

KIK 4442  
August 1988

# **Die Schlüsselrolle des nukleären fos Onkogens im molekularen Signaltransfer**

A. Schönthal  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie  
von Spaltstoffen

KfK 4442

**Die Schlüsselrolle des nukleären fos Onkogens  
im molekularen Signaltransfer**

Axel Schönthal

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

Onkogene sind Bestandteile der Erbinformation, die unter bestimmten Umständen die tumorigene Transformation der Zelle bewirken können. Man nimmt an, daß ihre normalen Genprodukte funktionelle Teile von Signaltransferketten sind, die wachstums- oder differenzierungsspezifische extrazelluläre Signale bis hinein in den Zellkern transduzieren und dort in eine veränderte Genexpression konvertieren. Das nukleäre Protein des fos Onkogens ist ein präsumptives Glied eines solchen Signaltransfers: Es wird durch eine Reihe biochemisch verschiedener extrazellulärer Agenzien induziert und vermag andere Gene zu transaktivieren. Die inadäquate Expression seines Proteins kann die Transformation von Zellen bewirken.

Durch die gezielte Überexpression transfizierter Onkogene konnte ich zeigen, daß das fos Protein eine Schlüsselrolle im molekularen Signaltransfer spielt: i) Die fos Expression wird durch die Onkogenprodukte von ras, src, mos, trk und myc induziert. ii) Fos selbst sowie ras, src, mos, trk und myc aktivieren den Kollagenase Promoter. iii) Für diese Aktivierung ist jene Nonanukleotid-Sequenz im Kollagenase Promoter notwendig und ausreichend, über die auch die Induktion der Kollagenase durch den Tumorpromotor TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) vermittelt wird. Durch die Verwendung eines Expressionsvektors, der zur fos mRNA komplementäre "anti-sense" RNA transkribierte und damit die fos Synthese spezifisch blockierte, konnte ich nachweisen, daß iv) für die Aktivierung des Kollagenase Promoters durch ras, src und mos sowie durch TPA die Anwesenheit von fos Protein notwendig ist. Die Expression von fos ist sehr stringent reguliert: v) Das fos Protein reprimiert seinen eigenen Promoter; die fos mRNA zeigt eine Halblebenszeit von 9 Minuten.

Die konditionale Expression eines chimären Konstrukts aus fos kodierenden Sequenzen und hormonabhängigem MMTV (Maus Mamma Tumor Virus) Promoter bewirkt die tumorigene Transformation muriner Fibroblasten. Nach Abschalten der fos Expression revertieren diese Zellen wieder zum Normaltyp. Die Deletion des 3'-untranslatierten Endes des fos Gens verursacht eine mehr als 10fache Verlängerung der Halblebenszeit der fos mRNA und resultiert in erhöhter fos Protein Synthese.

## A KEY ROLE OF THE NUCLEAR ONCOPROTEIN FOS IN SIGNAL TRANSDUCTION

### SUMMARY

Oncogenes are parts of the genome which, under certain circumstances, can cause the tumorigenic transformation of cells. It is assumed that their normal gene products are components of signal transducing pathways which transfer growth or differentiation specific signals from the outside of the cell to the nucleus, there converting them into changes in gene expression. The nuclear protein of the fos oncogene is a presumptive member of such pathways: its expression is induced by biochemically different external signals; the fos protein is capable of activating other genes. The inadequate expression of fos can cause the transformation of cells.

By means of targeted over-expression of transfected oncogenes I could show, that the fos protein plays a key role in the molecular signal transfer: i) fos expression is induced by the oncogene products ras, src, mos, trk and myc; ii) fos itself as well as ras, src, mos, trk and myc activate the human collagenase promoter; iii) necessary and sufficient for this activation is a 9 base pair sequence of the collagenase promoter which formerly was shown to mediate the activation of the collagenase gene by phorbol ester tumor promoters. By introducing into cells an expression vector which produces anti sense fos RNA, thereby specifically blocking fos synthesis, I could demonstrate that iv) the presence of fos protein is required for induction of the collagenase promoter by ras, src and mos as well as TPA. Expression of the fos gene is regulated very stringently: v) fos protein represses its own promoter; fos mRNA has a half-life of 9 minutes.

Using a chimeric construct of the the fos coding region and the hormone-inducible MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) promoter I could show that conditional expression of fos can cause the tumorigenic transformation of murine fibroblasts. This effect is reverted after shut off of fos expression. Deletion of the 3'-untranslated sequences extended the half-life of fos mRNA to more than 2 hours resulting in elevated fos protein synthesis.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	
SUMMARY	
ABKÜRZUNGEN	
EINLEITUNG	1
MATERIALIEN	10
1. Chemikalien und Arbeitsmittel	10
2. Zellen	11
3. Kulturmedien	12
METHODEN	13
I. Allgemeine Arbeitsmethoden	13
1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	13
2. Extraktion von Nukleinsäuren	13
3. Fällung von Nukleinsäuren	13
II. DNA Klonierungstechniken	13
1. Fragmentierung mit Restriktionsendonukleasen	13
2. Auffüllen von 5'-Überhängen ("Fill in")	14
3. Entfernung endständiger Phosphatgruppen	14
4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA - Fragmenten	14
5. Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarose - Gelen	15
6. Ligation von DNA - Fragmenten	15
7. Transformation von Bakterien	15
8. Präparation kleiner Mengen Plasmid - DNA ("Mini Prep")	15
9. Präparation großer Mengen Plasmid - DNA ("Large Scale Prep")	16
10. Einfrieren und Auftauen von Bakterien	16
III. Zellkultur	17
1. Trypsinbehandlung von Zellen	17
2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	17
3. Stabile Transfektion	17
4. Kultur in Weichagar(ose)	18
5. Transiente Transfektion	18
6. Protein Präparation	19
7. DNA Präparation	19
8. RNA Präparation	20

<b>IV. Analytische Methoden</b>	<b>20</b>
1. DNA - Transfer auf Nitrozellulose ("Southern Blot")	20
2. RNA - Transfer auf Nitrozellulose ("Northern Blot")	21
3. Radioaktive Markierung von DNA - Fragmenten ("Nick Translation")	21
4. Radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA - Fragmenten	22
5. Hybridisierung von DNA - Sonden an filtergebundene DNA	22
6. Hybridisierung von DNA - Sonden an filtergebundene RNA	22
7. S 1 - Kartierung von RNA	23
8. Bestimmung der CAT - Aktivität ("CAT - Assay")	23
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>I. Konditionale fos Expression führt zu transienter Transformation</b>	<b>25</b>
1. Ein chimäres MMTV- c-fos Gen induziert einen transformierten Phänotyp nach Hormongabe	27
2. Hormonentzug führt zur Reversion des fos - transformierten Phänotyps	41
3. Überexpression des fos Proteins ist für die Transformation verantwortlich	41
<b>II. Schlüsselrolle des fos Proteins im molekularen Signaltransfer</b>	<b>45</b>
1. Der fos Promoter wird durch verschiedene (Proto-)Onkogene aktiviert	49
2. fos und andere (Proto-)Onkogene aktivieren den Kollagenase Promoter über das TRE	51
3. fos Expression ist notwendig für die Induktion der Kollagenase durch (Proto-)Onkogene und TPA	61
4. Der fos Promoter wird durch fos Protein reprimiert	65
<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>



## ABKÜRZUNGEN

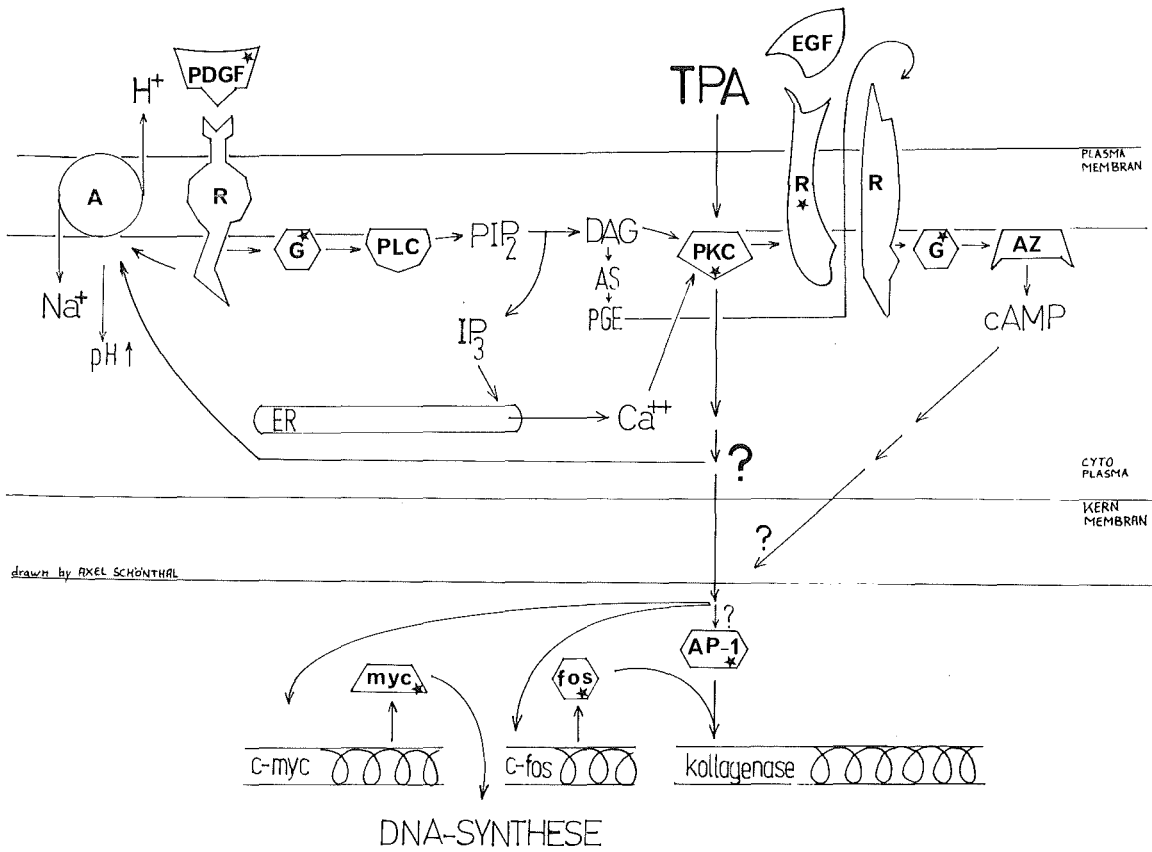
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotidphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
FBJ MSV	Finkel Biskis Jinkins - Murine Sarcoma Virus
FBR MSV	Finkel Biskis Reilly - Murine Sarcoma Virus
FCS	Fötale Kälberserum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
K-MES	K-Morpholin-Ethansulfonsäure
LTR	Long Terminal Repeat
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NC	Nitrozellulose
PEG	Polyethylenglykoll
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidinkinase
TPA	12-0-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRE	TPA-reguliertes Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
wt	Wildtyp

## EINLEITUNG

Ein wegweisender Befund für das Verständnis der Krebsentstehung war die Entdeckung, daß bestimmte Gene zur Tumorbildung beitragen können. Solche "Onkogene" wurden zunächst entdeckt als das krebsauslösende Element bestimmter DNA- und akut transformierender RNA-Tumor Viren (Tooze 1981; Weiss et al., 1984), letztere das kanzerogenste Agens überhaupt (Bister und Jansen, 1986; Bishop, 1987). Es zeigte sich, daß in normalen eukaryontischen Zellen Gene vorhanden sind, die große Ähnlichkeit zu den viralen Onkogenen der Retroviren besitzen: die Proto-Onkogene (Weinberg, 1984; Knudson, 1986). Deren latentes tumorigenes Potential kann durch Punktmutation, chromosomale Translokation, Amplifikation oder Insertion eines viralen Verstärkerelementes (Enhancer) freigesetzt werden: eine nicht mehr adäquat geregelte Genexpression oder eine veränderte Struktur dieses Genprodukts trägt zur tumorigenen Entartung der Zelle bei - das Proto-Onkogen konvertiert zum Onkogen (Hunter, 1984; Varmus, 1984; Weinberg 1984, 1985; Bishop 1985a, 1985b, 1987; Klein und Klein, 1985; Nusse 1986).

Wie kann ein einzelnes Gen einen solchen Beitrag zur Krebsentstehung leisten? Tumorzellen unterscheiden sich von normalen in einer Reihe phänotypischer Eigenschaften, meist in verstärkter Proliferation oder verminderter Fähigkeit zur Differenzierung (Klein und Klein, 1984, 1986; Barbacid, 1986; Harris, 1987; Marks et al., 1987; Nishimura und Sekiya, 1987). Ein unterschiedlicher Phänotyp basiert auf einem veränderten genetischen Programm. Es gibt Hinweise dafür, daß Proto-Onkogene Bestandteile von Signaltransferketten sind, die extrazellulär ankommende mitogene oder differenzierungsspezifische Stimuli (z.B. von Wachstumsfaktoren oder Hormonen) bis hinein in den Zellkern vermitteln und dort in die entsprechende Antwort (veränderte Genexpression) umsetzen (Heldin und Westermark; 1984; Hunter, 1985; Kris et al., 1985; Berridge, 1986; Bradshaw und Prentis, 1987).

