Hühneralbumins, dessen Propeptid aus 8 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Desweiteren enthält das erste Exon noch die Information für die ersten beiden Aminosäuren des reifen Proteins (Tilghman, 1985).

Ein Vergleich der aus den Sequenzdaten abgeleiteten Xenopus Aminosäuresequenzen mit den bekannten Aminosäuresequenzen von Säugern und Vögeln ergibt einige Homologien (ABB15).

		EXON 1		EXON 2	
		prepeptide	propeptide	mature protein	
Xenopus	68kd:	MKWITLICLLISSTLIES	RII FKR	DT	DVDHHKHIADMYNLLTERTFKGct
	74kd:	-----SF---	--L ---	--	-A-----V-TA-----
chicken	alb:	---V---SFIFLFSSAT-	-NLQR-A-	-A	N.D.
rat	alb:	---V-FLL--FI-GSAF-	-GV -R-	EA	HKSEIAHRFKDLGEQHFKGLVL..
bovine	alb:	---V-F-S--LLFSSAY-	-GV -R-	--	HKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVL..
human	alb:	---V-F-S--FLFSSAY-	-GV -R-	-A	HKSEVAHRFKDLGEENFKALVL..
mouse	AFP:	-----PAS-ILLHFAA-	KALHENEFGI		ASTLDSSQCVTTEKNVLS..
rat*	AFP:	---SASISF-LLLNFAEP	-VLHTNEFGI		ESTLDSSQCPTTEKNMFN..
human	AFP:	---VESIF-IFLLNFTE-	-TLHRNEYGI		ASILDSYQCTAEISLADct

ABB15: Das erste Exon der Xenopus Albumingene zeigt einen Albumin-typischen Aufbau.

Die Aminosäuresequenzen für das erste und zweite Exon verschiedener Spezies sind in Angleichung zu denen der Xenopus Albumingene dargestellt. Alle Sequenzen außer der des Rinder Serumalbumins (Chung et al, 1980) sind von DNA-Sequenzen abgeleitet. Die Pre- und Propeptidgrenzen sind durch eine gestrichelte bzw. durchgezogene Linie markiert.

- identische Aminosäure

* Für diese vergleichende Darstellung wurde vom zweiten Translationsstartcodon ausgegangen

..Hier waren die genaue Grenze für das zweite Exon nicht bekannt.

Die ersten drei Aminosäuren sind für alle Albumine und α -Foetoproteine identisch. Zum Maus α -Foetoprotein erstreckt sich die Sequenz sogar über die ersten 5 Aminosäuren. Die weiteren Aminosäuresequenzen zeigen keine großen Homologien mehr. Jedoch sind die Aminosäurecodons an der Grenze zwischen Signalpeptid (oder Prepeptid) und Propeptid konserviert geblieben, ebenso wie an der Grenze zwischen Propeptid und reifem Protein. Der Vergleich mit den Pre- und Proregionen von Albuminen anderer Spezies gibt Anlaß zu der Vermutung, daß das erste Exon der beiden Xenopus Albumingene für das Prepeptid (18 Aminosäuren), das Propetid (6 Aminosäuren) und für die ersten zwei Aminosäuren des reifen Proteins kodiert.

II. FUNKTIONELLE ANALYSE DER ALBUMINGENE DES XENOPUS LAEVIS

Die Aktivität von Genen wird größtenteils auf Transkriptionsebene durch das Zusammenwirken von cis-wirkenden DNA-Elementen mit trans-wirkenden Faktoren, Proteinen (Ptashne, 1986) reguliert. Im zweiten Teil meiner Arbeit sollten nun über funktionelle Untersuchungen solche cis-wirkenden DNA-Elemente definiert werden, die für eine konstitutive und gewebespezifische Expression der Albumingene verantwortlich sind. Diese DNA-Elemente zeichnen sich dadurch aus, daß ihre regulatorischen Eigenschaften auf heterologe Gene übertragbar sind, wenn sie vor diese gesetzt werden. Zur genauen Analyse regulatorischer Elemente werden daher meist Fusionsgene eingesetzt, die sich aus der 5'flankierenden Region des zu untersuchenden Gens und der proteinkodierenden Sequenz eines Indikatorgens zusammensetzen. Als Indikatorgene wurden bisher virale Gene wie z.B. das Thymidinkinase-Gen des Herpes simplex Virus (Chandler et al., 1983; Hynes et al., 1983), das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT; Gorman et al., 1982) oder auch eukaryontische Gene wie z.B. die α - und β -Glogingene von Kaninchen, Maus oder Mensch (Treisman et al., 1983; Banerji et al., 1983; Ponta et al., 1985) und das Dehydrofolatreduktase-Gen (DHFR; Deschatrette et al., 1985, verwendet. Die Analyse unter Zuhilfenahme solcher Indikatorgene hat etliche Vorteile: So besitzen die Indikatorgene selbst keine regulatorischen Sequenzen mehr, dadurch wird gewährleistet, daß die beobachteten, auf das Indikatorgen ausgeübten Effekte nur durch die Einwirkung des 5'flankierenden Bereichs vom zu untersuchenden Gens entstanden

sind. Außerdem sind die üblicherweise verwendeten Indikatorgene meist relativ klein und somit leichter transfizierbar. Von außerordentlichem Vorteil ist schließlich die Tatsache, daß mit Hilfe eines in Zellen oder in den Organismus eingeschleusten Fusionsgens die Regulation eines Gens losgelöst von der des endogenen untersucht werden kann. Schließlich kodieren manche dieser Indikatorgene für funktionsfähige Enzyme, deren Aktivität leicht bestimmt werden kann (CAT-Gen) bzw. auf deren Expression selektioniert werden kann (DHFR-Gen).

Für die Identifizierung von regulatorischen DNA-Elementen in der 5'flankierenden Region der Xenopus Albumingene wurde als Indikatorgen das bakterielle CAT-Gen gewählt, dessen Expression in einem recht einfachen Enzymtest gemessen werden kann (Gorman et al., 1982). Dazu wurden in den CAT-Expressionsvektor pBLCAT3 (Luckow und Schütz, unveröffentlicht) verschieden große 5'flankierende Sequenzen des Albumingens vor die proteinkodierende Sequenz des CAT-Gens kloniert. Dieser CAT-Vektor enthält 3' vom CAT-Gen Sequenzen des SV40 Virus, die für ein korrektes Spleißen und die Polyadenylierung der RNA sorgen (ABB16). Er kann daher in eukaryontischen Zellen exprimiert werden und das CAT-Gen untersteht der Kontrolle der Albuminsequenzen.

Aufgrund der gefundenen, großen Sequenzhomologien von 68kd und 74kd Gen wurde nur das 68kd Gen weiter untersucht.

Zur Herstellung solcher Fusionsgene mußte zunächst eine 68kd 3'Deletionsmutante kloniert werden, die noch den Albuminpromotor mit Transkriptions-Startstelle besitzt, jedoch nicht mehr die authentische Startstelle der Translation. Ein in der Albuminsequenz vorhandenes Startkodon für die Translation würde in einem Albumin/CAT-Fusionstranskript zuerst benutzt werden und

daher mit dem Translationsstart des Indikatorgens, des CAT-Gens, interferieren. Die Klonierung dieser 3'Deletionsmutante ist in ABB16 zusammengefaßt. Von einer Deletionsmutante, deren 3'Ende bei +19 war, wurde der Bereich von -662 bis +19 mit den Restriktionsenzymen HindIII und Bgl II ausgeschnitten und in den Polylinkerbereich des Vektors pBLCAT3 vor das CAT-Gen gesetzt.

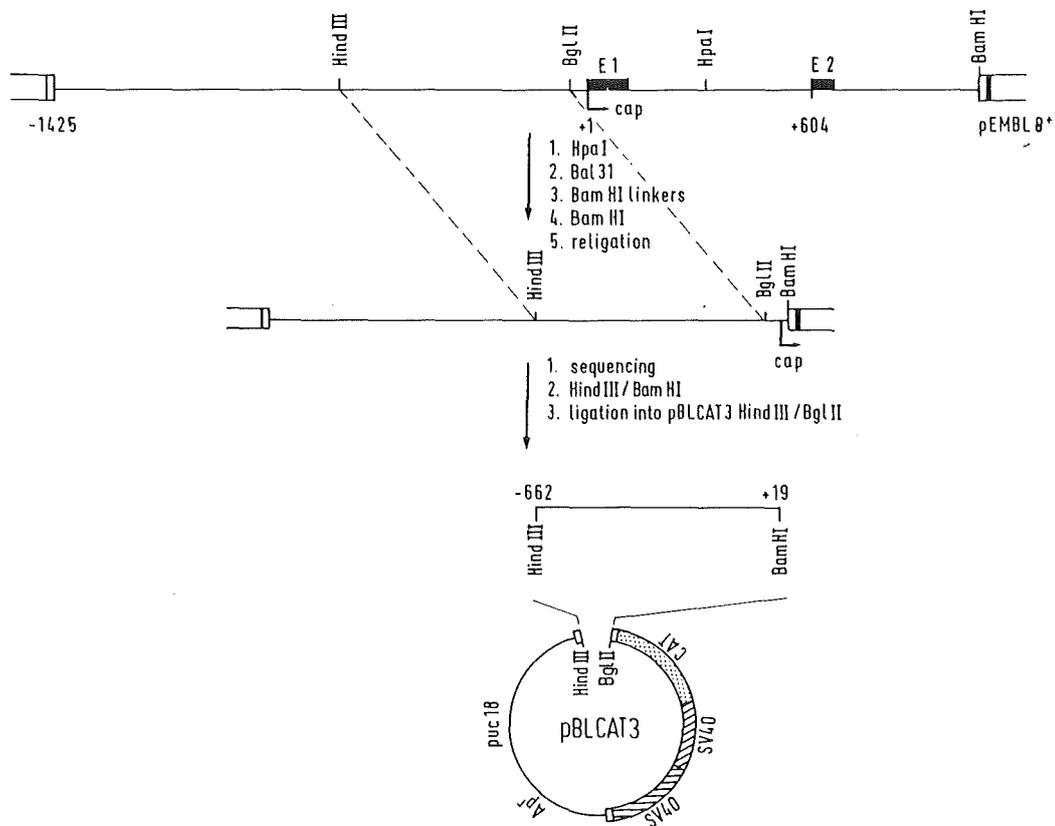


ABB16: Die Klonierung des -662 ALB/CAT-Gens

Als Ausgangskonstrukt zur Klonierung des -662/+19 - Fragmentes vom 68kd Albumingen in den Vektor pBLCAT3 (Luckow und Schütz, unveröffentlicht) diente die Bal31-Deletionsmutante -1425. Die einzelnen Klonierungsschritte sind angegeben.

Von diesem ursprünglichen Albumin/CAT-Hybridgen ausgehend wurden alle anderen Konstrukte mit verschiedenen großen Albumin 5'Regionen erhalten: Für die Herstellung des kurzen -50 ALB/CAT-Fusionsgens wurde der -662 ALB/CAT-Klon an der singulären Bgl II-Schnittstelle bei Position -50 der Albuminsequenz aufgeschnitten. Dann wurden die überstehenden Enden aufgefüllt und mit Hind III-Linkern versehen. Anschließend wurde mit HindIII nachgeschnitten und das somit ausgeschnittene HindIII/ Bgl II-Fragment, von -662 bis -50, vom Vektor abgetrennt. Der verbliebende Vektor wurde wieder geschlossen.