Der normale biochemische Ablauf eines solchen Signaltransfers ist beispielhaft für den Wachstumsfaktor aus Blutplättchen (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) in Abb. 1 vereinfacht dargestellt (vgl. Heldin und Westermark, 1984; Majerus et al., 1985; Rozengurt, 1986; Berridge, 1986):



drawn by AXEL SCHÖNTHAL

**Abb. 1:** Beteiligung von Proto-Onkoproteinen an der Wachstumsfaktor-induzierten Zellantwort. Hier gezeigt am Beispiel der Induktion des Kollagenase Gens durch extrazelluläres PDGF. (Erläuterung siehe Text.)  
 Proteine mit Ähnlichkeit oder Identität zu Proto-Onkoproteinen sind mit "★" gekennzeichnet. Abk.: A: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher; AS: Arachidonsäure; AP-1: aktivierendes Protein 1; AZ: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; DAG: Diacylglycerol; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: G-Protein; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; PDGF: Wachstumsfaktor aus Blutplättchen; PGE: Prostaglandin E; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; R: Rezeptor; TPA: 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat.

PDGF bindet an seinen transmembranen Rezeptor, eine tyrosinspezifische Protein Kinase. Der Ligand-Rezeptor-Komplex stimuliert nun, möglicherweise über seine Kinase-Aktivität, eine komplexe Folge von Ereignissen in der Membran, im Zytosol und im Zellkern.

Eine der ersten feststellbaren Antworten auf PDGF-Bindung ist die Zunahme des Ionenflusses über die Zellmembran, was zu einer Alkalisierung des Zytosols führt. Weiterhin wird, möglicherweise über ein G-Protein, die Phospholipase C (PKC) aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in die beiden "second messenger" Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet.  $\text{IP}_3$  mobilisiert die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER).  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC), ein in der aktiven Form membrangebundenes Enzym. PKC phosphoryliert eine Reihe von Substraten, darunter auch den Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), und setzt damit wohl eine Proteinkinase-Kaskade in Gang. Parallel dazu initiiert die Zelle eine zweite Proteinkinase-Kaskade: zumindest zum Teil aus DAG wird Arachidonsäure freigesetzt und in Prostaglandin E (PGE) umgewandelt. PGE stimuliert über seinen Rezeptor und ein G-Protein die Adenylat-Zyklase (AZ), was zur Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und anschließender Aktivierung von Proteinkinasen führt. Beide Proteinkinase-Kaskaden pflanzen das Signal über größtenteils unbekanntes Zwischenstufen bis in den Kern hinein fort. Dort wird über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, s.u.) das Signal in die entsprechende Genexpression umgesetzt (s.u.).

Hinweise auf die Beteiligung von (Proto-)Onkogenen an solchen Signaltransferketten ergaben sich zunächst durch den Befund, daß die Expression der Proto-Onkogene c-fos und c-myc durch Serumstimulation gehungerter Zellen oder Gabe spezifischer Wachstumsfaktoren wie PDGF induziert werden kann (Kelly et al., 1983; Cochran et al., 1984; Greenberg und Ziff, 1984; Kruijer et al., 1984). Insbesondere c-fos reagiert je nach Zelltyp auf eine Vielzahl weiterer externer Stimuli (s.u.). Da die Genprodukte von c-fos, c-myc und c-myb (ebenfalls ein serumstimulierbares Proto-Onkogen) im Kern lokalisiert sind und DNA-bindende Eigenschaften besitzen (Klempnauer et al., 1984; Eisenman et al., 1985; Watt et al., 1985; Sambucetti und Curran, 1986; Eisenman und Thompson, 1986; Klempnauer und Sippel, 1986), nimmt man an, daß sie nukleäre Effektoren der Mitogenese

darstellen (Armelin et al., 1984; Bravo et al., 1985; Moore et al., 1986; Goustin et al., 1986; Rozengurt, 1986; Studzinski et al. 1986). Dies wurde erhärtet durch den Befund, daß c-fos und c-myc andere Gene transaktivieren können (Setoyama et al., 1986; Kaddurah-Daouk et al., 1987). Für das fos Protein wurde nachgewiesen, daß es Teil eines Proteinkomplexes ist, der an die gleiche DNA-Sequenz bindet wie der Transkriptionsfaktor Aktivierendes Protein 1 (AP-1) (Rauscher III et al., 1988). Interessanterweise ist AP-1 selbst ein Proto-Onkogen, das zelluläre Gegenstück des viralen jun Onkogens (Bohmann et al., 1987; Bos et al., 1988; Angel et al., 1988). Das nukleäre erbA Onkoprotein ist ein Mitglied der Steroidhormon-Rezeptor Familie (Weinberger et al., 1985; Sap et al., 1986).

Der Zusammenhang von Signaltransfer und (Proto-)Onkogenfunktion bleibt nicht auf den Zellkern beschränkt: Das extrazelluläre PDGF wird durch ein Proto-Onkogen, das c-sis Gen, kodiert (Doolittle et al., 1983; Waterfield et al., 1983; Chiu et al. 1984). Bestimmte transmembrane Rezeptoren für Wachstumsfaktoren zeigen große Ähnlichkeit zu (Proto-)Onkogenprodukten, der EGF-Rezeptor zu erbB (Downward et al., 1984), der Rezeptor für den Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) zu fms (Sherr et al., 1985; Sherr und Rettenmier, 1986). Diese Verwandtschaft ist sowohl strukturell durch die Ähnlichkeit in der Primärstruktur als auch funktionell durch den Besitz einer tyrosin-spezifischen Proteinkinase-Aktivität evident. Diese Aktivität charakterisiert eine ganze Reihe von (Proto-)Onkoproteinen, unter ihnen auch das membrangebundene src oder das zytoplasmatische trk (Courtneidge et al., 1980; Hunter und Cooper; 1985; Mitra et al. 1987; Sefton, 1987). Das ebenfalls im Zytoplasma lokalisierte mos (Proto-)Onkogen und die PKC, für die erst kürzlich onkogene Aktivität nachgewiesen wurde (Persons et al., 1988), sind Vertreter der serin- und threoninspezifischen Proteinkinasen (Papkoff et al., 1983; Nishizuka, 1984, 1986; Sefton, 1987; Edelman et al., 1987). Man nimmt an, daß Kinasierungen ganz wesentliche Schritte im Signaltransfer darstellen und daher diese Aktivität einer strengen Kontrolle unterliegen muß.

Es ist plausibel anzunehmen, daß vielleicht alle an mitogenen oder differenzierungsspezifischen Signaltransferketten beteiligte Proteine Proto-Onkogenprodukte sind. Eine Transformation der Zelle würde dann dadurch bewirkt werden, daß ein qualitativ oder quantitativ verändertes Onkoprotein die ihm

folgenden Glieder der Kette aktiviert, ohne daß der entsprechende extrazelluläre Impuls vorliegt. Dieser "molekulare Kurzschluß" würde das Wachstum oder die Differenzierung der Zelle der adäquaten Kontrolle entziehen, und sie würde entarten.

Es gibt zahlreiche Beispiele für ein solches Zusammenspiel der (Proto-)Onkoproteine: Unter anderem wurde gezeigt, daß die Aktivierung der PKC durch Tumorpromotoren wie den Phorbolster TPA zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und zur Induktion des c-fos Proto-Onkogens führt (Angel et al., 1987a; Barber und Verma, 1987; Radzioch et al., 1987). Letzteres wird ebenfalls bewirkt durch Mikroinjektion des ras Genprodukts (Stacey et al., 1987), ein membrangebundenes Onkoprotein mit GTPase-Aktivität (Manne et al., 1985; Buss und Sefton, 1986). In ras transformierten Zellen ist die Menge an DAG erhöht, was in der Aktivierung der PKC resultiert (Fleischman et al., 1986; Wolfman und Macara, 1987).

Weiterhin führt die Mikroinjektion von anti-ras Antikörpern zur Reversion des transformierten Phänotyps in Zellen, die mit src, fms oder fes Onkogenen transformiert sind (Smith et al., 1986). Dies deutet darauf hin, daß die betreffenden Onkogene für die Weitervermittlung ihrer Aktivität das ras Proto-Onkoprotein benötigen. Der Transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induziert die Expression des sis Proto-Onkogens (PDGF), dieses nachfolgend über einen autokrinen Mechanismus die Proto-Onkogene c-fos und c-myc (Leof et al., 1986).

Diese Beispiele zeigen, daß (Proto-)Onkoproteine miteinander interagieren können und an einem Signaltransfer partizipieren. Es ist jedoch noch größtenteils ungeklärt, wieviele unterschiedliche Signalketten es gibt oder wieviele und welche intermediären Komponenten beteiligt sind.

Anhand des fos Gens versuchte ich, Einblick in den Zusammenhang von Signaltransfer und onkogener Transformation zu bekommen.

Dieses Gen wurde zunächst entdeckt als das transformierende Element des Murinen Sarkom Virus FBJ (FBJ-MSV), ein replikationsdefektes Retrovirus, das in Mäusen Knochentumore verursacht (Finkel et al., 1966; Finkel et al., 1973; Curran et al., 1982; Curran und Teich, 1982). Eine zweite virale Variante des fos Gens (v-fos) wurde ebenfalls aus einem murinen Knochentumor isoliert, das FBR-MSV (Curran und Verma, 1984). Diese beiden transformierenden v-fos Gene zeigen

charakteristische und bedeutsame Unterschiede zu ihrem zellulären, nicht-transformierenden Gegenstück, dem c-fos Gen: Neben Änderungen der Primärstruktur zeigen die beiden v-fos Gene eine Deletion des karboxyterminalen Bereichs und stehen unter der Kontrolle eines starken viralen Promoters, des "Long Terminal Repeat" (LTR) des entsprechenden MSV (Van Beveren et al., 1983; Curran et al., 1983; Curran et al., 1984). Es konnte gezeigt werden, daß das c-fos Gen ebenfalls transformierende Eigenschaften erhält, wenn es ohne sein 3'-Ende unter die Kontrolle eines starken Promoters gestellt wird (Miller et al., 1984; Iba et al., 1988). Eine Deletion von nur 67 Basenpaaren im 3'-untranslatierten Bereich ist hierfür ausreichend (Meijlink et al., 1985). Eine Veränderung der Primärstruktur seines Proteins war also nicht nötig.

Wie bewirkt ein unverändertes fos Protein eine tumorigene Transformation von Zellen? Zur Beantwortung dieser Frage muß wohl die Funktion dieses Proteins aufgeklärt werden. Es gibt Hinweise darauf, daß dieses Gen eine wichtige Rolle sowohl in Wachstums- als auch in Differenzierungsprozessen spielt. Seine Expression wird sehr schnell induziert. Innerhalb weniger Minuten nach Applikation von zum Teil sehr unterschiedlichen extrazellulären Signalen wie z.B. Wachstumsfaktoren (Curran und Morgan, 1985; Greenberg et al., 1985; Angel et al., 1985; Conscience et al., 1986), Peptidhormonen wie Thyreotropin (Coletta et al., 1986; Tramontano et al., 1986) oder Insulin (Stumpo und Blackshear, 1986), cAMP (Kruijer et al., 1985; Bravo et al., 1987), Kalzium-Ionophore (Pompidou et al., 1987; Curran und Morgan, 1988), Neurotransmitter (Greenberg et al., 1986b; Hunt et al., 1987; Morgan et al., 1987), Phorbolster (Greenberg und Ziff, 1984; Herrlich et al., 1988) oder UV-Licht (Herrlich et al., 1988) ist fos mRNA nachzuweisen. Die Induktion ist transient, nach 2 Stunden ist die fos mRNA Menge wieder unter die Nachweisgrenze zurückgekehrt (Greenberg und Ziff, 1984; Curran und Morgan, 1985). Diese stringente Kontrolle gilt auch für das fos Protein: seine Kinetik entspricht, etwas zeitversetzt, der der fos mRNA (Miller et al., 1985), d.h. sowohl mRNA als auch Protein haben eine sehr kurze Halblebenszeit und einen entsprechend schnellen Umsatz (Miller et al., 1985; Rechsteiner et al., 1987). Für das fos Protein wurde gezeigt, daß es die Expression von Genen regulieren kann: es transaktiviert den Kollagen alpha-1(III) Promoter (Setoyama et al., 1986) und ist Teil eines Proteinkomplexes, der an das Adipozyten Gen P2 (aP2) bindet (Distel et al., 1987).

Eine direkte Beteiligung von fos an Zellteilungsvorgängen implizieren Experimente, in denen die fos Expression durch "anti-sense" fos RNA (zu Teilen der fos mRNA komplementäre RNA) gehemmt wurde: diese Zellen verloren die Fähigkeit zur Proliferation (Holt et al., 1986; Nishikura und Murray, 1987; Holt und Nienhuis, 1988).

Ein erster Hinweis auf differenzierungsspezifische Qualitäten des fos Proteins war der Befund, daß es im Fetus und in extraembryonalen Geweben stark gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert wird (Müller et al., 1985b; Mason et al., 1985; Adamson, 1987; Dony und Gruss, 1987). Weiterhin korreliert die fos Expression mit der Differenzierung bestimmter hämatopoetischer Vorläuferzellen (Müller et al., 1984b; Müller et al., 1985a; Adamson, 1987). Das Einbringen eines fos Gens in Teratokarzinomzellen induziert deren Differenzierung (Müller und Wagner, 1984; Rüther et al., 1985; Müller, 1986). Transgene Mäuse mit einem fos Gen unter der Kontrolle des menschlichen Metallothionein Promoters zeigen Störungen der Knochenmorphogenese (Rüther et al., 1987).

Fos scheint also eine vielseitige Rolle im Zellgeschehen zu übernehmen, neueste Befunde implizieren sogar eine Beteiligung dieses Genprodukts an der neuronalen Gedächtnisbildung (Hunt et al., 1987; Marx, 1987).

Im ersten Teil meiner Arbeit beschäftigte ich mich mit den phänotypischen Konsequenzen der fos Expression und untersuchte insbesondere, ob eine Reversion des fos-transformierten Phänotyps nach Abschalten der fos Expression möglich ist. Zu diesem Zweck fusionierte ich verschiedene fos Mutanten mit einem hormoninduzierbaren Promoter, sodaß die fos Expression durch Hormongabe oder -entzug reguliert werden konnte. Ich konnte zeigen, daß die Induktion eines fos Gens mit deletiertem 3'-untranslatierten Ende die Transformation bewirkt, daß jedoch nach Abschalten des Gens die Zelle wieder zum Normalzustand revertiert. Die Anwesenheit des fos Proteins ist also für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps notwendig.