Die 5'Deletionsmutanten von -340 bis -180 (außer -211) wurden in den ursprünglichen ALB/CAT-Vektor über die HindIII- und Bgl II-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Zur Klonierung des -1425 und -211 ALB/CAT-Gens wurden die im pEMBL8⁺-Vektor befindlichen 5'Deletionsmutanten mit dem in der Vektorsequenz schneidenden Restriktionsenzym ClaI und dem in der Albuminsequenz bei Position -50 schneidenden Enzym Bgl II ausgeschnitten und in die ClaI- und Bgl II-Schnittstelle des ursprünglichen ALB/CAT-Vektors eingebracht. Das -4200 ALB/CAT-Hybridgen wurde durch Einsetzen eines 5'benachbarten 3.6kb großen HindIII-Restriktionsfragmentes in die HindIII-Schnittstelle des Ausgangshybridgens kloniert.

1. 69 bp genügen zur konstitutiven Expression in Oocyten

Für die konstitutive Expression verschiedener viraler und zellulärer Gene sind hauptsächlich zwei Elemente im 5'flankierenden Bereich von Bedeutung die TATA- und CCAAT-Box (siehe oben).

Für beide Xenopus Albumingene findet sich auf der Sequenz eigentlich nur ein TATA-Box. Um nun zu untersuchen, welche weiteren Sequenzbereiche für die konstitutive Expression wichtig sind, wurde eine Reihe von Albumin/CAT-Hybridgenen in Xenopus Oocyten injiziert und deren Expression untersucht. Auf diese Art konnte auch schon der Promotor des HSV-Thymidinkinasegens genauestens untersucht werden (McKnight und Kingsbury, 1982).

Die Expression der injizierten Fusionsgene wurde zunächst über die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase bestimmt. Es zeigte sich, daß die injizierten ALB/CAT-Konstrukte -662, -340, -274, -180 und -50 alle gleich stark exprimiert wurden. Um jedoch genauere Aussagen über die Transkripte der Hybridgene zu erhalten, wurde die RNA injizierter Oocyten mittels der "primer extension" Methode analysiert (ABB17).

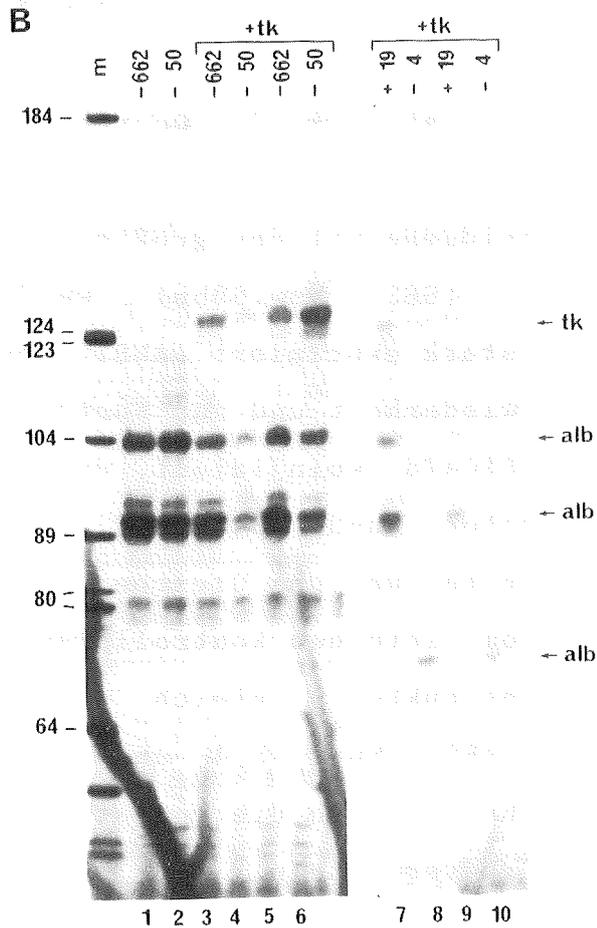
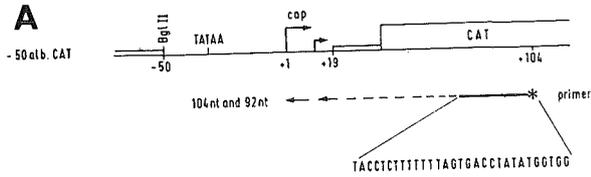


ABB17: 69 bp reichen zur konstitutiven Expression des ALB/CAT-Hybridgens in den Oocyten

A: Zur Bestimmung der korrekt initiierten Transkripte wurde ein ein 30-mer Oligonukleotid, das seine komplementäre Sequenz im CAT-Gen hat, verwendet. Dieser CAT-Primer ist entsprechend seiner Lage zum Albumin CAT - Hybridgen (als Beispiel ist das -50 ALB/CAT- Gen dargestellt) aufgezeichnet. Die erwarteten Extensionsprodukte sind als gestrichelte Linie, mit Pfeilen am Ende, dargestellt. Ihre Größen sind angegeben.

B: Je 30-40 Xenopus Oocyten wurden entweder mit 500ng ALB/CAT-DNA bzw. mit 400ng ALB/CAT-DNA und 100ng pBLCAT8⁺-DNA injiziert. Nach 20-24h wurde die RNA isoliert und der "primer extension"-Analyse unterzogen. Es wurden pro Reaktion 20µg RNA, die in etwa 4 Oocyten-Äquivalenten entsprechen, eingesetzt.

Die erhaltenen Extensionsprodukte sind durch Pfeile markiert. m = DNA-Größenmarker (pBR322/HaeIII-geschnitten); +tk = mit koinjiziertem Kontrollplasmid (pBLCAT8⁺)

Ergebnisse aus verschiedenen Experimenten zeigten, daß in den Oocyten zwei unterschiedlich große Transkripte von den ALB/CAT-Genen abgelesen werden, die auf verschiedene Startstellen zurückzuführen sind (ABB17:Spur 1,2). Neben dem erwarteten Extensionsprodukt von 104nt trat noch ein um 12nt verkürztes von 92nt auf. Die beiden Extensionsprodukte zeigten ähnlich starke Intensitäten, daher ist anzunehmen, daß beiden Startstellen gleich häufig benutzt werden. Aufgrund der Größe der Extensionsprodukte ist eine der in den Oocyten benutzten Startstellen identisch mit der in vivo benutzten, während die zweite oocytenspezifisch zu sein scheint und sich 12nt 3' von der in vivo Startstelle befindet. Die Initiation in den Oocyten ist also nicht so akkurat wie in vivo.

Die beiden untersuchten ALB/CAT-Hybridgene mit der größten bzw. kürzesten 5'flankierenden Sequenz (662 bzw. 50bp) werden tatsächlich wider Erwarten gleich stark exprimiert (ABB17:Spur 1,2). Die Experimente wurden daher wiederholt und zur Kontrolle der Injektion wurde das Plasmid pBLCAT8⁺ koinjiziert, das ein Hybridgen aus Thymidinkinase-Promotor und CAT-Gen trägt (Klein-Hitpaß et al., 1986). Das Resultat war das Gleiche: unter Berücksichtigung der Transkripte vom internen Kontrollplasmid werden von den beiden Konstrukten gleich viele Albumin/CAT-Transkripte erhalten (ABB17:Spur 3,4 und 5,6). Albuminsequenzen von -50 bis +19 enthalten also die vollständige Information, konstitutive Expression zu vermitteln.

Die weitere Verkleinerung dieser Region führte zum Verlust des richtigen Transkriptions-Startes. Die wenigen, noch beobachteten um etwa 20nt verkürzten Transkripte (genau wie die erfolgte Deletion) sind auf die aberrante Startstelle zurückzuführen. (ABB17:Spur 7,8 und 9,10).

Zur effizienten Transkription eines ALB/CAT-Hybridgens unter Verwendung der richtigen Startstelle scheinen in den Oocyten 69bp Albuminsequenz zu genügen. In dieser minimalen Sequenz konnte nur die TATA-Box als einziges konserviertes Element definiert werden.

2. Die Xenopus ALB/CAT-Hybridgene werden in den Maus Hepatomazellen BWIJ gewebespezifisch reguliert.

Um die gewebespezifische Regulation der Albumingene des *Xenopus laevis* zu untersuchen, wurde deren Expression sowohl in albuminproduzierenden Zellen mit leberspezifischen Funktionen, als auch in Zellen, die normalerweise kein Albumin exprimieren, verfolgt.

Von der Vermutung ausgehend, daß gewebespezifische Regulationsmechanismen in verschiedenen Spezies während der Evolution konserviert geblieben sind, wurden die *Xenopus* ALB/CAT-Hybridgene transient in die albuminproduzierenden Maus Hepatomazellen BWIJ und in Maus Fibroblasten, NIH3T3 und LTK⁻, eingebracht und auf ihre Expression hin untersucht. Es wurde eine Serie von 5' Deletionsmutanten transient in die Zellen transfiziert und deren Expression über die Aktivität des vom Indikatorgen kodierten CAT-Enzyms bestimmt (ABB18 und TAB1).

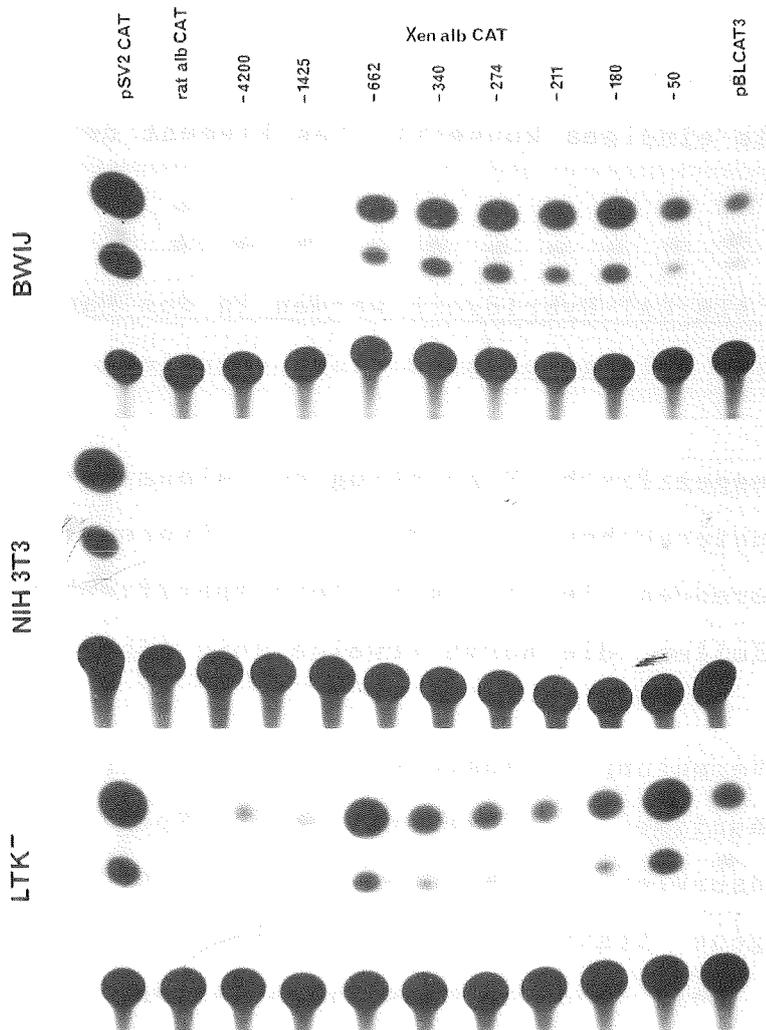


ABB18: Die Xenopus ALB/CAT-Gene werden in Maus Hepatoma-Zellen BWIJ reguliert exprimiert

BWIJ, NIH3T3 und LTK⁻ Zellen wurden mit $3 \cdot 10^6$ (BWIJ) bzw. $2 \cdot 10^6$ Zellen (NIH3T3, LTK⁻) pro 9cm Petrischale angesetzt und einen Tag später mit je $10 \mu\text{g}$ der angegebenen Konstrukte nach der CaPhosphat-Methode transfiziert. 24h später wurden die Proteine extrahiert und die CAT-Aktivität bestimmt.

Dazu wurden die eingesetzten Proteinmengen so gewählt, daß für das positive Kontrollplasmid vergleichbare Umsetzungen erhalten wurden. Die Proteinmengen waren im Einzelnen: $30 \mu\text{g}$ für die BWIJ, $300 \mu\text{g}$ für die NIH3T3 und $50 \mu\text{g}$ für die LTK⁻ Zellen.

Tab. 1: Gewebespezifische Expression der Xenopus Albumin-Gene
in Maus Hepatoma-Zellen

transf. Konstr.	BWIJ		NIH 3T3		Ltk ⁻	
pSV2CAT	27300	57400	1455	--	9440	1227
rat	40	315	9.4	14.2	23.6	71
-4200	--	197	6.3	17.3	255	94
-1425	--	228	8.6	14.9	519	557
-662	3620	5116	12.6	21.2	6513	614
-340	3935	4958	13.4	14.9	1510	203
-274	2282	6082	5.5	18.9	944	151
-211	1259	3502	7.1	13.4	614	142
-180	2833	5068	15.7	23.6	1510	127
-50	212	1519	14.2	17.3	7504	411
pBLCAT3	39	692	64.5	8.7	991	269

Die angegebenen Werte sind CAT-Aktivitäten in $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der ALB/CAT-Hybridgene in den Maus Hepatomazellen BWIJ zeigte, daß die Konstrukte mit langen 5'flankierenden Sequenzen (-4200 und -1425) nicht exprimiert wurden, während von denen mit weniger 5'flankierenden Sequenzen (-662 bis -180) hohe CAT-Enzymaktivitäten erhalten wurden. Das -50 ALB/CAT-Gen, das aufgrund der Oocytenexperimente den minimalen zur konstitutiven Expression ausreichenden Albuminpromotor enthält, wurde jedoch nur schwach exprimiert. Vom Kontrollplasmid pBLCAT3, das keinen eukaryontischen Promotor besitzt, wurde ebenfalls nur wenig CAT-Aktivität erhalten.

In den NIH3T3 Zellen war kein ALB/CAT-Hybridgen aktiv, obwohl das positive Kontrollplasmid pSV2CAT, mit dem SV40 Enhancer und dem SV40 frühen Promotor stark exprimiert wird.

Nach Transfektion der Konstrukte in die LTK⁻ Zellen wurden alle mit Ausnahme der großen ALB/CAT-Gene (-4200 und -1425) exprimiert, jedoch nicht reguliert. Das -50 ALB/CAT-Gen, das nur den minimalen Albuminpromotor besitzt, wurde in diesen Zellen stark exprimiert. Die 5'flankierenden Sequenzen hatten in diesen Zellen keinen aktivierenden Einfluß auf den Promotor, eher einen reprimierenden.

Auffällig hoch war in diesen Zellen auch die CAT-Aktivität, die vom promotorlosen Kontrollplasmid pBLCAT3 erhalten wurde (TAB1).

In keiner der drei untersuchten Zelllinien wurde ein von Dr. M.Weiss und Dr. M.Yaniv erhaltenes Ratten Albumin/CAT-Hybridgen exprimiert. Dieses Ratten-Konstrukt diente als negative Kontrolle. Es ist bekannt, daß dieses Hybridgen nicht in den Maus Hepatomazellen exprimiert wird, obwohl diese Zellen Albumin synthetisieren und obwohl dieses Hybridgen in Ratten Hepatomazellen gewebespezifisch reguliert exprimiert wird (Ott et al., 1984).

Die Xenopus ALB/CAT-Hybridgene werden also in Fibroblasten gar nicht (NIH3T3) oder im Gegensatz zu den Hepatomazellen nicht reguliert (LTK⁻) exprimiert. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß sich in der 5'flankierenden Region der Xenopus Albumingene ein DNA-Element befindet, das für eine hepatomaspezifisch regulierte Expression verantwortlich ist. Durch Deletion des Bereiches zwischen -180 und -50 wird dieses Element zerstört, denn die -50 Deletionsmutante wird 5 bis 10fach schlechter exprimiert als das -180 ALB/CAT-Gen (TAB1).

2.1. Ein Promotor-Element vermittelt die hepatomaspezifische Expression

Um die für die gewebespezifische Regulation verantwortliche Sequenz näher einzugrenzen, wurden ausgehend vom -180 ALB/CAT-Gen weitere 5'Deletionsmutanten hergestellt und deren Expression in den BWIJ Zellen untersucht (ABB19).

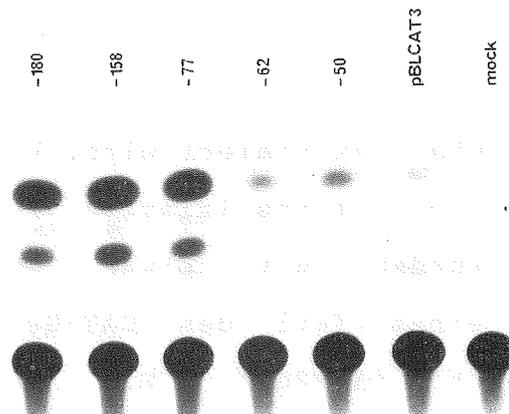


ABB19: Definition der 5'Grenze des Elementes, das hepatomaspezifische Expression vermittelt.

Die Maus Hepatoma Zellen BWIJ wurden mit 10 μ g der oben angegebenen Plasmid-DNA transfiziert. 24h später wurden Proteinextrakte hergestellt und die Menge an CAT-Protein bestimmt. Für die CAT-Bstimmung wurden 100 μ g Protein eingesetzt.

Es zeigte sich, daß sich die für die hepatomaspezifische Expression verantwortliche Sequenz relativ nahe an der Startstelle der Transkription befindet. Nur die Entfernung der Sequenzen zwischen -77 und -62 führte letztlich zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Somit stellt dieses Element einen Teil des Albuminpromotors dar.

Aufgrund der zum Teil beträchtlichen Mengen an CAT-Aktivität, die vom promotorlosen Plasmid pBLCAT3 erhalten wurden, sollte bewiesen werden, daß die gemessenen CAT-Aktivitäten tatsächlich auf eine erhöhte Menge an korrekt initiierten ALB/CAT-Transkripten zurückzuführen sind.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz der verschiedenen Zelllinien wurde das Plasmid pSV2CAT, das in jeder der untersuchten Zelllinien stark exprimiert wird, kotransfiziert. Die in der Gesamt-RNA der transfizierten Zellen enthaltenen ALB/CAT-Transkripte wurden mit einer spezifischen, zum Albuminpromotor und einem Teil des CAT-Gens komplementären SP6-Probe identifiziert (ABB20A). Ein mit dieser Probe geschütztes Fragment von 188nt entspricht korrekt initiierten Albumin-Transkripten, während ein Fragment von 150nt für pSV2CAT-Transkripte indikativ ist.

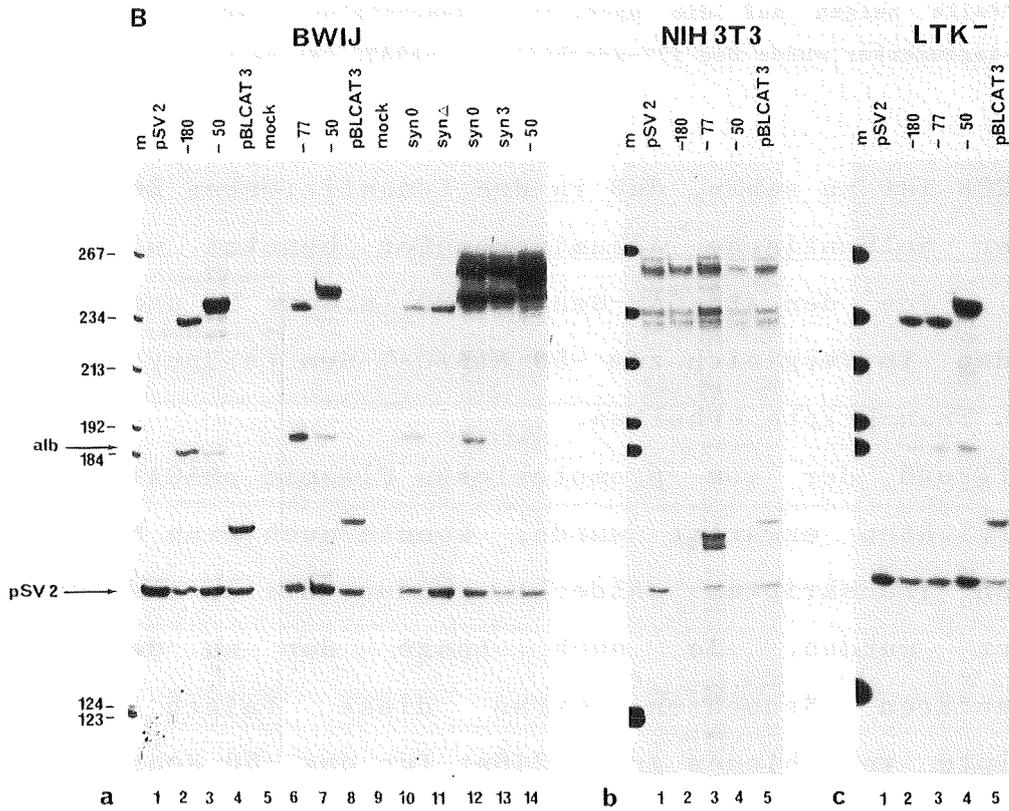
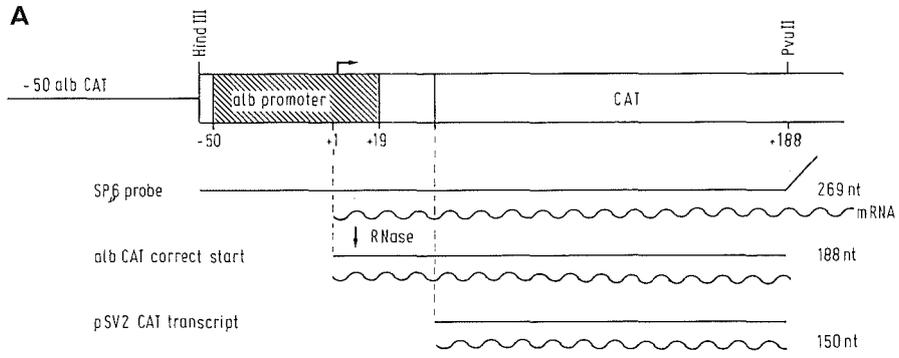


ABB20: In den transient transfizierten Maus Hepatoma Zellen können korrekt initiierte Transkripte nachgewiesen werden.

A: Albuminpromotor-spezifische SP6-Probe

Transkripte von den ALB/CAT-Hybridgenen wurden mit einer einheitlich ^{32}P -markierten 269nt großen anti-sense RNA identifiziert, die in vitro von einem -50 ALB/CAT-SP6-Plasmid synthetisiert wurde. Korrekt initiierte ALB/CAT-Transkripte schützen einen 188nt großen Bereich der Probe, spezifische Transkripte von der pSV2CAT-DNA schützen 150nt von der Probe.