Da man annimmt, daß das 3'-Ende eine Rolle beim Abbau der fos mRNA spielt (Treisman, 1985; Verma, 1987), untersuchte ich die Halblebenszeiten von fos mRNAs mit unterschiedlichen 3'-Enden. Ich fand, daß die Deletion des 3'-untranslatierten Bereichs die Halblebenszeiten der entsprechenden mRNA mehr als 10fach verlängert. Dies resultiert in einer erhöhten fos Protein Menge.



Eine Spezifizierung der Beteiligung von fos Protein an Signaltransferketten war Gegenstand des zweiten Teils meiner Arbeit. Da fos durch viele unterschiedliche Stimuli induziert werden kann, untersuchte ich, ob bestimmte Onkogene, für die eine Beteiligung am Signaltransfer postuliert wurde, dies ebenfalls bewirken können. Ich brachte verschiedene (Proto-)Onkogene in Zellen ein und untersuchte den Einfluß ihrer Expression auf den fos Promoter. Tatsächlich wird das fos Gen durch eine ganze Reihe von (Proto-)Onkoproteinen induziert. Dies ist ein direkter Hinweis auf das Zusammenspiel verschiedener (Proto-)Onkoproteine im Signaltransfer.

Wie geht der Signaltransfer nach der Aktivierung des fos Gens weiter? Ein Präzedenzfall für die Transaktivierung anderer Gene durch das fos Protein war bereits bekannt (Setoyama et al., 1986). Ein weiterer Kandidat war das Kollagenase Gen, da es auf die gleichen Induktoren wie fos, allerdings mit einer stark verzögerten Kinetik, anspricht (Angel et al., 1987b; Herrlich et al., 1988). Ich brachte verschiedene Mutanten des Kollagenase Promoters, die alle mit einem Indikatorgen fusioniert worden waren, zusammen mit einem fos exprimierenden Vektor in Zellen ein. Es zeigte sich, daß der Kollagenase Promoter durch fos induziert wird und daß diese Transaktivierung durch die selbe cis-wirkende Nonanukleotidsequenz vermittelt wird wie die Induktion der Kollagenase durch TPA. Weiterhin können jene Onkoproteine, die das fos Gen induzieren, ebenfalls über die selbe Sequenz den Kollagenase Promoter induzieren. Dies sind starke Evidenzen dafür, daß die verschiedenen (Proto-)Onkogene über die Aktivierung von fos die Expression des Kollagenase Gens beeinflussen.

Ist fos eine absolut notwendige Komponente dieses Signaltransfers hin zum Kollagenase Promoter? Durch Einbringen von "anti-sense" fos Sequenzen in die Zellen wurde die fos Expression spezifisch blockiert. Es zeigte sich, daß dann die (Proto-)Onkoprotein- und TPA-induzierte Kollagenase Induktion sehr stark vermindert war. Fos ist also ein notwendiger Bestandteil von (einer?) Signalkette(n), die über die Proteinkinase C (dem Rezeptor für TPA, Pasti et al., 1986; Blumberg, 1988) und verschiedenen Proto-Onkoproteinen schließlich im Kern das Kollagenase Gen induzieren.

Die Expression des fos Gens ist sehr stringent reguliert (s.o.). Es bestand die Vermutung, daß möglicherweise fos selbst an der Regulation seines eigenen Promoters beteiligt sein könnte (Mitchell et al., 1985; Sassone-Corsi und Verma, 1987; Verma, 1987). Ich untersuchte dies, indem ich erstens die fos Protein Synthese in der Zelle durch geeignete Vektoren erhöhte oder zweitens die basale Restmenge an endogenem fos Protein durch Einbringen von "anti-sense" fos Konstrukten weiter reduzierte und dann die Aktivität des fos Promoters analysierte. Wird die fos Protein Menge erhöht, sinkt die Aktivität des fos Promoters ab, wird hingegen die endogene fos Protein Menge reduziert, wirkt sich dies stimulierend auf den fos Promoter aus. Dies zeigt, daß fos autoregulatorische Eigenschaften besitzt: Das fos Protein hemmt die Expression seines eigenen Promoters.

Im Gesamtzusammenhang mit bisher veröffentlichten Daten ergibt sich aus meiner Arbeit folgendes Bild über die Rolle des fos Proteins: Das fos Protein ist ein Mediator, der am Ende eines durch biochemisch verschiedene Agonisten initiierten Signaltransfers sitzt und durch Transaktivierung anderer Gene die entsprechende pleiotrope Zellantwort vermittelt. Für diese Schlüsselrolle ist eine subtile Regulation seiner Proteinmenge notwendig. Hierzu trägt wesentlich die Instabilität der mRNA und die negative Rückkopplung des Proteins auf den Promoter bei. Werden diese Regulationsmechanismen gestört, kann fos durch ein Überangebot seines Proteins den transformierten Phänotyp einer Zelle induzieren - sie ist damit der adäquaten Kontrolle entzogen und entartet.

## MATERIALIEN

### 1. Chemikalien und Arbeitsmittel

Acetyl-CoEnzym A	Pharmacia, Freiburg
Acridinorange	Sigma, Deisenhofen
Actinomycin D	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dithiotreitol	BRL Inc., Neu-Isenburg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Desoxynukleotid-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll	Serva, Heidelberg
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
G418	Gibco, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Kanamycinsulfat	Sigma, München
Kieselgel DC Platten	Macherey und Nagel, Düren
K-MES	Fluka, Neu-Ulm
Lachs-Spermien DNA, Typ III	Sigma, München
Lambda DNA	Boehringer, Mannheim
Linker DNA	Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Nick Translation Kit	Amersham Buchler, Braunschweig
Nitrozellulose Filter	Schleicher und Schüll, Dassel
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio-Rad, München
Oligo-dT Zellulose	Collaborative Research, Frankfurt
PEG	Sigma, Deisenhofen
PIPES	Sigma, Deisenhofen
PVP	Sigma, Deisenhofen
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G50	Bio-Rad, München
TEMED	Bio-Rad, München
TPA	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Whatmann 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe

Restriktionsenzyme sowie DNA- und RNA-modifizierende Enzyme wurden von Boehringer, Mannheim; BRL Inc., Neu-Isenburg; Genofit, Heidelberg und Biolabs, Schwalbach, bezogen.

Alle Chemikalien zur Transformation von Bakterien wurden von Fluka, Neu-Ulm, die Trockenmedien für die Kultur von Bakterien von Difco Lab., Detroit, die Trockenmedien für die Kultur eukaryontischer Zellen von Gibco, Karlsruhe, bezogen.

Alle Plastik-Zellkulturartikel wurden von Nunc (über Gibco, Europe, Karlsruhe) bezogen.

Die radioaktiv markierten Substanzen wurden von Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen.

## 2. Zellen

NIH 3T3	murine Fibroblasten, entsprechen den 3T3 Zellen der American Type Culture Collection; erhalten von P. Gruss, Heidelberg.
F 9	murine embryonale Teratokarzinomzellen; erhalten von E. Wagner, Heidelberg.
GM 637	mit Simian Virus (SV40) transformierte humane Hautfibroblasten; erhalten von J.E. Cleaver, San Franzisko.
HeLa tk <sup>-</sup>	humane Zervix-Karzinomzellen mit Defizienz im Thymidin-Kinase Gen; erhalten von Y. Chi-Cheng, Durham.
NFB München	primäre humane Hautfibroblasten; erhalten von K. Sperling, Berlin.
E.coli K12 RRI	(F <sup>-</sup> , hsd S20, ara-14, pro A2, lac Y1, gal K2, mtl-1, sup E44, M 15, λ <sup>-</sup> );  erhalten von U. Rüter, Heidelberg.

### 3. Kulturmedien

#### a.) Kulturmedium für NIH 3T3, F9, GM637 und NFB München

Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)  
10 % Fötale Kälberserum (FCS)  
Penicillin (100 E/ml)  
Streptomycin (100 ug/ml)

#### b.) Kulturmedium für HeLa tk<sup>-</sup>

Earle's Minimal Essential Medium  
10 % FCS  
Penicillin (100 E/ml)  
Streptomycin (100 ug/ml)

#### c.) Kulturmedium für Bakterien: L-Broth

1 % Bactotrypton  
0,5 % Hefeextrakt  
0,5 % NaCl

#### d.) Kulturmedien für Bakterien-Transformation

- SOB - Medium  
2 % Bactotrypton  
0,5 % Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>
- SOC - Medium  
SOB + 20 mM Glukose

#### e.) Antibiotika zur Bakterien-Selektion

- Ampicillin (50 mg/ml)
- Kanamycin (50 mg/ml)

## METHODEN

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Arbeitsprotokolle den Methodensammlungen von Maniatis et al. (1982) und Davis et al. (1986) entnommen.

### I. Allgemeine Arbeitsmethoden

#### 1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer wäßrigen Lösung wurde durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}=1$  entspricht 50 ug/ml doppelsträngiger DNA oder 40 ug/ml RNA oder 20 ug/ml von Oligonukleotiden. Ein Maß für die Verunreinigung der Lösung ist die  $OD_{280}$ , sie sollte höchstens 70 % der  $OD_{260}$  betragen.

#### 2. Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Zu einem Volumen nukleinsäurehaltiger Lösung wurde das gleiche Volumen Phenol (gesättigt mit 10 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA) und das gleiche Volumen eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, kräftig gemischt und zur Phasentrennung eine Minute zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde noch zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

#### 3. Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit Natrium-Acetat (NaAc, pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,2 M gebracht und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol gemischt. Nach 30minütiger Inkubation in  $-80^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht in  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde das Präzipitat für 20 Min. bei 8700xg abzentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde die Nukleinsäure in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

### II. DNA Klonierungstechniken

#### 1. Fragmentierung mit Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit einer Restriktionsendonuklease ist definiert als die Menge Enzym, die 1 ug Lambda Phagen DNA in einer Stunde vollständig fragmentiert. In der Regel wurde ein 2,5facher Überschuß an Enzym verwendet und die vom Hersteller für jede Restriktionsendonuklease individuell empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen eingehalten.

## 2. Auffüllen von 5'-überhängenden Enden ("fill in")

Pro 100 pmol 5'-Enden wurde 1 Einheit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 7 mM Tris, pH 7,5; 7 mM MgSO<sub>4</sub>; 50 mM NaCl; 1 mM DTT und 2mM dNTPs für 30 Min. bei 22<sup>o</sup> C. Anschließend wurde die DNA durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt.

## 3. Entfernung endständiger Phosphatgruppen

### a) von 5'-Überhängen

Pro 100 pmol DNA-Enden wurde 1 Einheit alkalische Phosphatase aus Kälberdarm eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 50 mM Tris, pH 9; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> und 1 mM Spermidin für 30 Min. in 37<sup>o</sup> C. Danach wurde erneut Enzym zugegeben und weitere 30 Min. in 37<sup>o</sup> C inkubiert.

### b) von 3'-Überhängen und stumpfen Enden ("blunt ends")

Diese Dephosphorylierung erfolgte unter sonst gleichbleibenden Bedingungen 15 Min. bei 37<sup>o</sup> C, gefolgt von 15 Min. bei 56<sup>o</sup> C. Nach erneuter Enzymzugabe wurde dies nochmals wiederholt.

Anschließend wurde das Enzym durch 10minütiges Erhitzen auf 68<sup>o</sup> C inaktiviert, durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion entfernt und die DNA mit Ethanol gefällt.

## 4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

### a) Agarose Gel (für DNA Fragmente >0,5 kb)

Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Konzentration von 0,8 - 2 % gewählt. Die Agarose (Typ II) wurde in 50 ml Laufpuffer TAE (40 mM Tris; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA; pH 7,7) durch Erhitzen gelöst, 0,3 ug/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und in eine Kammer (7,5 x 13,5 cm) gegossen. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen zum Auftrag der Proben ausgespart. Nach Erkalten wurde das Gel mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer (10 % Glycerol; 10 mM EDTA; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) in die Taschen unterschichtet und bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Über einem UV-Lichtkasten (320 nm) waren die Fragmente sichtbar und wurden fotografiert.

### b) Acrylamid Gel (für S1 - Kartierung, vgl. IV,7)

Die bei der S1 - Kartierung entstehenden DNA Fragmente von i.d.R. <0,3 kb wurden auf einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Eine Gellösung, bestehend aus 6 % Acrylamid (19 Teile Acrylamid, 1 Teil N,N'-Methylen-bisacrylamid), 8 M Harnstoff in TBE (90 mM Tris, pH 8,3; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA) wurde nach Zugabe von 0,05 % TEMED und 0,1 % APS zwischen zwei durch Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen. Die Glasplatten waren zuvor mit Ethanol abgerieben und mit 2 ml 5 % Dimethyl-dichlorsilan in CCl<sub>4</sub> silikonisiert worden. Nach einem Vorlauf des Gels von 30 Min. bei 1000 Volt wurden die Proben aufgetragen und bei 1000 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Laufpuffer war TBE. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde eine Glasplatte entfernt und das Gel in 10 % Essigsäure/10 % Methanol für 10 Min. fixiert, auf ein Whatmann 3MM Filterpapier transferiert, getrocknet und mit einem Kodak X-AR Film unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80<sup>o</sup> C autoradiographiert.