B: Korrekt initiierte ALB/CAT Trankripte in BWIJ Zellen

Die Zellen wurden mit 10 μg der oben angegebenen Plasmid-DNA und mit 5 μg pSV2CAT-DNA transfiziert. 16h nach der Transfektion wurde Gesamt-RNA isoliert. Zur Analyse wurden 20 μg bzw. in b 10 μg DNase-behandelte RNA mit ca. 30fmol RNA-Probe hybridisiert. Die Pfeile zeigen auf die spezifisch geschützten Fragmente. Als Längenmarker wurde Hae III-geschnittene pBR322-DNA verwendet.

In ABB20B ist zu sehen, daß in den transfizierten Hepatomazellen BWIJ der authentische Albuminpromotor benutzt wird (a: Spur 2,3,6,7). Von den ALB/CAT-Genen -180 (a:Spur 2) und -77 (a:Spur 6) wurden im Vergleich zum -50 ALB/CAT-Gen (a:Spur 3,7) 3 bis 5 mal mehr Transkripte erhalten.

Wie aufgrund der vom promotorlosen Plasmid pBLCAT3 erhaltenen CAT-Aktivitäten erwartet wurde, konnte auch eine beträchtliche Menge an Transkripten entdeckt werden, die an anderen Stellen initiiert wurden. Je nach Länge der zu der SP6-Probe komplementären Sequenzen waren diese falsch initiierten Transkripte verschieden groß: 246nt für das -50 Konstrukt, 238nt für die anderen Albumin Konstrukte und 160nt für pBLCAT3.

Das Ergebnis der SP6-Analyse der RNA transfizierter Zellen bestätigt die Daten, die über die Bestimmung der CAT-Enzymaktivität erhalten wurden: in der 5'flankierenden Region des Xenopus Albumingens befindet sich zwischen -77 und -62 ein Element, das eine erhöhte Expression in Hepatomazellen vermittelt. Dieses Element ist in NIH3T3 Zellen (b:Spur 2-4) und in LTK⁻ Zellen (c:Spur 2-4) nicht wirksam.

2.2. Das hepatomaspezifische Promotor-Element (HPl) ist
13bp groß und durch Punktmutationen inaktivierbar

Das entdeckte hepatomaspezifische Promotor-Element, HPl, ist in Maus Zellen aktiv, obwohl es Teil eines Froschgens ist. Dies führt zu der Vermutung, daß das HPl auch in den Albumingenen oder α -Foetoproteingenen der Säuger vorhanden sein könnte. Ein Vergleich der Promotorsequenzen der Albumingene des Huhns (Haché et al., 1983), der Maus (Scott and Tilghman, 1983; Gorski et al., 1986), der Ratte (Heard et al., 1987) und des Menschen (Urano et al., 1986) bzw. der α -Foetoproteingene der Maus (Scott und Tilghman, 1983), der Ratte (Chevrette et al., 1987) und des Menschen (Sakai et al., 1985) zeigt mindestens zwei Homologiebereiche auf (ABB21).

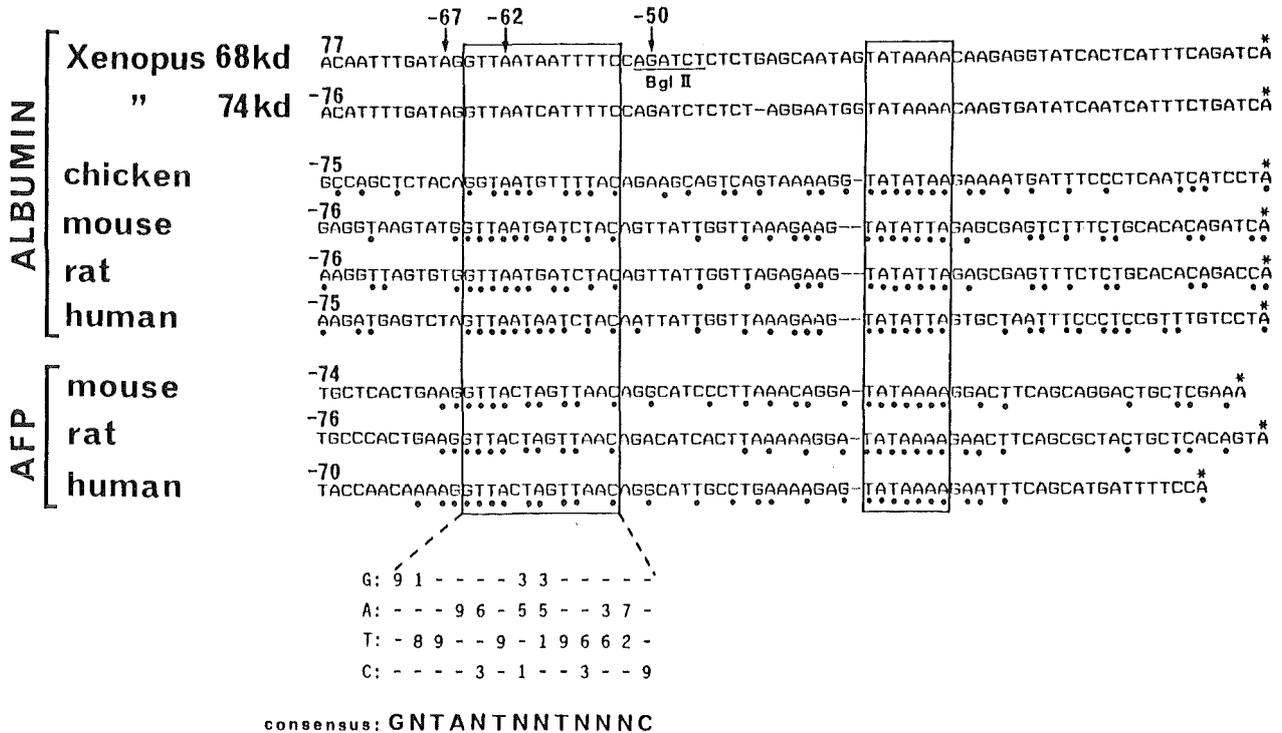


ABB21: Im Promotorbereich der Albumin- und α -Foetoproteingene können zwei homologe Bereiche gefunden werden

Die Sequenzen im Promotorbereich der Albumingene des Huhns (Hache et al., 1983) der Maus (Scott and Tilghman et al., 1983; Gorski et al., 1986), der Ratte (Heard et al., 1987) und des Menschen (Urano et al., 1986) sowie der α -Foetoproteingene der Maus (Scott und Tilghman, 1983), der Ratte (Chevrette et al., 1987) und des Menschen (Sakai et al., 1985) wurden mit der Sequenz der Xenopus Albumingene dieses Bereiches verglichen. Die Sequenzen sind in Bezug auf die TATA-Box und ein zwischen -67 und -62 vorkommende Hexamersequenz einander angeglichen. Die schwarzen Punkte markieren identische Nukleotide. Die TATA-Box und sowie das HPI-Element sind eingerahmt. Aufgrund der großen Homologie im Bereich des HPI wurde eine Konsensus-Sequenz aus Nukleotiden aufgestellt, die in diesem Bereich zu 100% konserviert sind.

Ein Bereich repräsentiert die TATA-Box um Position -30 relativ zur Startstelle der Transkription, während der zweite Bereich zwischen -67 und -50 zu finden ist. Auffallend ist das Vorhandensein des Hexamers AGGTTA, das sowohl in der Xenopus Albuminsequenz als auch in der Sequenz des α -Foetoproteingens der Maus und des Menschen an ähnlicher Position relativ zur TATA-Box zu finden ist. Dieses Hexamer ist noch in der in Hepatomazellen aktiven Deletionsmutante -77 vorhanden, jedoch nicht mehr in der inaktiven -62 Mutante. Dies impliziert, daß dieses Hexamer ein Teil des HPI sein könnte. Aufgrund dieser Annahme, wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, das der Albuminsequenz von -67 bis -50 entspricht (syn0). Das Oligonukleotid wurde mit überhängenden 5'HindIII- und 3'BglII-Enden angefertigt, so daß es in die natürliche BglII-Restriktionsschnittstelle bei Position -50 in das ALB/CAT- Hybridgen kloniert werden konnte. Dieser Klon syn0, der einer natürlichen Deletionsmutante -67 gleichkommt, wurde in den Hepatomazellen BWIJ ebenso gut exprimiert wie die Deletionsmutante -77 (ABB22). Das Hybridgen syn Δ , das nur das Hexamer AGGTTA, inseriert bei Position -50 enthielt, war in den BWIJ Zellen nicht aktiv (ABB22).

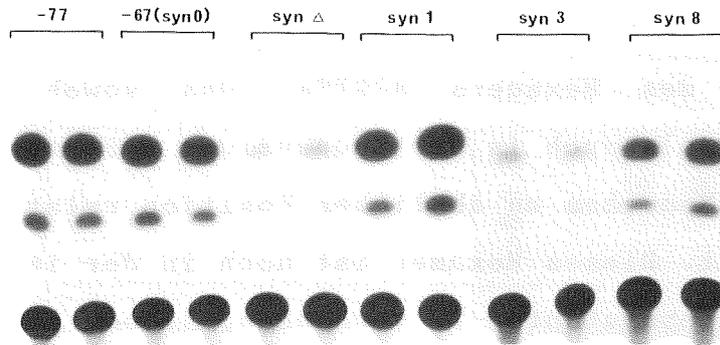


ABB22: Ein synthetisches Oligonukleotid vermittelt hepatomaspezifische Expression

Für den Bereich zwischen -67 und -50 wurden mehrere Oligonukleotide hergestellt, die bei Position -50 vor den Albuminpromotor gesetzt wurden (vergl. ABB23). Für jedes Oligonukleotid wurden jeweils zwei unabhängige Klone nach Transfektion in die BWIJ-Zellen auf ihre Aktivität untersucht. Für die Bestimmung der CAT-Aktivität wurden je 100µg Protein eingesetzt.

Das Hexamer alleine ist also nicht für die hepatoma-spezifische Regulation ausreichend. Allerdings könnte es sein, daß dieses syn Δ -Hybridgen nur aufgrund seines veränderten Abstandes zur TATA-Box inaktiv ist. Um solche Abstandsprobleme zu vermeiden, wurden zur weiteren Charakterisierung des HPI nur noch einzelne Basen im Bereich zwischen -67 und -50 ausgetauscht. In ABB23 sind die Sequenzen der Oligonukleotide aufgelistet, die zur Analyse des HPI-Elementes eingesetzt wurden. Die Aktivität dieser Sequenzen in den BWIJ-Zellen ist ebenfalls angegeben (vergl. auch ABB22). Die beiden ersten Basen der 16bp-Sequenz, das A (syn1) und das G (syn2), können verändert werden, ohne daß die Aktivität

des Elementes beeinträchtigt wird. Die dritte Base jedoch, das G (Position -65), ist essentiell, da durch eine Transversion dieses G in ein A (syn3) die Aktivität des Elementes völlig zerstört (ABB22). Ebenso wichtig ist das C in Position 15 des HP1 (bzw. -52 relativ zur Startstelle der Transkription), seine Veränderung in ein T führt gleichfalls zur Inaktivierung des Elements. Im Gegensatz dazu zeigen zwei andere Punktmutationen, syn8 und syn16, Wildtypaktivität.

Einige der mit den verschiedenen Oligonukleotid-Konstrukten erhaltene Resultate wurden auf RNA-Ebene nachvollzogen. Die SP6-Analyse der RNA transfizierter BWIJ Zellen wurde mit der oben erwähnten Albumin promotor-spezifischen Probe (ABB20A) durchgeführt und ist in ABB20B zu sehen. Vom Konstrukt syn0, das die Wildtypsequenz von -67 bis -50 enthält wurden korrekt initiierte ALB/CAT-Transkripte erhalten (a:Spur 10,12), deutlich mehr als vom -50-Konstrukt alleine (a: Spurl4). Von den mutierten, aufgrund der CAT-Bestimmung inaktiven Konstrukte syn und syn3 wurden nur wenig Transkripte erhalten (a:Spur 11 und 13), ebenso wenige wie vom -50 ALB/CAT-Gen (a:Spurl4), dem die HPI-Sequenz gänzlich fehlt.

Die Analyse der Transkripte bestätigte wiederum die über die CAT-Enzymbestimmung erhaltenen Daten.

Aufgrund der Tatsache, daß das HPI-Element Element des Xenopus Albumingens in Maus Hepatoma Zellen funktionell ist, könnte man vermuten, daß die zum HPI homologen Sequenzen des Albumin- bzw. α -Foetoproteingens der Maus das HPI ersetzen können. Daher wurden synthetische Oligonukleotide sowohl mit der Maus Albumin- als auch mit der α -Foetoproteinsequenz (ABB 23) bei Position -50 vor den Xenopus Albuminpromotor kloniert. Diese Klone waren jedoch nicht aktiv, d.h. die Maus Albumin- und α -Foetoprotein-Sequenzen konnten die Xenopus Sequenz nicht ersetzen. Dazu ist zu bemerken, daß in diesen beiden Elementen je 4 Basen gegenüber dem Xenopus Element ausgetauscht sind. Weiterhin ist ihr Abstand zum Promotor um eine Base verringert. Angesichts dieser multipler Veränderungen ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu machen, warum diese Maus/Xenopus-Hybridkonstrukte nicht aktiv waren.

Aus den Ergebnissen der Mutationsanalyse läßt sich schließen, daß die Basen zwischen -65 und -53 das eigentliche hepatoma-spezifische Promotor-Element HPl darstellen. Durch eine einzige Punktmutation entweder in Position -65 oder in Position -53, kann die Aktivität dieses Elementes vollkommen zerstört werden.

Diskussion

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* besitzt 2 Albumingene, die beide gewebespezifisch in der Leber exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Sequenzanalyse der 5'Enden beider Gene gezeigt werden, daß diese über weite Bereiche untereinander homolog sind. Zu den Albumin- und α -Foetoproteingenen der Säuger und des Huhns wurden jedoch nur wenige Homologien gefunden, die hauptsächlich auf das erste Exon beschränkt waren.

Aufgrund der erhaltenen Sequenzdaten konnten Albumin-Hybridgene konstruiert werden, die in Gentransfer-Experimenten eingesetzt wurden. Damit konnte ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung der Regulation dieser beiden Gene geleistet werden: So ist für die konstitutive Expression der *Xenopus* Albumingene in einem heterologen System der Bereich von -50 bis +19 ausreichend. Am bedeutendsten war allerdings die Identifizierung eines 13 bp großen Promotorelements, HPl, das zwischen -65 und -53 lokalisiert ist und gewebespezifische Expression in Maus Hepatoma-Zellen vermittelt. Damit ist es zum erstenmal gelungen, ein kurzes genau definiertes cis-wirkendes Promotor Element zu beschreiben, das hepatoma-spezifische Expression vermittelt.

Die konservierte 5'Region der *Xenopus* Albumingene

Für beide Gene wurden ca. 1.5 kb 5'flankierende Region, sowie das erste Exon, Intron und zweite Exon sequenziert. Der Sequenzvergleich ergab, daß beide Gene untereinander, vor allem

im Bereich der Exonsequenzen, sehr konserviert sind. Die Homologie erstreckt sich sogar über 400bp weit in den 5'flankierenden Bereich. Um das erste Exon herum wurde somit eine konservierte Region über insgesamt 550bp gefunden. Dieses Resultat stimmt mit den aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen erhaltenen Daten von May et al. (1983) überein, die einen konservierten DNA-Bereich der gleichen Größe (550bp) um das erste Exon aufzeigten. Die Größe des ersten und zweiten Exons, die durch Sequenzierung und RNA-Analyse bestimmt wurde, unterscheidet sich aber von den Angaben von May et al. (1983). Hier ist vor allem richtigzustellen, daß das erste Exon für beide Gene gleich groß ist, 117bp; den beschriebenen 50bp großen Unterschied zwischen 74kd und 68kd Gen gibt es nicht. Der Größenunterschied der primären Translationsprodukte der 68kd und 74kd Albumingene ist nicht im ersten Exon begründet.

Das zweite Exon ist für das 68kd Gen 67 bp groß, während für das 74kd Gen dazu keine Angaben gemacht werden können. Für dieses Gen wurde nur die 5'Grenze des zweiten Exons bestimmt. Es besteht die Möglichkeit, daß dieses Exon anders gespleißt wird als das des 68kd Gens und dies zum beobachteten Größenunterschied der Translationsprodukte führt. Da die mittleren 12 Exons der Albumingene, bedingt durch den Aufbau der Gene aus einem dreifach wiederholten Block von 4 Exons, sehr homolog untereinander sind (May et al., 1983), könnte ansonsten der Größenunterschied noch im letzten Exon kodiert sein.

Insgesamt gesehen ist die große Sequenzhomologie zwischen den beiden *Xenopus* Albumingenen nicht sehr verwunderlich, da sie ja beide durch eine Genomduplikation aus ein und demselben Ur-Albumingen hervorgegangen sind (Bisbee, 1977; Westley et al. 1981).

Die große Homologie beider Gene im 5'flankierenden Bereich impliziert, daß diese Region Elemente enthalten könnte, die für die Regulation beider Gene wichtig sind. In der Promotorregion konnte jedoch nur eine für eukaryontische Promotoren typische konservierte Regulationssequenz identifiziert werden - die TATA-Box. Weitere Konsensus-Sequenzen, die die Expression eukaryontischer Gene beeinflussen könnten (Übersichtsart.: Serfling et al., 1985), wurden aufgrund der Sequenzdaten allein nicht gefunden.

Die genaue Bestimmung der Startstelle der Transkription war zunächst schwierig, da die beiden *Xenopus* Albumin mRNAs sehr homolog sind (Westley et al., 1981) und mit den entsprechenden SP6-Proben Kreuzhybridisierung erhalten werden kann. Basierend auf den DNA-Sequenzdaten für das erste und zweite Exon konnten jedoch Oligonukleotid-Primer hergestellt werden, mit denen spezifisch entweder die 68kd oder die 74 kd mRNA identifiziert wurden. Somit konnte die DNA-Sequenz des ersten Exons durch die Sequenzierung der RNA bestätigt werden. Für die erstellte 68kd mRNA-Sequenz und die vom Genomklon abstammende DNA-Sequenz wurden allerdings einige Unterschiede festgestellt, die wahrscheinlich auf genetische Polymorphismen zurückzuführen sind.

Das Ergebnis, daß die beiden Albumin mRNAs mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Primern unterschieden werden können, ist für die Klärung entwicklungsspezifischer Fragen von großer Bedeutung. Die Expression der Albumingene kann nun in sehr frühen Entwicklungsstadien mit sensitiveren Untersuchungsmethoden verfolgt werden, um abzuklären, ob beide Gene gleichzeitig aktiviert werden.

Verwandtschaft der Xenopus Albumingene zu den Albumin- und α -Foetoprotein-Genen der Säuger und Vögel

Zu den bekannten Albumin- und α -Foetoproteingenen von Säugern und Vögel wurden aufgrund von Sequenzvergleichen nur wenige Homologien im ersten Exon entdeckt.

Der Aufbau des ersten Exons mit 38nt 5'nicht-translatierter Region (sog. "leader"-Sequenz) und 26 Aminosäurecodons ist mit dem der Albumine der Säuger identisch. In der "leader"-Sequenz der Xenopus Albumingene wurde auch das konservierte Pentanukleotid CCCAC gefunden, das typisch ist für die "leader"-Sequenzen der Albumin mRNAs von Nagern (Sargent et al., 1981), Huhn (Haché et al., 1983) und Mensch (Dugaicznyk et al., 1982) und auch in der Maus α -Foetoprotein mRNA vorhanden ist (Dugaicznyk et al., 1982).

Für die gesamte Aminosäuresequenz, die vom ersten Exon kodiert wird, wurde wenig Homologie (zwischen 42 und 46%) entdeckt (ABB15). Diese erstelt sich aus wenigen Einzelbereichen, die vor allem die ersten 3 Aminosäuren und die möglichen Spaltstellen zwischen Prepeptid, Propeptid und reifen Protein umfasst.

Albumine und α -Foetoproteine sind sezernierte Proteine und werden daher mit einem Prepeptid, bestehend aus 18 bis 19 Aminosäuren, synthetisiert (Übersichtsart. Tilghman, 1985). Im Gegensatz zum α -Foetoprotein besitzen die Albumine ein zusätzliches basisches Propeptid aus 6 (bzw. für das Huhn 8) Aminosäuren, das im Golgi-Apparat entfernt wird (Bradshaw und Peters, 1969; Peters, 1977). Pre- und Propeptid werden beide im ersten Exon kodiert. Die Spaltstellen zwischen Prepeptid, Propeptid und reifem Protein

sind zwischen allen Albuminen, auch den Xenopus Albuminen, fast zu 100% konserviert. Die Aminosäuresequenzen um die Spaltstelle zwischen Prepeptid und Propeptid unterliegen, bis auf eine Ausnahme in der Xenopus-Sequenz, ganz genau der (-3,-1)-Regel von Von Heijne (Übersichtsart. 1986), mit der direkt aus der Primärsequenz die wahrscheinlichste Spaltstelle vorhergesagt werden kann. Nach dieser Regel sollte die Aminosäure vor der Spaltstelle, in Position -1, sehr klein sein; dies trifft für die Xenopus-Sequenz und alle anderen Albumin-Sequenzen zu, die an dieser Position ein Serin haben (vgl. ABB15). Weiterhin sollte die Aminosäure in Position -3 geladen, sehr groß oder polar sein, wobei am häufigsten in dieser Position Alanin zu finden ist. Im Gegensatz zu den Albuminen der Säuger und des Huhns, die in dieser Position ein Alanin tragen, befindet sich im Xenopus Albumin Isoleucin an dieser Stelle, das allerdings auch bei einigen anderen Prepeptiden in dieser Position gefunden wurde. Die Forderung, daß sich die Aminosäure Prolin nicht im Bereich zwischen -3 und +1 der Spaltstelle befinden darf, wird in der Xenopus Aminosäuresequenz ebenso wie in den anderen Albuminen eingehalten.

Bis jetzt gibt es keinen Beweis dafür, daß das aus den Sequenzdaten vorhergesagte Propeptid in vivo vorkommt und die vorhergesagten Spaltstellen tatsächlich gebraucht werden. Die Konservierung dieser Spaltstellen in der Xenopus Albuminsequenz, ihre Übereinstimmung mit der (-3,-1)-Regel und die typische Zusammensetzung der Aminosäuresequenz aus hydrophoben Aminosäuren für das Prepeptid und basischen Aminosäuren für das Propeptid sprechen allerdings dafür, daß die Xenopus Albumine ein für Albumine typisches erstes Exon besitzen. Dieses Exon setzt sich wie folgt zusammen: 18 Aminosäuren für das Prepeptid, 6

Aminosäuren für das Propeptid und 2 Aminosäuren für das reife Protein (Haché et al., 1983; Tilghman, 1986). Aus diesem Ergebnis läßt sich zunächst folgender Schluß ziehen: Die Xenopus Albumine sind näher mit den Albuminen der Säuger und Vögel verwandt als mit den α -Foetoproteinen.