## 5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente wurde das Agarose-Gel direkt vor der zu isolierenden DNA-Bande mit einem Skalpell eingeschnitten und ein Streifen DEAE-Zellulose eingesetzt. Danach wurde die Elektrophorese fortgesetzt und die DNA von dem Papier gebunden. Das Papier wurde anschließend in 1,5 M NaCl zerstampft und die DNA durch Inkubation für 15 Min. bei 65° C eluiert. Durch Zentrifugation über eine Quarzsand-Säule (am Boden durchstochenes Eppendorfgefäß mit 2-3 mm Quarzsand) wurde die DNA von den Papierresten abgetrennt und mit Ethanol gefällt.

## 6. Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 20 µl Reaktionsvolumen (50 mM Tris, pH7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP; 100 µg/ml BSA) mit 0,1 Einheiten T4 DNA Ligase pro pmol Enden bei 15° C über Nacht.

Zur Ligation von Linkern (Verbindungs-molekülen) an DNA Enden wurde 1 µg Plasmid-Fragment mit 200 ng Linker DNA in 70 mM Tris, pH 7,5; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM ATP und einer Einheit T4 DNA Ligase bei 15° C über Nacht inkubiert.

## 7. Transformation von Bakterien

Bakterien des Stammes E. coli K12 RRI (Bolivar et al., 1977) wurden mit Plasmiden entsprechend der Methode von Hanahan (1983) transformiert.

10 ml SOB - Medium wurde mit einer Einzelkolonie RRI angeimpft und über Nacht in 37° C unter starkem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0,1 ml entnommen und mit 50 ml frischem SOB verdünnt. Diese Kultur wurde bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,45 - 0,55 wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien in Portionen zu je 10 ml bei 4° C mit 670xg für 10 Min. abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 3,3 ml TFB (10 mM K-MES, pH 6,2; 100 mM RbCl; 45 mM MnCl<sub>2</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 3 mM Hexamin-CoCl<sub>3</sub>) resuspendiert und 10 - 15 Min. auf Eis gekühlt. Nach erneutem Abzentrifugieren und Resuspendieren in 0,8 ml TFB wurde die Suspension weiterhin auf Eis inkubiert und in 5 minütigen Abständen 28 µl DMSO, 28 µl DTT (2,25 M) und nochmals 28 µl DMSO zugesetzt.

210 µl dieser nun transformationskompetenten Bakterien wurden mit 1 - 5 µl eines Ligationsansatzes (50 - 200 ng DNA) oder 1 - 2 ng eines reinen Plasmids für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend folgte für 90 Sekunden eine Erwärmung auf 42° C (Wasserbad) und eine weitere Abkühlung auf Eis für mindestens 1 Min. Dann wurden 0,8 ml SOC zugegeben und der Transformationsansatz für 1 Stunde im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml SOC wurden die Bakterien 5 Min. bei Raumtemperatur mit 670xg abzentrifugiert, in 0,2 ml SOB resuspendiert, auf entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

## 8. Präparation kleiner Mengen Plasmid DNA ("mini prep")

Einzelkolonien transformierter Bakterien wurden mit einem Glasstäbchen gepickt und in 1,5 ml Selektionsmedium über Nacht bei 37° C geschüttelt. Diese Übernachtskultur wurde 5 Min. mit 8800xg abzentrifugiert, das Bakteriensediment in 100 µl



Lysozymlösung (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris; pH 8,0) resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl alkalische SDS - Lösung (0,2 M NaOH; 1 % SDS) zugegeben, 5 Min. auf Eis inkubiert, 150 µl Natriumacetat (3M, pH 4,8) hinzugefügt und 1 Stunde auf Eis stehen gelassen. Nach 10minütiger Zentrifugation mit 8800xg wurde das Sediment mit einem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze herausgezogen und verworfen, der Überstand mit 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt und 30 Min. bei -80° C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde 10 Min. bei 8800xg abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 9. Präparation großer Mengen Plasmid DNA ("large scale prep")

200 ml einer Bakteriensuspension wurden 10 Min. bei 4° C mit 6000xg abzentrifugiert, in 10 ml Lysozymlösung (siehe 8.) resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 ml alkalische SDS - Lösung (siehe 8.) zugegeben, sehr sanft gemischt, nach weiteren 5 Min. 15 ml Natriumacetat (3M, pH 4,8) hinzugefügt und diese Suspension für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellfragmente sowie die hochmolekulare DNA wurden durch 20minütiges Zentrifugieren mit 10800xg pelletiert, der Überstand mit 100 ml eiskaltem Ethanol versetzt und 30 Min. bei -80° C inkubiert. Die ausgefallene Plasmid DNA wurde 20 Min. mit 10800xg abzentrifugiert, in 8 ml 50 mM Tris, pH 8,0; 100 mM Natriumacetat resuspendiert, nochmals durch Zugabe von 20 ml Ethanol und 30minütiger Inkubation bei -20° C präzipitiert und mit 8000xg abzentrifugiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde der Niederschlag in 4 ml TE (50 mM Tris, pH 8,0; 1mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden darin 4,1 g CsCl gelöst und dann 300 µl Ethidiumbromid - lösung (10 mg/ml) zugegeben.

Diese Lösung wurde in einem Beckmann Vertikalrotor Typ 65 für 16 Stunden mit 55 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Durch das CsCl bildete sich ein Dichtegradient aus, in dem die Plasmid DNA von verbliebenen Resten entsprechend ihrer verschiedenen Auftriebskräfte getrennt wurde. Die plasmidhaltige Bande wurde mit einer Spritze abgezogen, mit frischer CsCl/Ethidiumbromid - Lösung aufgefüllt und nochmals für 6 Stunden unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die abgezogene plasmidhaltige Bande (ca. 1,5 ml) wurde mehrmals mit H<sub>2</sub>O - gesättigtem Butanol extrahiert, bis die rote Färbung (Ethidiumbromid) vollständig verschwunden war (2 - 4 mal). Dann wurde H<sub>2</sub>O auf 5 ml zugefügt und die Plasmid DNA durch Zugabe von 12,5 ml Ethanol und Inkubation für 1 Stunde bei -80° C (oder -20° C über Nacht) präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 8000xg, Waschen mit 80 % Ethanol, erneuter Zentrifugation und Trocknen im Vakuum wurde die Plasmid DNA in 0,3 - 1,0 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 10. Einfrieren und Auftauen von Bakterien

1,8 ml einer frischgewachsenen Bakterienkultur wurde in Polypropylen - Einfrier - röhren mit 0,2 ml DMSO gemischt, 30 Min. auf Eis inkubiert und dann bei -80° C gelagert.

Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurde die tiefgefrorene Bakteriensuspension nur leicht angetaut, die geschmolzenen äußeren Schichten dem Röhrchen entnommen und in entsprechendem Medium inkubiert. Der gefrorene Rest wurde sofort wieder in  $-80^{\circ}\text{C}$  verbracht.

### III. Zellkultur

#### 1. Trypsin - Behandlung von Zellen

Alle Zelllinien wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert (Lindl und Bauer, 1987). Das Medium wurde abgesaugt, die Zellschicht einmal mit PBS (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) nachgespült und dann 1 ml 0,05 % (NFB München Zellen 0,25 %) Trypsinlösung pro 10 cm - Petrischale zugegeben. Das Trypsin wurde durch leichtes Schwenken auf der Platte verteilt, sofort wieder abgesaugt und die Zellen für 3 - 5 Min. (NFB München Zellen 8 Min.) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen in 6 ml Medium suspendiert und  $10^6$  pro Schale neu ausgesät. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in  $37^{\circ}\text{C}$  bei 5,5 %  $\text{CO}_2$ .

#### 2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen tiefgefroren (Lindl und Bauer, 1987). Exponentiell wachsende Zellen (ca. 80 % konfluent) wurden von der Kulturschale abtrypsiniert, in 6 ml Medium bei 800xg für 4 Min. abzentrifugiert und in 1,8 ml FCS resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 ml DMSO wurden die Zellen 30 Min. auf Eis und mindestens 24 Stunden in  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, in einem  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut und mit 8 ml Medium in einer Kulturschale angesetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

#### 3. Stabile Transfektion

Stabile Transfektionen wurden mit einer modifizierten Form der Calciumphosphat-präzipitationsmethode durchgeführt (Graham und van der Eb, 1973; Wigler et al., 1977; Gorman, 1985). Diese Methode beruht darauf, daß die zu transfizierende DNA zusammen mit Calciumphosphat ausfällt und in dieser Form von den Zellen aufgenommen werden kann. Der genaue Mechanismus der Aufnahme ist unbekannt; persistierende toxische Effekte der hohen Calcium Konzentration wurden nicht beobachtet. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Effizienz, mit der DNA von Zellen aufgenommen wird. In vielen beschriebenen Experimenten, auch in den hier durchgeführten, zeigte es sich, daß transfizierte Gene oder Promoter-Bereiche in ähnlicher Weise funktionieren und den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen wie das bereits vorhandene, endogene Gen.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $10^6$  Zellen je 10 cm - Petrischale ausgesät. Zur Transfektion wurden pro Schale 10 ug DNA eingesetzt: 9 ug zerkleinerte, denaturierte DNA aus Lachs - Spermien als Träger DNA, 1ug des ausgewählten Plasmids und 0,1 ug pSV2neo (Southern und Berg, 1982), ein Plasmid, das das Enzym Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase exprimiert und dadurch die Selektion transfizierter Zellen in G418 - haltigem Medium ( Jiminez und Davies, 1980) ermöglicht. Durch den 10fachen Überschuß von ausgewähltem Plasmid ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß jeder selektionierte Zellklon neben pSV2neo auch das andere Plasmid enthält (Co - Transfektion).

Die DNA wurde mit 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  (Endkonzentration 125 mM) zu einem Volumen von 250 ul gemischt, tropfenweise zu 250 ul 2 x HBS (je 100 ml: 1,6 g NaCl; 0,074 g KCl; 0,025 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g Glukose; 1,0 g HEPES; pH 7,1;) gegeben und durch sanftes Schütteln langsam gemischt. Während 30 Min. bei Raumtemperatur bildete sich das Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA.

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, diese einmal mit PBS (siehe 2.) gewaschen und dann 500 ul Präzipitat direkt auf die Zellen gegeben. Unter gelegentlichem leichten Schwenken blieben die Platten 30 Min. bei Raumtemperatur stehen. Dann wurde der Transfektionsmix abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium kultiviert. 40 - 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, auf 5 Petrischalen verteilt und in G418 - haltigem Medium (700 ug/ml) selektioniert. Nach 10 - 14 Tagen hatten die G418 - resistenten Zellen vereinzelte Kolonien gebildet. Diese Klone wurden mit Hilfe kleiner Metallzylinder getrennt voneinander abtrypsiniert und in Medium mit 300 ug/ml G418 weiter propagiert.

#### 4. Kultur in Weichagar(ose)

Zur Kultur von Zellen in Weichagar wurde eine modifizierte Methode nach Lindl und Bauer (1987) benutzt. Multischalen mit 6 Vertiefungen (je 3,5 cm Durchmesser) wurden mit je 2 ml 0,7 % Grundagar (für 50 ml: 25ml 1,4 % Agar; 19,5ml 2 x DMEM; 5 ml FCS; 0,5 ml Penicillin/Streptomycin) beschichtet. Die Zellen wurden trypsiniert und auf  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  pro ml in 2 x DMEM (incl. 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin) verdünnt. Je 1 ml der verschiedenen Zellkonzentrationen wurde mit 1 ml 0,7 % Agar (Endkonz. 0,35 %) gemischt und über den erhärteten Grundagar geschichtet. Alle 5 Tage (bei intensivem Wachstum auch öfter) wurde 0,5 ml Medium ohne Agar überschichtet und entsprechend gewechselt. Nach 18 - 24 Tagen wurden die Kolonien gezählt.

Bei Versuchen mit Hormoninduktion enthielt die Hälfte der Ansätze  $10^{-6}$  M Dexamethason (Stammlösung  $10^{-3}$  M in 70 % Ethanol). Für die Kultur der Zellen in Weichagarose wurde statt Agar Agarose mit einer Elektroendoosmose  $<0,15$  verwendet.

#### 5. Transiente Transfektion

a) von NIH 3T3, F9, GM 637 und NFB München Zellen (Graham und van der Eb, 1973; Wigler et al., 1979; Spandidos und Wilkie, 1984).

$10^6$  Zellen wurden pro 10 cm - Petrischale ausgesät und 24 Stunden später mit der Calciumphosphatpräzipitationsmethode (s. Anm. bei 3.) transfiziert. 10 ug DNA

wurden mit 250  $\mu$ l 2 x HBS (siehe 3.) gemischt, das Volumen mit  $H_2O$  auf 475  $\mu$ l ergänzt und mit 25  $\mu$ l 2,5 M CaCl unterschichtet. Durch zeitweises sehr sanftes Bewegen wurden die beiden Schichten innerhalb von 30 Min. sehr langsam miteinander vermischt. Erst nach diesem Zeitraum bildeten sich keine Schlieren mehr und die Vermischung war vollständig. Das gebildete Präzipitat wurde direkt ins Medium pipettiert und wirkte für 14 - 20 Stunden auf die Zellen ein (NFB München Zellen 6 - 8 Stunden). Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS (siehe 1.) gewaschen und neues Medium zugegeben. NFB München Zellen erhielten zuvor noch einen Glycerol - Schock: das Medium wurde abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen dann 2 Min. mit 15 % Glycerol in PBS inkubiert. Dies sollte die DNA - Aufnahme verbessern. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde neues Medium hinzugefügt und die Zellen weiter kultiviert.

b) von HeLa tk<sup>-</sup> Zellen

(Luthmann und Magnusson, 1983; Kawai und Nishizaku, 1984; Spandidos und Wilkie, 1984)

24 Stunden vor der Transfektion wurden  $10^6$  Zellen pro 10 cm - Petrischale ausgesät. Zur Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit TBS (25 mM Tris, pH 7,4; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM  $CaCl_2$ ; 0,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,6 mM  $Na_2HPO_4$ ) gewaschen und 1 ml Transfektionslösung (10  $\mu$ g Plasmid und 500  $\mu$ g DEAE-Dextran in TBS) in die Petrischale gegeben. Die Inkubation erfolgte unter gelegentlichem Schwenken für 30 Min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Transfektionslösung abgesaugt, zweimal mit TBS gewaschen und die Zellen für 6 - 10 Stunden in Earle's Medium mit 0,1 mM Chloroquin-diphosphat inkubiert. Nach neuerlichem Waschen mit PBS wurden die Zellen in frischem Earle's Medium kultiviert.