Regulation der konstitutiven Expression

Aufgrund der strengen gewebespezifischen Expression der Xenopus Albumingene in der Leber, steht natürlich die Aufklärung dieses Regulationsmechanismus im Vordergrund des Interesses. Mit dem Endziel, cis-wirkende DNA-Elemente zu identifizieren, die die Gewebespezifität vermitteln, wurden zuallererst DNA-Sequenz-elemente definiert, die für die konstitutive Expression notwendig sind. Dies geschah vor allem aus der Überzeugung heraus, daß solche Sequenzen die essentielle Grundlage für die Regulation eines Gens darstellen.

Nach der Sequenzanalyse der 5'flankierenden Region der Albumingene war es möglich ALB/CAT-Hybridgene herzustellen und deren konstitutive Expression in Oocyten zu untersuchen. Tatsächlich wurden in den Oocyten von den ALB/CAT-Hybridgenen korrekt initiierte Transkripte erhalten; zusätzlich wurden aber auch Transkripte von einer aberranten Startstelle, die ca. 12bp 3' von der richtigen, d.h. in vivo benutzten Startstelle lag, initiiert. Die Analyse verschiedener 5'Deletionsmutanten ergab, daß die 5'flankierenden Sequenzen bis zu 50bp vor der Startstelle der Transkription entfernt werden konnten, ohne daß die Transkriptionseffizienz beeinträchtigt wurde. Eine 3'Deletions-mutante -50/-4, bei der die Startstelle der

Transkription entfernt worden war, wurde eindeutig schlechter exprimiert. Die von dieser Mutante noch erhaltenen Transkripte stammten von einer Startstelle, die unüblich weit von der TATA-Box weg liegt und der beobachteten aberranten Startstellen entspricht.

Es zeigte sich, daß 69bp Albuminsequenzen von -50 bis +19 ausreichen, um vollständige Transkriptionsaktivität zu vermitteln. Der Befund, daß die Entfernung der 5'flankierenden Sequenzen von -660 bis -50 nicht zu einem deutlichen Verlust in der Transkriptions-Effizienz führt, ist erstaunlich. Bei vielen Genen wurden gerade in diesem Bereich cis-wirkende Elemente gefunden (CAAT-Box, GC-Box), die die Transkription im Allgemeinen stimulieren (Übersichtsart. Serfling et al., 1985a; Kadonaga et al., 1986). Allerdings wurde für das Maus α -Foetoproteingen ein ähnliches Ergebnis gefunden. Durch in vitro Transkription und transiente Expressionsexperimente konnte gezeigt werden, daß im Maus α -Foetoproteingen neben der TATA-Box keine weiteren 5'flankierende Elemente in diesem heterologen System zur genauen und effizienten Transkription benötigt werden (Scott und Tilghman, 1983).

Bei den Xenopus Albumingenen scheint ebenso wie beim Maus α -Foetoproteingen die TATA-Box ausreichend zu sein, um eine konstitutive Expression zu vermitteln. Dieses Resultat aus den funktionellen Untersuchungen deckt sich mit den Sequenzdaten. In der Sequenz konnte ja außer der TATA-Box kein anderes konserviertes cis-wirkendes DNA-Element gefunden werden.

Das hepatoma-spezifische Promotorelement (HPl)

Durch transiente Transfektion der Xenopus ALB/CAT-Hybridgene in albumin-produzierenden Maus Hepatoma-Zellen BWIJ konnte in der 5'flankierenden Region der Xenopus Albumingene ein DNA-Element identifiziert werden, HPl, das hepatoma-spezifische Expression vermittelt.

Dieses Element ist nicht wirksam in Fibroblasten Zellen: in den NIH3T3 Zellen werden die ALB/CAT-Hybridgene gar nicht exprimiert, während in den LTK⁻ Zellen nur eine konstitutive Expression, auch in Abwesenheit des HPl beobachtet wurde. Diese Aktivität der ALB/CAT-Hybridgene in den LTK⁻ Zellen ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß in dieser Zelllinie die Anwesenheit einer TATA-Box ausreicht, Expression zu vermitteln. Das HPl hat hier keinen stimulierenden sondern eher einen reprimierenden Einfluß auf die Expression. In den Maus Hepatoma-Zellen BWIJ dagegen wird die Transkription in Anwesenheit des HPl um das 5 bis 10 fache stimuliert.

Dieses HPl konnte sehr gut charakterisiert werden: Es umfaßt 13bp und befindet sich zwischen Position -65 und -53 im Albuminpromotor. Durch eine einzige Punktmutation entweder in Position -65 oder -53 kann seine Funktion völlig zerstört werden. Die beiden für die Aktivität der Elemente essentiellen Basen Guanidin in Position -65 und Cytidin in Position -53 begrenzen das funktionell definierte Element, das sehr AT-reich und palindrom-ähnlich strukturiert ist.

HPl-ähnliche Sequenzmotive können auch in den Albumin- und α -Foetoproteingenen der Säuger und Vögel gefunden werden. Diese Motive sind ebenso wie das HPl im Promotorbereich zwischen -75 und -48 relativ zur Startstelle der Transkription lokalisiert und besitzen meist ebenfalls eine mehr oder weniger palindrom-ähnliche Struktur (ABB21). Aufgrund der Homologievergleiche kann die Konsensus-Sequenz GNTANTNNTNNC abgeleitet werden, in der die definierten Basen in den verschiedenen beobachteten Sequenzmotiven zu 100% konserviert sind. In der Sequenz des menschlichen α_1 -Antitrypsingens (Ciliberto et al., 1985), einem ebenfalls leberspezifisch exprimierten Gen, konnte in einem ähnlichen Bereich zwischen -75 und -63 die Sequenz GTTAAATATTAC entdeckt werden, in der 5 Positionen von 6 möglichen mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmen. Der Unterschied befindet sich an einer Position, die aufgrund der Daten aus der Mutationsanalyse im HPl verändert werden darf, ohne daß die Aktivität verloren geht (ABB22,23). Ob diese aufgestellte Konsensus-Sequenz für die leberspezifische Genexpression generell von Bedeutung ist, ist noch nicht geklärt.

Mit den entsprechenden Sequenzbereichen des Albumin- und α -Foetoproteingens der Maus wurden dazu Untersuchungen durchgeführt. Diese Elemente konnten das HPl-Element des Xenopus nicht ersetzen, wenn sie anstelle des HPl bei Position -50 vor den Xenopus Albuminpromotor kloniert wurden. In Anbetracht dessen, daß diese beiden Säuger-Elemente jeweils in 3 von 4 Positionen unterschiedlich zum funktionellen HPl waren, und daß außerdem ihr Abstand zum Promotor um eine Base verringert war, kann man nicht erklären, welche der Veränderungen zur beobachteten Inkaktivierung führt.

Dem HPl der Xenopus Albumine konnte jedenfalls eindeutig eine bedeutende Rolle für die hepatomaspezifische Expression zugesprochen werden.

Wie ist die Regulation der Xenopus Albumingene einzuordnen ?

Für die meisten, bisher genau untersuchten, gewebespezifisch regulierten Gene wurden mehrere Regulationselemente (positive und negative) beschrieben, die alle zusammen, die gewebespezifische Expression eines Gens vermitteln. Meist setzen sich solche komplexe Regulationseinheiten aus distalen Enhancer-Bereichen und proximalen Promotorelementen zusammen (Groschedl und Baltimore, 1985; Edlund et al., 1985).

Die gewebespezifische Expression der Albumin- und α -Foetoproteingene der Säuger wird ebenfalls durch das Zusammenwirken vieler einzelner distal und proximal gelegener Regulationselemente vermittelt.

So besitzt das α -Foetoproteingen der Maus drei Enhancer, die in der 5'flankierenden Region über einen ca. 7kb großen Bereich verteilt sind, und ein gewebespezifisches Promotorelement, das zwischen -85 und -52 lokalisiert ist (Godbout et al., 1986; Widen und Papaconstantinou, 1986). Die Sequenzen dieser Enhancer-Regionen sind nicht veröffentlicht. Insofern können keine Vergleiche mit der Sequenz der Xenopus Albumingene angestellt werden, um zu untersuchen, ob sich in diesen Bereichen ein HPl-ähnliches Sequenzmotiv befindet.

Der Bereich von -85 bis -52 in der Promotor-Region, der Gewebespezifität vermitteln soll, ist sequenziert (Scott und Tilghman, 1983). In diesem Bereich wurde ein zum HPl-Element

ähnliches Sequenzmotiv gefunden (ABB21). Allerdings wurde dieser gewebespezifität-vermittelnde Promotorbereich nicht weiter charakterisiert. Daher muß noch geklärt werden, ob das Sequenz-Element, das der aufgestellten Konsensus-Sequenz entspricht, die gleiche Funktion wie das HPl hat.

Die Enhancer des Maus α -Foetoproteingens sind nur zum Teil für die gewebespezifische Regulation verantwortlich, während das Promotor-Element für die Expression in Hepatomazellen essentiell ist (Godbout et al., 1986). In vivo Studien mit transgenen Mäusen haben gezeigt, daß die drei Enhancer-Domänen nicht genau die gleichen Funktionen haben. Sie üben vielmehr in Abhängigkeit zum Gewebe, in dem das α -Foetoproteingen exprimiert wird, verschiedene Einflüsse auf die Regulation aus (Hammer et al., 1987).

Dieser Enhancer-Bereich ist sehr groß und befindet sich zwischen den gekoppelten Albumin- und α -Foetoproteingenen (Ingram et al., 1981; Urano et al., 1984): Daher wird vermutet, daß in vivo auch die Albuminexpression, möglicherweise während bestimmter Entwicklungsstadien, von dieser Enhancer-Region beeinflusst werden könnte (Godbout et al., 1986). In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß ein 3' zum Albuminpromotor positionierter α -Foetoprotein-Enhancer die Aktivität des Promotors signifikant erhöht (Muglia und Rothman-Denes, 1986. Allerdings müßte dieser Enhancer in vivo über eine Distanz von 20-25kb wirken können. Bisher gibt es nur einen Präzedenzfall für die Wirkung eines Enhancers über eine solche große Distanz (Wang und Calame, 1985).

Die gewebespezifische Regulation der Albumingene scheint ähnlich komplex organisiert zu sein. So gibt es Hinweise, daß das Maus Albumingen sehr weit entfernt in der 5'flankierenden Region einen Enhancer besitzt, der Gewebespezifität vermittelt (Tilghman, pers. Mitteilung). Genau untersucht wurde bislang jedoch nur der proximale Bereich der Albumingene von Ratte und Maus. Zuerst konnte für das Ratten Albumingen gezeigt werden, daß 400bp 5'flankierende Sequenzen ausreichen, gewebespezifische Expression zu vermitteln (Ott et al., 1984). Mittlerweile konnte dieser Bereich weiter eingegrenzt werden: Mit transienten Transfektionsexperimenten von verschiedenen Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß 150bp vor dem Transkriptions-Start zur gewebespezifischen Expression ausreichen (Heard et al., 1987). Ebenso konnte in einem vitro Transkriptionssystem für das Albumingen der Maus ein Bereich von -170 bis -55 relativ zur Startstelle der Transkription definiert werden, der für die gewebespezifische Transkription notwendig ist (Gorski et al., 1986). Da die Albumingene der Ratte und der Maus sehr homolog sind, ist anzunehmen, daß beide die gleichen Regulationselemente besitzen. Bei beiden Genen führt eine stufenweise Verkürzung dieser Sequenzbereiche zu einem graduellen Verlust der Aktivität. Daraus läßt sich schließen, daß mehrere Elemente für die Regulation wichtig sind (Gorski et al., 1986; Heard et al., 1987).