Bei allen transienten Transfektionen wurden die Zellen 30 - 60 Stunden nach Transfektion geerntet.

## 6. Protein Präparation

Zur Isolierung der Proteine aus transient transfizierten Zellen (Luthman und Magnusson, 1983; Kawai und Nishizaku, 1984) wurde das Medium abgegossen, die Schalen zweimal mit PBS (siehe 1.) gewaschen, dann die Zellen in 1 ml TBS (siehe 5.) mit einem Gummispatel abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, 5 Min. zentrifugiert und die Zellen nach dem Resuspendieren in 100  $\mu$ l 0,25 M Tris, pH 7,8 durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen (Methanol-Trockeneis Bad und 37<sup>o</sup> C Wasserbad) aufgebrochen. Die Extrakte wurden 10 Min. mit 8700xg zentrifugiert, die Proteinkonzentration im Überstand nach der Methode von Lowry (1951) bestimmt und dann entweder sofort für den CAT - Assay (siehe IV,8) benutzt oder bei -80<sup>o</sup> C tiefgefroren aufbewahrt.

## 7. DNA Präparation

Das Medium einer konfluent bewachsenen Petrischale wurde abgegossen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (siehe 1.) gewaschen. Mit Hilfe eines Gummispatels wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem PBS abgeschabt, in ein 15 ml Corexrohrchen überführt und 5 Min. mit 4000xg bei 4<sup>o</sup> C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml Kernpuffer (0,3 M Sucrose; 10 mM NaCl; 1,5 mM Mg-Acetat; 10 mM

Tris, pH 8,0; 0,1 % Nonidet P - 40; 1 mM DTT) resuspendiert und in einem Dounce - Homogenisator durch 5 langsame Stöße mit dem Pistill aufgeschlossen. Die so freigesetzten Zellkerne wurden 5 Min. mit 4000xg bei 4<sup>o</sup> C abzentrifugiert, noch zweimal mit je 5 ml Kernpuffer gewaschen und in 10 ml TNE (10 mM Tris, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Zur Freisetzung der DNA wurde SDS (Endkonzentration 0,5 %) und Proteinase K (Endkonzentration 100 ug/ml) zugegeben und unter leichtem Schütteln in einem 37<sup>o</sup> C Wasserbad für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde mehrmals mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, die DNA mit Ethanol ausgefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 100 ul H<sub>2</sub>O resuspendiert.

## 8. RNA Präparation

Diese Methode nach einem Protokoll von Erwin Wagner, EMBL, Heidelberg, diente zur Isolierung der poly A - haltigen (poly(A)<sup>+</sup>) RNA.

Drei 10 cm Petrischalen oder eine 15 cm Petrischale, jeweils nahezu konfluent bewachsen, wurden nach Abgießen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS (siehe 1.) gewaschen, die Zellen mit einem Gummispatel in 10 ml STE (100 mM NaCl; 20 mM Tris, pH 7,4; 10 mM EDTA) abgeschabt und mit SDS (Endkonzentration 0,5 %) und Proteinase K (Endkonzentration 300 ug/ml) versetzt. Zur Zerkleinerung der hochmolekularen DNA wurde das Gemisch 30 Sek. mit einem Ultra - Turrax Messerhomogenisator homogenisiert und dann für 40 Min. in einem 37<sup>o</sup> C Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von NaCl auf 0,5 M und 50 mg Oligo - dT Zellulose (Typ VII) in 2 ml HSB (0,4 M NaCl; 20 mM Tris, pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,2 % SDS) wurde die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Roto - Tork gemischt. Während dieser Zeit sollte die poly(A)<sup>+</sup> RNA an die Oligo - dT Zellulose binden.

Danach wurde die Zellulose dreimal bei 3000xg für 2 Min. zentrifugiert und jeweils in HSB gewaschen. Nach einem abschließenden Resuspendieren und Abzentrifugieren in Wasch - Puffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 7,4; 1mM EDTA; 0,2 % SDS) wurde die poly(A)<sup>+</sup> RNA viermal mit 1 ml H<sub>2</sub>O eluiert. 300 ul dieses Eluats wurden für die Bestimmung der RNA Konzentration verwendet, der Rest wurde mit 3 M Na-Acetat (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,2 M gebracht und mit Ethanol bei -20<sup>o</sup> C über Nacht ausgefällt. Nach 30 minütigem Zentrifugieren mit 10 000xg bei 4<sup>o</sup> C und Trocknen im Vakuum wurde die RNA zu einer Konzentration von 1 ug/ul in H<sub>2</sub>O gelöst und in -80<sup>o</sup> C aufbewahrt.

## **IV. Analytische Methoden**

### 1. DNA - Transfer auf Nitrozellulose ("Southern Blot")

Nach Southern (1975). Je 10 ug genomische DNA wurde mit einer Restriktionsendonuklease vollständig fragmentiert und auf einem 0,8 % Agarosegel in TAE (siehe I,4) bei einer Spannung von 40 Volt für 15 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde es mit Ethidiumbromid (1 ug/ml) gefärbt und die DNA im UV Licht fotografiert. Nach Denaturieren für 40 Min. in 250 ml 1M NaOH und Neutralisieren durch Zugabe von 250 ml 1 M HCL; 1 M Tris für 60 Min. wurde das Gel 20 Min. in 10 x SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat; pH 6,5) äquilibriert.

Dann erfolgte der "Blot": Ein auf Gelgröße zurechtgeschnittener Nitrozellulosefilter wurde durch je 5 minütiges Inkubieren in H<sub>2</sub>O, 6 x SSC und 10 x SSC vorbereitet. In einer Plastikwanne mit 10 x SSC als Laufmittel wurde ein Schwamm, 3 mit 10 x SSC getränkte Blatt 3MM Papier, das Agarosegel, der Nitrozellulosefilter, nochmals 3 mit 10 x SSC getränkte Blatt 3MM Papier und schließlich ein Pack Papierhandtücher übereinander gestapelt. Oben auf kam zur Beschwerung eine Glasplatte und eine volle Halbliterflasche. Durch das nach oben in die Papierhandtücher gesaugte Laufmittel sollte die DNA aus dem Gel auf die Nitrozellulose transferiert werden. Der Transfer war nach 12 - 16 Stunden abgeschlossen. Der Nitrozellulosefilter wurde dann 10 Min. in 6 x SSC; 0,05 % SDS gewaschen, kurz luftgetrocknet, bei 80° C im Vakuum gebacken und zur Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde in Folie eingeschweißt.

## 2. RNA - Transfer auf Nitrozellulose ("Northern Blot")

Nach McMaster und Carmichael (1977) sowie Thomas (1980). 5 ug poly(A)<sup>+</sup> RNA in 5 ul H<sub>2</sub>O wurden mit 15 ul Denaturierungspuffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,85; 50 % DMSO; 20 % deionisiertes Glyoxal) gemischt, für 5 Min. auf 50° C erwärmt und nach Abkühlung bei Raumtemperatur mit 5 ul Ladepuffer (50 % Glycerol; 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,85; 0,1 % Bromphenolblau) versetzt. Die RNA wurde auf einem vertikalen 1 % Agarosegel, das mit einem 10 % Acrylamid-Kissen abgedichtet war, mit PB (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,85) als Laufpuffer bei 100 Volt für 3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel zur Anfärbung der RNA für 15 Min. bei Raumtemperatur mit 300 ug/ml Acridinorange in BP inkubiert, dreimal je 15 - 30 Min. mit PB entfärbt und im UV Licht fotografiert.

Der Transfer der RNA auf Nitrozellulosefilter erfolgte wie unter 1. für den "Southern Blot" beschrieben. Der Filter wurde vor dem Backen in 20 x SSC gewaschen.

## 3. Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten ("Nick Translation")

Es wurde der "Nick Translation Kit" der Firma Amersham benutzt. Zu 250 ug Plasmid DNA in 10 ul H<sub>2</sub>O wurden 2,5 ul alpha-<sup>32</sup>P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml), 5 ul Lösung I (je 100 uM dATP, dGTP und dTTP in Tris-HCl, pH 7,5; MgCl<sub>2</sub>; β-Mercapto-Ethanol) und 2,5 ul Lösung II (2,5 U DNA Polymerase I; 100 pg DNase I) gegeben und 2,5 - 3 Stunden bei 15° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ul Stop - Lösung (100 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,8 % SDS; 20 ug zerkleinerte, denaturierte Lachsspermien DNA) beendet, das Volumen mit TE (10mM Tris, pH 8,0; 1mM EDTA) auf 100 ul gebracht und die nicht inkorporierten Nukleotide durch Säulen- zentrifugation abgetrennt.

Hierfür wurde ein am Boden durchstochenes Eppendorfgesäß mit Quarzsand 2 - 3 mm hoch angefüllt, mit Sephadex G50 in TE überschichtet und bei 3000xg für 2 Min. zentrifugiert. Nach Durchzentrifugieren von 150 ug zerkleinerter, denaturierter Lachsspermien DNA, gefolgt von 300 ul TE, wurde die Eppendorf - Säule auf ein anderes Eppendorfgesäß gesetzt, die nick - translatierte Probe aufgetragen und durchzentrifugiert. Die einzelnen Nukleotide verblieben in der Säule, vom Durchlauf mit der markierten Plasmid DNA wurde 1 ul zur Bestimmung der spezifischen Aktivität benutzt. Durch Cerenkov - Zählung ergaben sich im Durchschnitt 10<sup>8</sup> cpm/ug DNA.

#### 4. Radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA Fragmenten

Zur Markierung von 1 pmol dephosphorylierter 5'-Enden wurde die DNA mit 10 U T 4 Polynukleotidkinase und 50 uCi gamma-<sup>32</sup>P-dATP (spezifische Aktivität 5000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) in 50 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA in einem Volumen von 20 ul für 30 Min. bei 37° C inkubiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch zweimalige Säulenzentrifugation (siehe 3.) abgetrennt.

#### 5. Hybridisierung von DNA - Sonden an filtergebundene DNA

Der durch "Southern Blot" (siehe 2.) mit DNA beschichtete Nitrozellulosefilter wurde zum Nachweis entsprechender Sequenzen mit radioaktiv "nick translaterter" (siehe 3.) Plasmid DNA als spezifischer Sonde hybridisiert. Der Filter (13 x 14 cm) wurde in Plastikfolie eingeschweißt und zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen mit 10 ml Vorhybridisierungslösung, bestehend aus 4 x SSC (0,6 M NaCl; 0,06 M Na-Citrat; pH 6,5), 1 x Denhardt's (je 0,02% BSA, Ficoll,PVP), 3,3 % PiPPi (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 0,1 % SDS und 200 ug zerkleinerter, denaturierter Lachsspermien DNA bei 65° C für 2 - 4 Stunden inkubiert. Danach wurde eine Ecke des Plastikbeutels aufgeschnitten, die Vorhybridisierungslösung herausgestrichen und ersetzt durch 10 ml Hybridisierungslösung (4 x SSC; 10 mM EDTA; 0,1 % SDS; 200 ug Lachsspermien DNA; 200 - 500 ng radioaktiv markierte Probe, zuvor 10 Min. gekocht und auf Eis abgekühlt). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht.

Zur Entfernung von nicht hybridisierter Probe und unspezifischen Hybridisierungen wurde der Filter in 6 Schritten gewaschen:

- zweimal 5 Min. mit 2 x SSC bei Raumtemperatur (RT)
- zweimal 30 Min. mit 2 x SSC, 1 % SDS bei 65° C
- zweimal 5 Min. mit 0,1 x SSC bei RT

Der getrocknete Filter wurde in Haushaltsfolie eingeschweißt und mit einem Kodak X-AR Film unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80° C autoradiographiert.

#### 6. Hybridisierung von DNA - Sonden an filtergebundene RNA

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Filter (11 x 14 cm) mit 20 ml Vorhybridisierungslösung (6 x SSC; 5 x Denhardt's; 0,5 % SDS und 50 ug/ml Lachsspermien DNA - vgl. 5.) bei 65° C für 4 - 6 Stunden inkubiert. Danach wurde die Vorhybridisierungslösung ersetzt durch 3 ml Hybridisierungslösung (4 x SSC; 5 x Denhardt's; 0,1 % PiPPi; 100 - 150 ng radioaktiv markierte DNA, die zuvor mit 150 ug Lachsspermien DNA 10 Min. gekocht und auf Eis abgekühlt worden war) und der Filter bei 65° C 18 - 24 Stunden inkubiert.

Das Waschen erfolgte für je 20 Min. in 200 ml

- 2 x SSC; 0,1 % SDS; 3,3 % PiPPi
- 1 x SSC; 0,1 % SDS; 3,3 % PiPPi
- 1 x SSC; 0,1 % SDS; 3,3 % PiPPi
- 0,5x SSC; 0,1 % SDS; 3,3 % PiPPi

Danach wurde der Filter trocken in Folie eingeschweißt und auf Kodak X-AR Film mit Verstärkerfolie bei -80° C exponiert.

### 7. S 1 - Kartierung von RNA

Nach Williams und Mason (1985). Je 5 µg poly(A)<sup>+</sup> RNA wurde zusammen mit 0,01 - 0,05 pmol 5'-endmarkierter DNA (siehe 4.) in 0,2 M Na-Acetat mit Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 80 % Ethanol und Trocknen im Vakuum wurde das Präzipitat in 10 µl Hybridisierungspuffer (80 % deionisierter Formamid; 40 mM PIPES, pH 6,4; 1 mM EDTA; 0,4 M NaCl) resuspendiert, 10 Min. bei 80° C denaturiert und über Nacht bei 47,5° C hybridisiert. Anschließend wurden durch Zugabe von 100 µl S 1 Lösung (60 U Nuklease S 1; 250 mM NaCl; 30 mM Na-Acetat, pH 4,5; 10 mM ZnSO<sub>4</sub>; 2 µg Lachsspermien DNA) und Inkubation für 40 Min. bei 30° C die einzelsträngigen Teile der Nukleinsäuren abgebaut.

Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Zugabe von 8 µg Hefe RNA wurde die Probe mit Ethanol ausgefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in 3 µl Probenpuffer (zu 1 ml deionisiertem Formamid werden 1 mg Xylenyloxol, 1 mg Bromphenolblau und 40 µl 0,5 M EDTA gegeben) aufgenommen, durch 3 minütiges Kochen und schnelles Abkühlen auf Eis denaturiert und auf einem Acrylamid - Harnstoffgel bei 1000 Volt elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II, 4b).

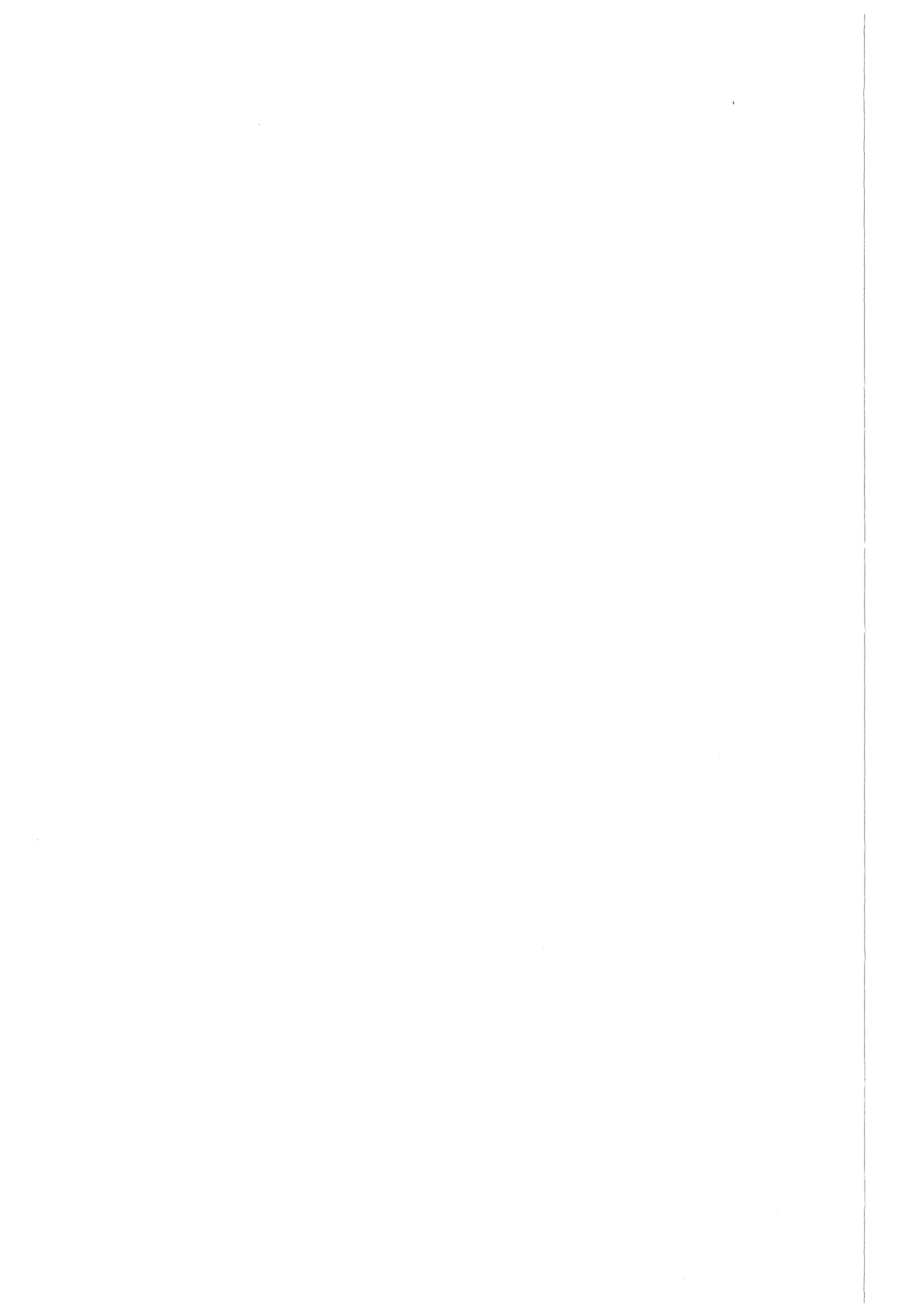
### 8. Bestimmung der CAT - Aktivität

Nach Gorman et al. (1982). 1,25 µl <sup>14</sup>C - Chloramphenicol (53 mCi/mmol; 200 µCi/ml) wurden in 100 µl 0,25 M Tris, pH 7,8 pipettiert, die gewünschte Menge Proteinextrakt aus transient transfizierten Zellen (vgl. III,6.) in 80 µl 0,25 M Tris, pH 7,8 hinzugefügt und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Acetyl - CoEnzym A gestartet. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden in 37° C. Anschließend wurde das Chloramphenicol mit 1 ml Ethylacetat durch kräftiges Vortexen und 5 minütiges Zentrifugieren aus der wässrigen Phase extrahiert. Das Ethylacetat wurde in der Vakuumzentrifuge eingedampft, das Chloramphenicol in 15 µl Ethylacetat wieder gelöst und punktuell auf eine DC - Platte aufgetragen. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol (9 : 1). Nach der chromatographischen Auftrennung von acetyliertem und nicht - acetyliertem Chloramphenicol wurde die Platte an der Luft getrocknet und auf Kodak X-AR Film mit Verstärkerfolie bei -80° C autoradiographiert.

Zur Bestimmung der umgesetzten Menge Chloramphenicol wurden die nicht - acetylierten und die acetylierten Formen ausgeschnitten, mit je 5 ml Quickszint versetzt und im Scintillationszähler die cpm bestimmt. Die spezifische CAT - Aktivität in pmol x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> berechnet sich aus

$$\frac{4750 \text{ pmol Chloramphenicol} \times \text{cpm acetyliertes Chloramphenicol}}{120 \text{ Min.} \times \text{mg Proteinextrakt} \times \text{cpm eingesetztes Chloramphenicol}}$$





## ERGEBNISSE

### I. Konditionale fos Expression führt zu transienter Transformation

Die Rolle des fos Gens in wachstums- und differenzierungsspezifischen Prozessen der Zelle ist noch größtenteils unklar. Eine Möglichkeit, Hinweise über seine genaue Funktion im Zellgeschehen zu bekommen, ist es, seine Expression gezielt zu erhöhen und dann zu analysieren, welche phänotypischen Veränderungen sich ergeben. Ich etablierte ein System, in dem das fos Gen durch einen distinkten externen Stimulus angeschaltet werden konnte. Damit war ich in der Lage, ein verändertes Zellverhalten direkt mit der fos Expression korrelieren zu können.

Da der fos Promoter selbst zwar auf viele verschiedene Stimuli reagiert, aber innerhalb weniger Minuten wieder reprimiert wird, ersetzte ich ihn durch einen viralen Promoter, den "Long Terminal Repeat" (LTR) des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) (Varmus und Swanstrom, 1982). Dieser ist nur in Anwesenheit von Steroidhormonen aktiv (Gröner et al., 1983; Hynes et al., 1983) und vermittelt mit ihm fusionierten Genen hormoninduzierbare Expression. Er war bereits für die konditionale Expression von Onkogenen erfolgreich verwendet worden (Huang et al., 1981; Jakobovits et al., 1984; Papkoff und Ringold, 1984; van der Hoorn und Müller, 1985; Jaggi et al., 1986). Durch die Fusion mit dem LTR sollten also größere Mengen fos Protein strikt hormonabhängig exprimiert werden.

Da die Deletion des 3'-untranslatierten Endes des fos Gens bei der tumorigenen Transformation eine Rolle spielt (Miller et al., 1984; Iba et al., 1988), deletierte ich in weiteren Konstrukten die entsprechenden Sequenzen. Mit diesen Mutanten wollte ich untersuchen, ob ihre hormoninduzierte Expression ebenfalls zum transformierten Phänotyp führt und welche Auswirkungen dann die Abschaltung des fos Gens durch Hormonentzug zeigt.

Als Kontrolle zu allen Versuchen klonierte ich ein hormoninduzierbares fos Gen, das zwar ein intaktes 3'-Ende besaß, aber in der für Protein kodierenden Region eine große Deletion hatte, sodaß kein funktionsfähiges fos Protein mehr synthetisiert werden sollte.

Zur Charakterisierung des Phänotyps fos exprimierender Zellen untersuchte ich drei Eigenschaften, die in der Regel für transformierte Zellen typisch sind:

### LTR-fos Konstrukte

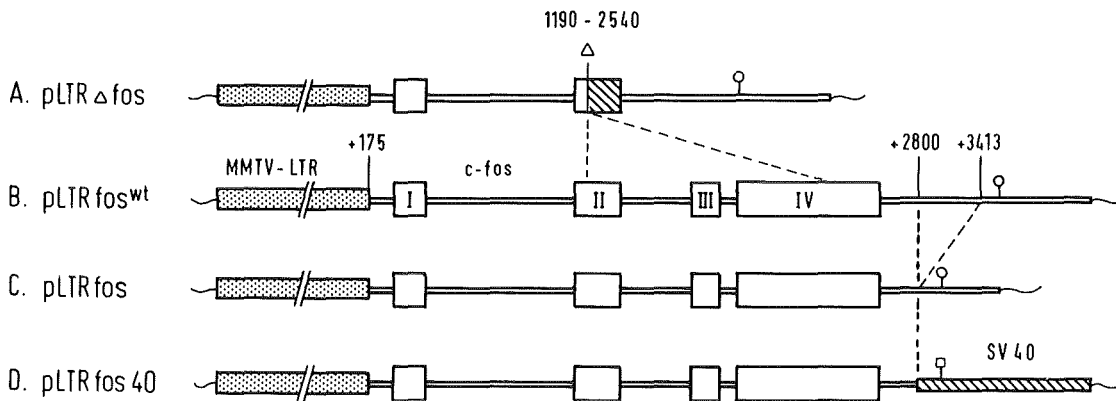


Abb. 2: Konditional exprimierbare fos Konstrukte.

Das c-fos Gen der Maus wurde fusioniert mit dem hormoninduzierbaren Promoter (LTR) des MMTV. A: pLTR $\Delta$ fos wurde erhalten durch Deletion der c-fos Sequenzen von Position 1190 (Bgl II) bis 2540 (BstE II) aus pLTRfos<sup>wt</sup> (die verbleibenden Enden wurden glatt ("blunt") ligiert). B: pLTRfos<sup>wt</sup> enthält das vollständige c-fos Gen ab Position 175 (identisch mit dem 3,7 kb BamHI Fragment aus p19/1, siehe R ther et al., 1985), inseriert in die BamHI Schnittstelle hinter den LTR des MMTV in pBG102 (Ponta et al., 1985). C: Für pLTRfos wurden die c-fos Sequenzen von Position 2800 (Sal I) bis 3413 (Mst II) deletiert: hierfür wurden in pLTRfos<sup>wt</sup> sämtliche 3'-Sequenzen ab Position 2800 (Sal I) deletiert und ersetzt durch 3'-Sequenzen ab 3413 (Mst II Schnittstelle durch Anfügung von Sal I - Linkern kompatibel gemacht) des gleichen Plasmids. D: In pLTRfos40 wurden alle 3'-Sequenzen des c-fos Gens ab Position 2800 (Sal I) ersetzt durch SV40 Sequenzen mit einem Polyadenylierungssignal (aus pSV2neo, Position 4848 (Hpa I) bis 4979 (BamHI) (Nordstrom et al., 1985), Hpa I durch Anfügung von Sal I - Linkern kompatibel gemacht). I-IV: Exons des c-fos Gens; P und □ : Polyadenylierungssignal; gepunktet: MMTV LTR; schr ggestrichelt: in pLTRfos40 - SV40 Sequenzen, in pLTR $\Delta$ fos - Rest des IV. Exons (aus dem Leseraster). Nummerierung von c-fos gemäß Van Beveren et al., 1983.

1. Fähigkeit zur Fokus-Bildung: transformierte Zellen sind beim Wachstum in der Kulturschale nicht mehr kontaktinhibiert; nach Ausbildung einer einlagigen Zellschicht (Monolayer) proliferieren sie im Gegensatz zu normalen Zellen weiter und bilden dreidimensionale Zellhaufen (Foci).

2. Fähigkeit zum Wachstum in Weichagar: transformierte Zellen benötigen zur Proliferation keinen festen Untergrund zur Anheftung mehr (anchorage independence); sie wachsen auch lösungsgelöst, z.B. eingebettet in eine Matrix.

3. Fähigkeit zur Tumorbildung in Nacktmäusen: transformierte Zellen können nach Injektion in athymische Mäuse Tumoren bilden.