Durch Vergleich der Albuminsequenzen von Ratte, Maus und Mensch konnten in dieser Region vier homologe Bereiche identifiziert werden: zwei distale Elemente (das DE II zwischen -123 und -111 sowie das DE I zwischen -102 und -95), die CCAAT-Box bei -80 und ein proximales Promotorelement, das zwischen CCAAT-Box und TATA-Box lokalisiert ist. Alle diese Elemente scheinen notwendig zu sein, um eine optimale gewebespezifische Expression zu vermitteln (Heard et al., 1987).

Eines dieser Elemente, das proximale Element, zeigt Homologie zum HPl der Xenopus Albumingene. Das proximale Element enthält zwischen Position -64 und -51 eine HPl-ähnliche Sequenz (siehe oben; ABB21). Im Albumingen der Ratte scheint das proximale Element nur einen kleinen Beitrag zur der gewebespezifischen Regulation zu leisten. So wird die 5'Deletionsmutante -93 im Albumingen der Ratte, die nur noch das proximale Element enthält, nur schwach exprimiert, allerdings immer noch gewebespezifisch reguliert (Heard et al., 1987).

Untersuchungen des Maus Albumingens zeigten ebenfalls, daß sich in promotornahen Bereich, zwischen -74 und -55, ein regulatorisches Element befindet. Die Aktivität dieses Elementes beträgt etwa 5% der gesamten gewebespezifischen Transkriptionsaktivität und sinkt auf 1% ab, wenn der Bereich zwischen -75 und -64 deletiert wird (Gorski et al., 1986). Bei Position -64 beginnt aber gerade die zum HPl ähnliche Sequenz (ABB21). Aufgrund der Ergebnisse über das HPl würde man erwarten, daß diese -64 Deletionsmutante noch aktiv ist., da das HPl-ähnliche Sequenzmotiv noch intakt ist.

Aufgrund unterschiedlicher Analysemethoden kann man alle diese Daten über die Regulation des Albumingens der Maus als auch der Ratte nicht richtig mit denen vergleichen, die vom Xenopus

Albumingen erhalten wurden. So wurde das Maus Albumingen in einem *in vitro* Transkriptionssystem mit Proteinextrakten aus der Leber analysiert, während die Regulation des Ratten Albumingens in transfizierten Ratten Hepatoma-Zellen untersucht wurde. Die Xenopus Albumingene wurden ihrerseits in den albuminproduzierenden Maus Hepatoma-Zellen BWIJ analysiert. In diesen Zellen kann das Albumingen von Ratte und Maus nicht exprimiert werden. Diese BWIJ-Zellen exprimieren nur foetale Differenzierungsmarker (Cassio und Weiss, 1979). Man vermutet daher, daß für die Expression der Säuger Albumingene in foetaler Leber regulatorische Sequenzen erforderlich sind, die nicht in den untersuchten Bereichen (-400 bis +1) vorhanden waren (Ott et al., 1984; Heard et al., 1987). Die Xenopus Albumingene wurden ihrerseits sehr schlecht in Ratten Hepatoma-Zellen mit adulten Differenzierungsmarkern exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß die Xenopus Albumingene in Bezug auf ihre Regulation wohl eher mit dem α -Foetoproteingen der Säuger, das in der foetalen Leber exprimiert wird, verwandt sind. Diese Annahme wird durch folgende Daten unterstützt: Für die Xenopus Albumingene und das Maus α -Foetoproteingen konnte gezeigt werden, daß ein Minimalpromotor in einem heterologen System noch konstitutive Expression vermitteln kann. Im Maus α -Foetoprotein konnte außerdem ein proximales Regulationselement zwischen Position -85 und -52 definiert werden, das Gewebespezifität vermittelt (Godbout et al., 1986). In diesem Bereich konnte ebenfalls eine zum HPl ähnliche Sequenz beobachtet werden (ABB21).

Ein endgültiger Beweis dafür, daß die Xenopus Albumingene ähnlich reguliert werden wie die α -Foetoproteingene kann erst dann erbracht werden, wenn man zeigt, daß das HPl-ähnliche Element im Maus α -Foetoproteingen in Verbindung mit seinem Promotor

ausreicht, um gewebespezifische Expression in den BWIJ-Zellen zu vermitteln.

Im Unterschied zu den Daten, die über die gewebespezifische Regulation der Albumin- und α -Foetoproteingene beschrieben wurden, konnte für die Xenopus Albumingene im 5' flankierenden Bereich nur ein cis-wirkendes Element, das 13bp große HPl identifiziert werden, das hepatoma-spezifische Expression vermittelt.

Aufgrund der Analyse der Xenopus Albumingene in einem heterologen System wurden sicherlich nicht alle Regulationselemente der Gene entdeckt. Möglicherweise befinden sich im 5'flankierenden Bereich zwischen -4200 und -662 negativ regulatorische Elemente, ähnlich wie im α -Foetoproteingen der Ratte (Muglia und Rothman-Denes, 1986), denn die beiden großen ALB/CAT-Hybridgene -4200 und -1425 wurden in keiner der untersuchten Zelllinien exprimiert. Dieser Befund spricht auf alle Fälle gegen das Vorhandensein von gewebespezifischen Enhancer-Elementen im 5'flankierenden Bereich bis zu -4200. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich weiter entfernt in der 5'flankierenden Region gewebespezifische Enhancer befinden, was bereits für die Albumin- und α -Foetoproteingene beobachtet wurde (siehe oben).

Mit der Analyse der Xenopus Albumingene in den heterologen Maus-Hepatomazellen ist es also gelungen ein Element, das HPl, zu definieren, das Teil eines Regulationsmechanismus ist, der in der Evolution konserviert geblieben ist. Möglicherweise hat dieses Element eine entscheidende Rolle in der gewebespezifischen Regulation der Albumin- und α -Foetoproteingene. .sw.

Solche zwischen Säugern und Xenopus konservierte Regulationselemente wurden schon mehrfach beschrieben: das Hitzeschock-Regulationselement HSE des Hitzeschockgens hsp 70 (Bienz, 1984), das Oestrogen-Induktion vermittelnde Element ERE des Vitellogenins A2 (Klein-Hitpaß et al., 1986) und des Serum-Induktion vermittelnde Element des zytoskeletalen Actingens (Mohun et al., 1987). Mit der Identifikation des HPl-Elementes konnte somit ein weiteres Regulationselement definiert werden, das nach Transfektion in Säugerzellen noch funktionell ist. Bemerkenswert ist dabei, daß ein Element charakterisiert wurde, das hepatoma-spezifische Regulation vermittelt.

Welcher Faktor erkennt das HPl ?

Durch Zellfusions-Experimente konnte gezeigt werden, daß trans-wirkende Faktoren in die gewebespezifischen Regulation von Genen involviert sind.

Aufgrund der beobachteten selektiven und reziproken Auslöschung von differenzierten Funktionen nach der Fusionierung von Zellen verschiedener Differenzierungszustände wurden zunächst nur Hinweise für die Existenz von negativen Regulationsfaktoren (sog. extinguisher) gefunden (Übersichtsart. Weiss et al., 1972; Davidson, 1974). Es wurde angenommen, daß diese Faktoren die Expression einer sozusagen fremden Differenzierungsfunktion verhindern.

Über die Existenz von positiven Regulationsfaktoren, die für die Aktivierung einer differenzierungsspezifischen Funktion sorgen, konnten zunächst nur indirekte Hinweise gesammelt werden - durch die Identifizierung von gewebespezifischen cis-wirkenden DNA-Elementen. Inzwischen konnte für das Insulingen gezeigt werden, daß trans-wirkende Faktoren an die gewebespezifische Enhancer-Region des Gens binden (Ohlsson und Edlund, 1986).

Die Isolierung des cis-wirkenden Elements HPl in der 5'flankierenden Region der Xenopus Albumingene, das Gewebespezifität vermittelt, ermöglicht nun die Suche nach trans-wirkenden Faktoren, die mit dieser Sequenz interagieren.

Durch in vitro Bindungsstudien ("mobility shift"-Experimente) ist es bereits gelungen, einen Faktor nachzuweisen, der an das isolierte HPl-Element bindet (G. Ryffel, pers. Mitteilung). Dieser Faktor ist hepatomaspezifisch, er wurde nur in den Kernextrakten von den Maus Hepatoma-Zellen BWIJ und den menschlichen

Hepaotma-Zellen Hep G2 gefunden.

Aufgrund der Eigenschaft dieses Faktors, das HPl zu binden, wird es möglich sein, dieses Protein in größeren Mengen zu reinigen. Nach erfolgter Anreicherung wird man Teile des Proteins sequenzieren und auch Antikörper dagegen herstellen können. Schließlich wird man mit Hilfe dieser Antikörper oder spezifischer Oligonukleotide die für den Faktor spezifische cDNA isolieren können und damit seine Regulation studieren können.

Mit der Identifizierung des HPl-Elementes ist es also gelungen, Zugang zu übergeordneten Genen zu bekommen. Damit ist der erste Schritt getan, um genauen Einblick in die Regulation von Genen zu erhalten, die für den Mechanismus der gewebespezifischen Expression verantwortlich sind.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Auffray, C. und Rougeon, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 303-314.
- Banerji, J., Olson, L. und Schaffner, W. (1983) *Cell* 33, 729-740.
- Benoist, C. und Chambon, P. (1981) *Nature* 290, 304-310.
- Bienz, M. (1984) *Embo J.* 3, 2477-2483.
- Birnboim, C. und Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bisbee, C.A., Baker, M.A., Wilson, A.C., Hadji-Azami, I. und Fishberg, M. (1977) *Science* 195, 785-787.
- Blau, H.M., Chiu, C.-P. und Webster, C. (1983) *Cell* 32, 1171-1180.
- Boulet, A., Erwin, C. und Rutter, W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3599-3603.
- Bradshaw, R.A. und Peters, T., Jr. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5582-5589.
- Briggs, M., Kadonaga, J., Bell, S. und Tjian, R. (1986) *Science* 234, 47-52.
- Brown, J.R. (1976) *Fed. Proc.* 35, 2141-2144.
- Cattini, P.A., Peritz, L.N., Anderson, T.R., Baxter, J.D. und Eberhardt, N.L. (1986) *DNA* 5, 503-509.
- Cassio, D. und Weiss, M.C. (1979) *Somatic Cell Genetics* 5, 719-738.
- Chandler, V. Maler, B. und Yamamoto, K. (1983) *Cell* 33, 489-499.
- Chen, E.J. und Seeburg, P.H. (1985) *DNA* 4, 165-170.
- Chepelinsky, A.B., King, C.R., Zelenka, P.S. und Piatigorski, J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2334-2338.
- Chevrette, M., Guertin, M., Turcotte, B. und Belanger, L. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 1338-1339.
- Chung, D.W., MacGillivray, R.T.A. und Davie, E.W. (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 343, 210-217.
- Ciliberto, G., Dente, L. und Cortese, R. (1985) *Cell* 41, 531-540.