Ich brachte nun das unterschiedlich manipulierte fos Gen in murine Fibroblasten ein und verglich den resultierenden Phänotyp der verschiedenen Klone vor und nach Hormoninduktion der LTR-fos Konstrukte. Zum direkten Vergleich verwendete ich parallel zwei Zellklone, die mit einem hormoninduzierbaren ras bzw. mos Onkogen transfiziert waren und deren Eigenschaften bereits charakterisiert waren (Jaggi et al., 1986). Auf molekularer Ebene analysierte ich Unterschiede in der Expression der verschiedenen LTR-fos Mutanten.

#### 1. Ein chimäres LTR-fos Gen induziert einen transformierten Phänotyp nach Hormongabe

Im einzelnen wurde das fos Gen folgendermaßen manipuliert (Abb. 2): pLTRfos enthielt eine Deletion im 3'-untranslatierten Bereich; in pLTRfos40 war der gesamte 3'-untranslatierte Bereich des fos Gens ersetzt durch das Polyadenylierungssignal des Affenvirus SV40; in pLTR $\Delta$ fos waren 85 % der kodierenden Sequenzen deletiert, so daß kein funktionsfähiges fos Protein mehr entstehen konnte; pLTRfos<sup>wt</sup> enthielt die unveränderten Wildtyp-Sequenzen von c-fos.

Diese Konstrukte wurden zusammen mit pSV2neo (Southern und Berg, 1982), einem Plasmid, das die Selektion transfizierter Zellen in G418-haltigem Medium ermöglichte, stabil in immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3 Zellen) transfiziert (siehe Methoden). Es wurden je 30 Einzelklone isoliert und ihr Genom auf Integration der transfizierten LTR-fos Konstrukte untersucht. Hierfür wurde die DNA extrahiert, mit Restriktionsendonukleasen fragmentiert, auf Nitrozellulose - Filter transferiert ("Southern Blot") und mit einer radioaktiv markierten fos-

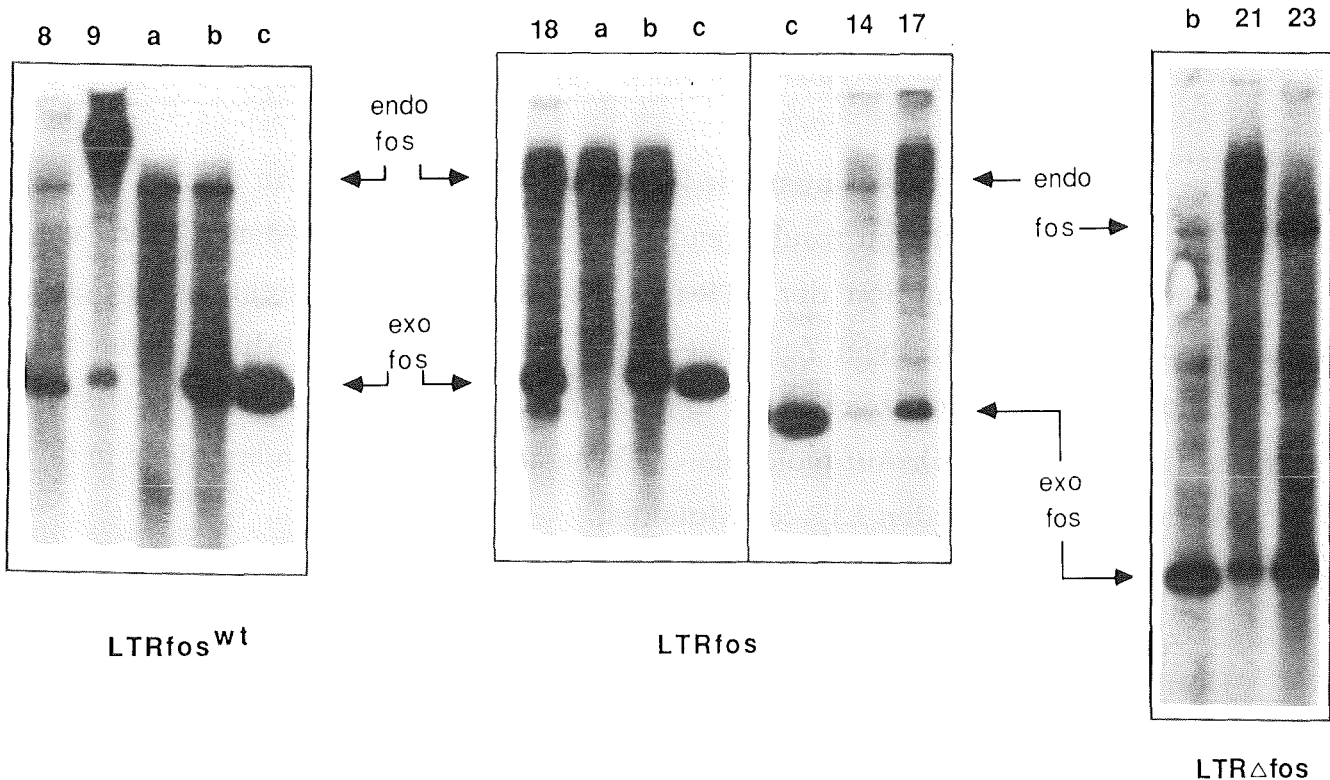


Abb. 3: Nachweis des transfizierten LTR-fos Gens im Genom von NIH 3T3 Zellen.

Aus den isolierten Einzelklonen wurde DNA isoliert, je 10 µg mit BamHI fragmentiert, auf Nitrozellulosefilter transferiert ("Southern Blot") und mit einem nick translatierten 1 kb Pst I Fragment des viralen fos Gens (aus pfos-1, Curran et al., 1982) hybridisiert. a: DNA aus untransfizierten NIH 3T3 Zellen. b: DNA aus untransfizierten NIH 3T3 Zellen, gemischt mit 200 µg BamHI-geschnittenem Kontrollplasmid. c: 200 µg BamHI-geschnittenes Kontrollplasmid. Als Kontrollplasmid wurde jeweils das entsprechende, für die stabile Transfektion verwendete LTR-fos Plasmid benutzt. Nr. 8 u. 9: mit pLTRfos<sup>wt</sup> transfizierte Klone (Nr. 9 unvollständige Fragmentierung der DNA); Nr. 14, 17 u. 18: mit pLTRfos transfizierte Klone. Nr. 21 u. 23: mit pLTRΔfos transfizierte Klone. exo fos bezeichnet das für das transfizierte LTR-fos Konstrukt indikative Fragment: Größe in pLTRfos<sup>wt</sup>: 3,6 kb; in pLTRfos: 3,0 kb; in pLTRΔfos: 2,3 kb. endo fos bezeichnet das für das endogene c-fos Gen indikative BamHI Fragment (15 kb, Curran et al., 1982). Die Größenbestimmung erfolgte durch parallel aufgetragene DNA des Phagen Lambda, die durch Fragmentierung mit HindIII in Stücke bekannter Größe aufgetrennt und im UV-Licht nach Färben mit Ethidiumbromid gemessen und fotografiert wurde.

spezifischen Sequenz hybridisiert (Abb. 3). Die indizierten Fragmente repräsentieren den vollständig integrierten LTR-fos Abschnitt des Plasmids. Durch Vergleich der Intensität dieser Bande mit dem Signal, das durch das endogene fos verursacht wird (endo fos), kann die Kopienzahl des transfizierten Plasmids pro Zelle bestimmt werden. Die Mehrzahl der Klone besaß mindestens eine Kopie des LTR-fos Gens.

Wichtig war nun, ob das transfizierte Konstrukt auch tatsächlich hormonabhängig arbeiten würde. Verschiedene Klone wurden für 90 Minuten mit  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason oder dem entsprechenden Volumen 70 % Ethanol inkubiert, die poly (A)<sup>+</sup> haltige RNA extrahiert, auf Nitrozellulose transferiert ("Northern Blot") und mit einer radioaktiven fos Probe hybridisiert (Abb. 4, gezeigt für pLTRfos und pLTRΔfos). Mit einer Ausnahme waren in sämtlichen Klonen fos spezifische Transkripte nur nach Dexamethason Gabe nachzuweisen. Die Ausnahme zeigte bereits ohne Hormon eine basale Expression. Da in diesem Klon sehr viele Kopien des Plasmids integriert waren, wird die Basalexpression vermutlich durch Integration einzelner Kopien in aktive Stellen des Chromatins verursacht. Durch Hormongabe wurde auch hier die fos Expression weiter gesteigert (nicht gezeigt).

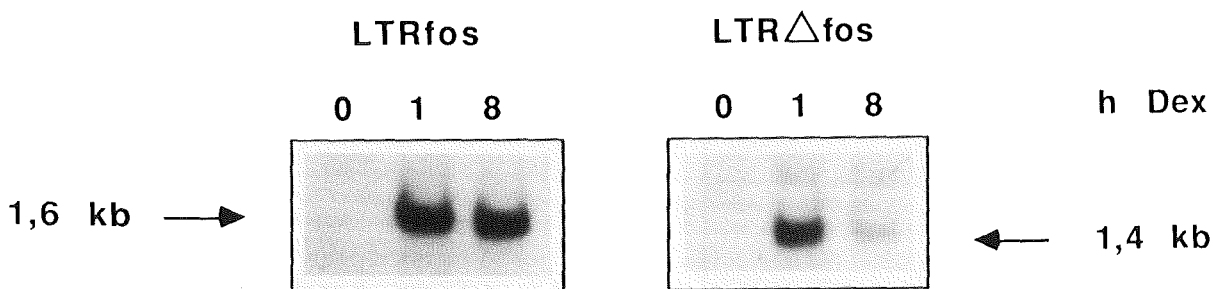
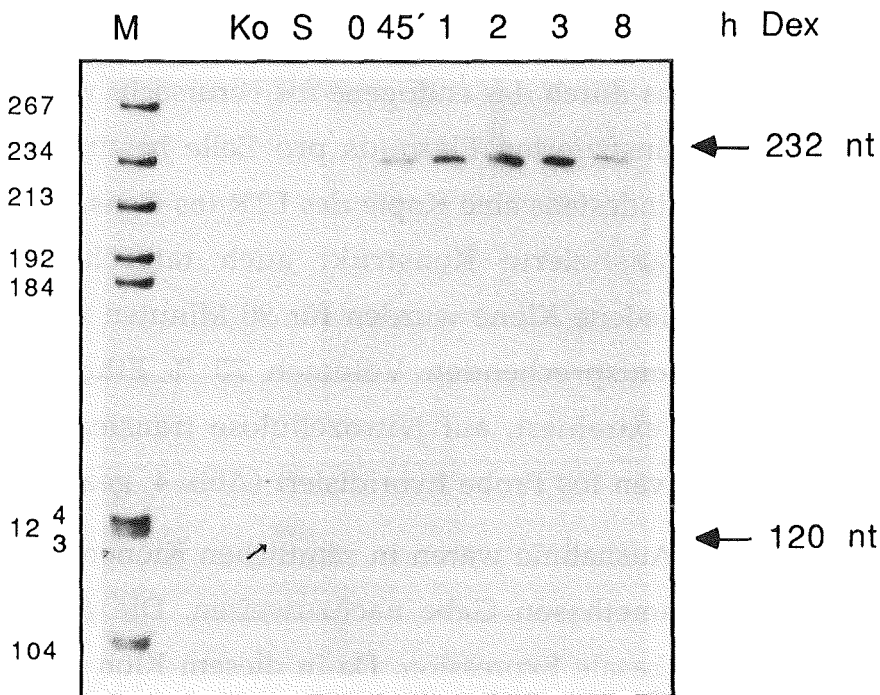


Abb. 4: Nachweis von LTR-fos spezifischer mRNA.

Zellklone, von denen nachgewiesen war, daß sie das entsprechende LTR-fos Konstrukt ins Genom integriert hatten, wurden mit  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason (2 µl einer  $10^{-3}$  M Stammlösung Dexamethason in 70 % Ethanol pro 10 ml Medium) für 1 oder 8 Stunden inkubiert, die poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert und auf Nitrozellulosefilter transferiert ("Northern Blot"). Hybridisiert wurde mit einer nick translatierten 1 kb Pst I v-fos Probe aus pfos-1 (Curran et al., 1982). 1,6 kb ist die indikative Größe für mRNA, die von pLTRfos exprimiert wird, 1,4 kb repräsentiert das Transkript von pLTRΔfos. Die Größe wurde bestimmt durch parallele Auftrennung von Gesamt-RNA, in der nach Färbung mit Acridinorange die Banden der 18S und 28S rRNA (1,8 bzw. 4,7 kb) sichtbar waren. Spur 0 zeigt poly(A)<sup>+</sup> RNA des unbehandelten Klons.

A. LTRfos<sup>wt</sup>



B. LTRfos

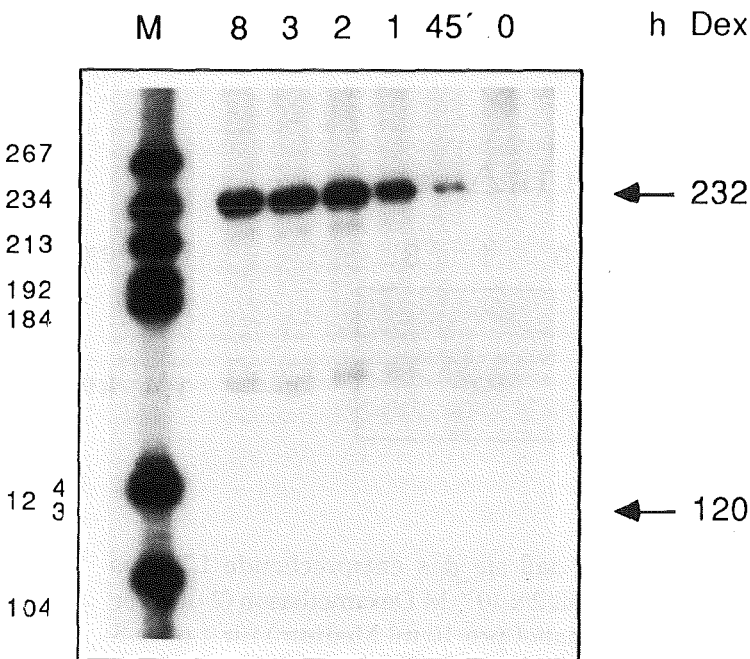


Abb. 6: S-1 Kartierung von Transkripten transfizierter LTR-fos Konstrukte sowie des endogenen c-fos Gens.