- Cohen, R., Sheffrey, M. und Kim, C. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 821-832.
- Cohen, S., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110.
- Coon, H.G. und Weiss, M.C. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 852-855.
- Crew, M.D. und Spindler, S.R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5018-5022
- Darnell, J.E. (1982) *Nature* 297, 365-371.
- Davidson, B., Egli, J.-M., Milvihill, E. und Chambon, P. (1983) *Nature* 301, 680-686.
- Davidson, R.L. (1974) *Annu. Rev. Genet.* 8, 195-218.
- Dente, L., Cesareni, G. und Cortese, R. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 1645-1655.
- Deschatrette, J., Fougere-Deschatrette, C., Corcos, L. und Schimke, R.T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 765-769.
- D'Onofrio, C., Colantuoni, V. und Cortese, R. (1985) *EMBO J.* 4, 1981-1990.
- Dugaiczyk, A., Law, S.W. und Dennison, O.E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 71-75.
- Dynan, W. und Tjian, R. (1983) *Cell* 32, 669-680.
- Dynan, W. und Tjian, R. (1983) *Cell* 35, 79-87.
- Dynan, W. und Tjian, R. (1985) *Nature* 316, 774-778.
- Edlund, T., Walker, M.D., Barr, P.J. und Rutter, W.J. (1985) *Science* 230, 912-916.
- Efstratiatis, A., Posakony, J., Maniatis, T., Lawn, R., O'Connell, C., Spritz, R., De Riel, J., Forget, B., Weissman, S., Slightom, J., Blechl, A., Smithies, O., Barelle, F., Schoulders, C. und Proudfoot, N. (1980) *Cell* 21, 653-668.
- Etkin, L.D. und Di Berardino, M.A. (1983) in: *Eukaryotic Genes: their Structure, Activity and Regulation* (eds. N. Maclean, P.S. Gregory und R.A. Flavell), 127-156. Butterworth.

- Ephrussi, B. (1972) *Hybridization of Somatic Cells*, published by Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Everett, R.D., Baty, D. und Chambon, P. (1983) *Nucl. Acids Res.* 8, 2447-2464.
- Gannon, F., O'Hare, K., Perrin, F., Le Penne, J.P., Benoist, C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, B. und Chambon, P. (1979) *Nature* 278, 428-433.
- Garabedian, M.J., Shepherd, B.M. und Wensink, P.C. (1986) *Cell* 45, 859-867.
- Gerber-Huber, S., May, F.B.E., Westley, B.R., Felber, B.K., Hosbach, H.A., Andres, A.-C. und Ryffel, G.U. (1983) *Cell* 33, 43-51.
- Gillies, S., Morrison, S., Oi, V. und Tonegawa, S. (1983) *Cell* 33, 717-728.
- Godbout, R., Ingram, R. und Tilghman, S. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 477-487.
- Gomer, R., Suma, D. und Firtel, R. (1985) *Focus (BRL)* 7, 6-7.
- Gorman, C., Moffat, L. und Howard, B. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051.
- Gorman, C., Merlino, G., Willingham, M., Pastan, I. und Howard, B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6777-6781.
- Gorski, K., Carneiro, M. und Schibler, U. (1986) *Cell* 47, 767-776.
- Graham, F. und van der Eb, A. (1973) *Virology* 52, 456-457.
- Grosschedl, R. und Baltimore, D. (1985) *Cell* 41, 885-897.
- Hache, R.J.G., Wiskocil, R., Vasa, M., Roy, R.N., Lau, P.C.K. und Deeley, R.G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4556-4564.
- Hammer, R.E., Krumlauf, R., Camper, S., Brinster, R.L. und Tilghman, S.M. (1987) *Science* 235, 53-58.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Handa, H., Kaufmann, R.J., Manley, J., Gefter, M. und Sharp, P.A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 478-482.

- Hayashi, S., Kondoh, H., Yasuda, K., Gen-Ichiro, S., Ikawa, Y. und Okada, T.S. (1985) EMBO J. 4, 2201-2207.
- Heard, J.M., Ott, M.-O., Herbomel, P., Mottura-Rollier, A., Yaniv, M. und Weiss, M.C. (1987) Mol. Cell. Biol., im Druck.
- Hynes, N., Van Ooyen, A., Kennedy, N., Herrlich, P., Ponta, H. und Groner, B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3637-3641.
- Ingram, R.S., Scott, R.W. und Tilghman, S.M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4694-4698.
- Jagodzynski, L.L., Sargent, T.D., Yang, M., Glackin, C. und Bonner, J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3521-3525.
- Jones, K., Yamamoto, K. und Tjian, R. (1985) Cell 42, 559-572.
- Jones, K., Kadonaga, J., Rosenfeld, P., Kelly, T. und Tjian, R. (1987) Cell 48, 79-89.
- Kahn, C.R., Bertolotti, R., Ninio, M. und Weiss, M.C. (1981) Nature 290, 717-720.
- Kazmaier, M. Brüning, E. und Ryffel, G.U. (1985) EMBO J. 4, 1261-1266.
- Killary, A.M. und Fournier, R.E.K. (1984) Cell 38, 523-534.
- Kioussis, D., Eiferman, F., Van de Rijn, P., Gorin, M.B., Ingram, R.S. und Tilghman, S.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1960-1967.
- Klein-Hitpaß, L., Schorpp, M., Wagner, U. und Ryffel, G. (1986) Cell 46, 1053-1061.
- Kressmann, A. und Birnstiel, M.L. (1980) in: Transfer of Cell Constituents into Eukaryotic Cells (eds. I.E. Cellis, A. Graessmann und A. Loyter). Nato advanced study institutes series, 383-407. Plenum Press.
- Kozak, M. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 857-872.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. und Tjian, R. (1987) Nature 325, 368-372.
- Ledford, B.E. und Frieden, G. (1973) Dev. Biol. 30, 187-197.

- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. und Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E. und Sambrook, J. (1982) "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Lab., New York.
- Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A. und Gefter, M.L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3855-3859.
- Manley, J.L. (1983) Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 30, 195-244.
- Mason, J.O., Williams, G.T. und Neuberger, M.S. (1985) Cell 41, 479-487.
- May, F.E.B., Weber, R. und Westley, B.R. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 2791-2807.
- May, F.E.B., Ryffel, G.U., Weber, R. und Westley, B.R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13919-13923.
- May, F.E.B., Westley, B.R., Wyler, T. und Weber, R. (1983) J. Mol. Biol. 168, 229-247.
- Maxam, A. und Gilbert, W. (1980) Meth. Enzymol. 65, 499-560.
- McKnight, S. und Kingsbury, R. (1982) Science 217, 316-324.
- McKnight, S., Kingsbury, R., Spence, A. und Smith, M. (1984) Cell 37, 253-262.
- McMaster, G. und Carmichael, G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838.
- Melloul, D., Aloni, B., Calvo, J., Yaffe, D., und Nudel, U. (1984) Embo J. 3, 993-990.
- Melton, D., Krieg, P., Rebagliati, M., Maniatis, T., Zink, K, und Green, M. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 7035-7056.
- Messing, J. (1983) Method. Enzymol. 101, 20-79.
- Mercola, M., Wang, X.-F., Olsen, J. und Calame, K. (1983) Science 221, 663.
- Mével-Ninio, M. und Weiss, M.C. (1981) J. Cell. Biol. 10, 339-350.
- Mohun, T., Garrett, N. und Treisman, R. (1987) EMBO J. 3, 667-673.

- Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T.G. und Tamaoki, T. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4604-4608.
- Muglia, L. und Rothman-Denes, L.B. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7653-7657.
- Myers, R., Rio, D., Robbins, A. und Tjian, R. (1981) Cell 25, 373-384.
- Nelson, C., Crenshaw, E.B. III, Franco, R., Lira, S.A., Albert, V.R., Evans, R.M. und Rosenfeld, M.G. (1986) Nature 322, 577-562
- Ohlsson, H. und Edlund, T. (1986) Cell 45, 35-44.
- Okazaki, K., Yasuda, K., Kondoh, H. und Okada, T.S. (1985) EMBO J. 2589-2595.
- Ornitz, D.M., Palmiter, R.D., Hammer, R.E., Brinster, R.L., Swift, G.H. und McDonald, R.J. (1985) Nature 313, 600-602.
- Ott, M.O., Sperling, L.S., Herbomel, P., Yaniv, M. und Weiss, M.C. (1984) EMBO J. 3, 2505-2510.
- Parker, C. und Topol, J. (1984) Cell 36, 357-369.
- Peters, T. Jr. (1977) Clin. Chem. 23, 5-12.
- Petit, C., Levillier, J. Ott, M.O. und Weiss, M.C. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2561-2565.
- Picard, D. und Schaffner, W. (1985) EMBO J. 4, 2831-2838.
- Piette, J., Kryszke, M.H. und Yaniv, M. (1985) EMBO J. 4, 2675-2685.
- Poncz, M., Sdowiejczyk, D., Ballantine, M., Schwartz, E. und Surrey, S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4298-4302.
- Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N. und Groner, B. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7428-7432.
- Prywes, R. und Roeder, R.G. (1986) Cell 47, 777-784
- Ptashne, M. (1986) Nature 322, 697-701.
- Rio, D., Robbins, A., Myers, R. und Tjian, R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5706-5710.
- Rosenoer, U.M., Oratz, M. und Rothchild, M.A. (1977) Pergamon Press New York.

- Sakai, M., Morinaga, T., Urano, Y., Watanabe, K., Wegmann, T.G. und Tamaoki, T. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 5055-5060.
- Sanger, F., Micklen, S. und Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sargent, T.D., Jagodzinski, L.L., Yang, M. und Bonner, J. (1981) *Mol. Cell. Biol.* 1, 871-883.
- Sassone-Corsi, P., Wildeman, A. und Chambon, P. (1985) *Nature* 313, 458-463.
- Sassone-Corsi, P. und Borrelli, E. (1986) *TIG* 2, 215-219.
- Schöler, H. und Gruss, P. (1984) *Cell* 36, 403-411.
- Scott, R.W. und Tilghman, S.M. (1983) *Molec. Cell. Biol.* 3, 1295-1309.
- Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985a) *Trends Genet.* 1, 224-230.
- Serfling, E., Lübke, A., Dorsch-Häsler, K. und Schaffner, W. (1985b) *EMBO J.* 4, 3851-3859.
- Shani, M. (1986) *Molec. Cell. Biol.* 6, 2624-2631.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D. und Sharp, P.A. (1986) *Nature (London)* 319, 154-158.
- Smith, A. (1980) *Methods in Enzymol.* 65, 560.
- Studier, F.W. (1972) *Science* 176, 367-376.
- Southern, P. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Szpirer, C. und Szpirer, J. (1975) *Differentiation* 4, 85-91.
- Theisen, M., Stief, A. und Sippel, A.E. (1986) *EMBO J.* 5, 719-724.
- Tilghman, S.M. (1985) in: *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes* (ed. N. MacLean) Vol. 3, 160-206. University Press, Oxford.
- Treisman, R., Green, M. und Maniatis, T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7428-7432.
- Treisman, R. (1986) *Cell* 46, 567-574.
- Urano, Y., Watanabe, K., Sakai, M. und Tamaoki, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3244-3251.

- Vieira, J. und Messing, J. (1982) *Gene* 19, 259-268.
- Von Heijne, G. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4683-4690.
- Wahli, W., David, I.B., Wyler, T., Weber, R. und Ryffel, G.U. (1980) *Cell* 20, 107-117.
- Walker, M., Edlund, T., Boulet, A. und Rutter, W. (1983) *Nature* 306, 557-561.
- Wang, X.-F. und Calame, K. (1985) *Cell* 43, 659-665.
- Weiss, M.C., Bertolotti, R. und Peterson, J.A. (1972) in: *Molecular Genetics and Developmental Biology*, (ed. M. Sussmann), 426-453. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Weiss, M.C. (1982) in: *Somatic Cell Genetics* (eds. T.C. Caskey und D.C. Robbins), 169-179. Plenum Press, NJ.
- Westley, B.R., Wyler, T., Ryffel, G.U. und Weber, R. (1981) *Nucleic Acid Res.* 9, 3557-3574.
- Westley, B. und Weber, R. (1982) *Differentiation* 22, 227-230.
- Widen, S.G. und Papaconstantinou, J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8196-8200.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urland, G. und Chasin, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1373-1376.
- Wolffe, A.P., Glover, J.F., Martin, S.C., Tenniswood, P.R., Williams, J.L. und Tata, J.R. (1985) *Eur. J. Biochem.* 146, 489-496.