Transfizierte Klone wurden mit  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason (vgl. Abb. 4) behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten die poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert. Je 5  $\mu$ g dieser RNA wurde mit einer S-1

Sonde (siehe Abb. 5) hybridisiert und die RNA/DNA Hybride unter denaturierenden Bedingungen auf einem Acrylamid/Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fragment von 232 Nukleotiden (nt) Länge ist indikativ für mRNA des transfizierten pLTRfos<sup>wt</sup> (A.) bzw. pLTRfos (B.). 120 nt ist die erwartete Größe der Transkripte vom endogenen c-fos Gen. In A. ist zur Kontrolle eine S-1 Kartierung von unbehandelten (Ko) und serumstimulierten (S) NIH 3T3 Zellen durchgeführt worden. Der Pfeil zeigt auf das indikative Fragment der mRNA vom endogenen c-fos Gen. M bezeichnet den Größenmarker, hier pBR322, fragmentiert mit Hae III. Links daneben ist die Größe der jeweiligen Fragmente in nt angegeben.

Die Größen der fos mRNAs entsprachen den Größen, die man von den verschiedenen Konstrukten erwartet hatte: pLTRfos und pLTRfos40: 1,6 kb; pLTR $\Delta$ fos: 1,4 kb. Die Größe der von pLTRfos<sup>wt</sup> transkribierten mRNA sollte etwa den Transkripten des endogenen fos Gens (2,2 kb) entsprechen. Um auszuschließen, daß es sich bei dem 2,2 kb Signal nicht um mRNA des endogenen Gens handelte, wurde eine S 1 - Kartierung durchgeführt: Eine radioaktiv endmarkierte DNA - Sequenz, die Teile des LTR und die ersten 120 Nukleotide des fos Gens umfaßte (Abb. 5), wurde mit poly (A)<sup>+</sup> RNA hybridisiert, die ungepaarten Sequenzen mit S 1 Nuklease abverdaut und die Größe des verbleibenden Doppelstranges durch Elektrophorese auf einem Acrylamidgel bestimmt (Abb. 6). Die indikativen Fragmente wären 232 Nukleotide für ein LTRfos<sup>wt</sup> Transkript und 120 Nukleotide für die mRNA vom endogenen fos Gen. Ein 120 Nukleotide großes Fragment wurde nicht erhalten, es konnte also keine Aktivierung des fos Promoters nach Dexamethason Gabe nachgewiesen werden.

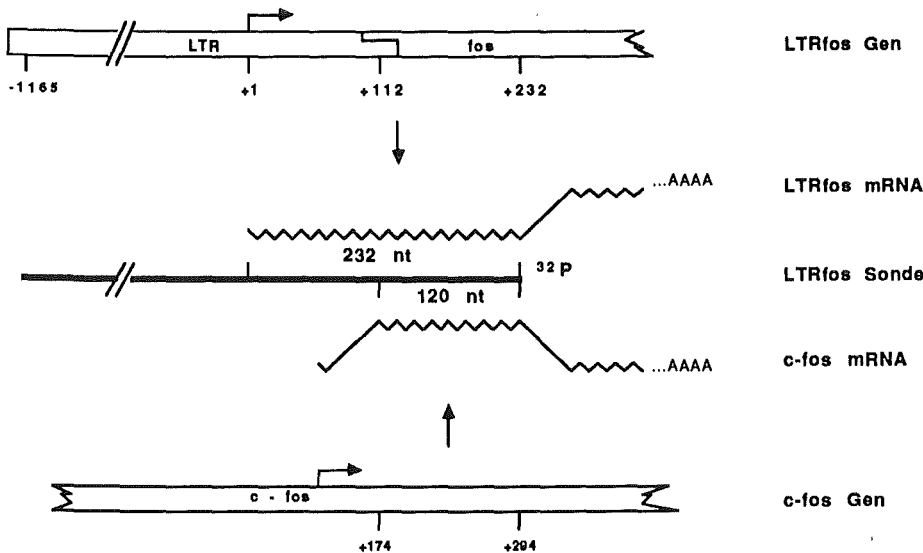
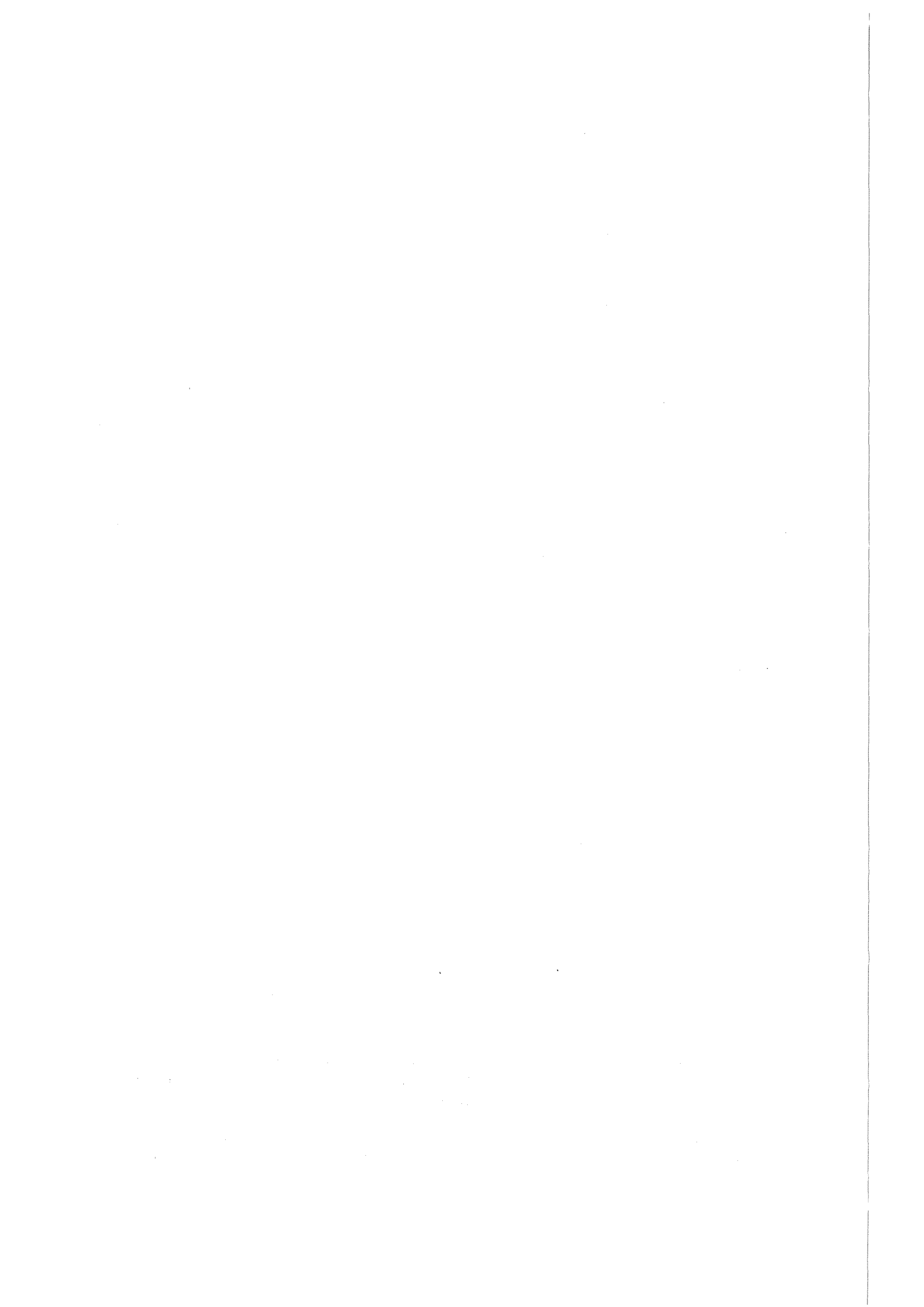


Abb. 5: Schematische Darstellung der S-1 Kartierung von fos mRNA (zu Abb. 6).

Ein 1397 Basenpaare langes Ava I Fragment (umfaßt den gesamten LTR-Promotor sowie die ersten 232 transkribierten Nukleotide) aus pLTRfos wurde durch 5'-Endmarkierung radioaktiv markiert und als Sonde zum Nachweis von LTR-fos Transkripten sowie mRNA vom endogenen c-fos Gen eingesetzt. LTR-fos mRNA sollte über eine Länge von 232 Nukleotiden (nt), mRNA vom endogenen c-fos Gens über eine Länge von 120 nt komplementär sein.





Das Fragment mit 232 Nukleotiden Länge zeigt neben der Hormoninduzierbarkeit des Konstrukts weiterhin, daß der Start der Transkription von der richtigen Stelle aus erfolgt: Für den MMTV LTR war als Startstelle für die Transkription ein Nukleotid gefunden worden, das 112 Basenpaare 5' vor der Fusionsstelle mit dem fos Gen sitzt (Lee et al. 1981). Bei Initiation der mRNA an dieser Stelle entsteht daher das 232 Nukleotide große Fragment.

Die Synthese von fos Protein war ebenfalls hormonabhängig: nach Gabe von Dexamethason für 2, 4 oder 6 Stunden konnte zu jedem dieser Zeitpunkte eine erhöhte Menge fos Protein nachgewiesen werden (Abb. 7, Experiment durchgeführt von Rolf Müller, EMBL, Heidelberg).

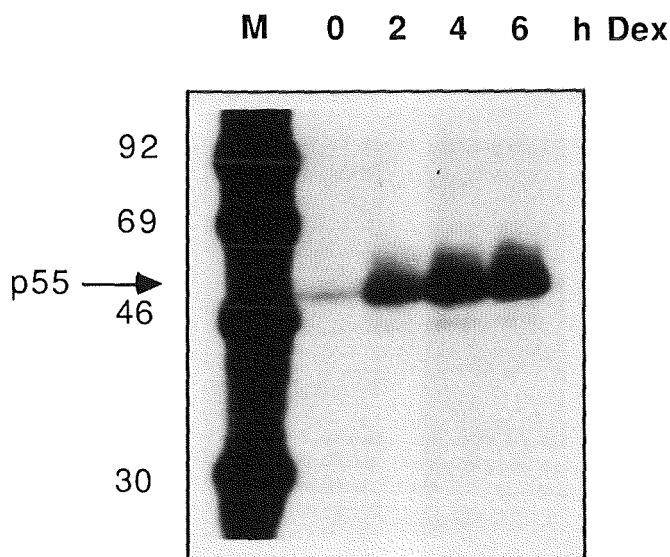
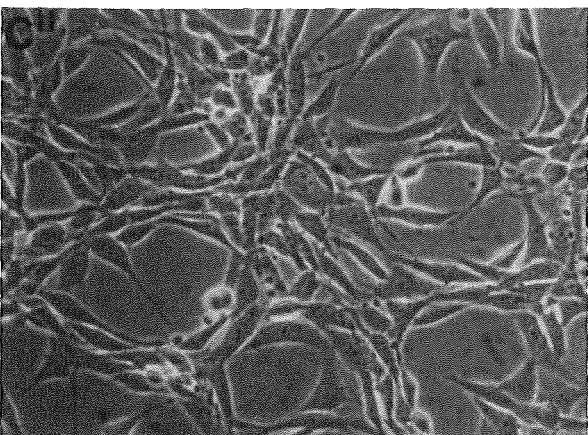
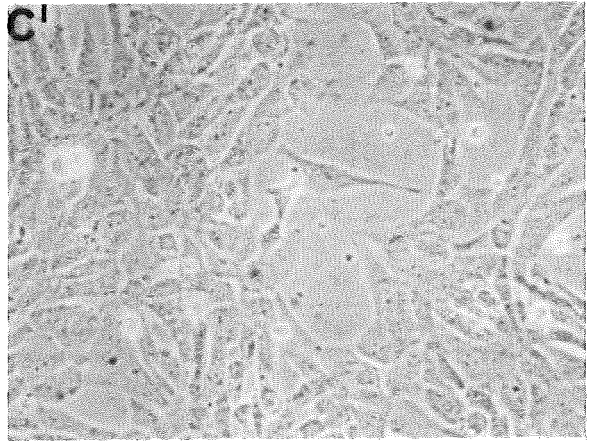
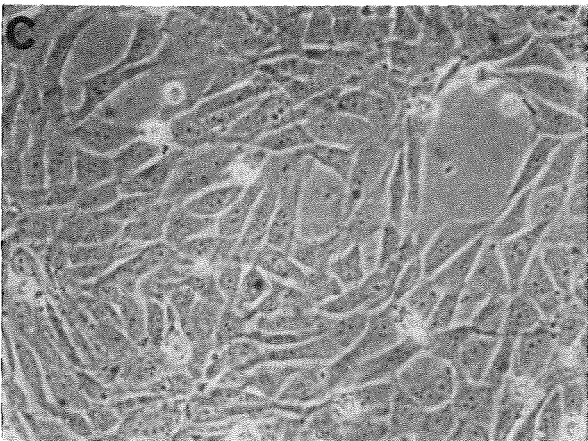
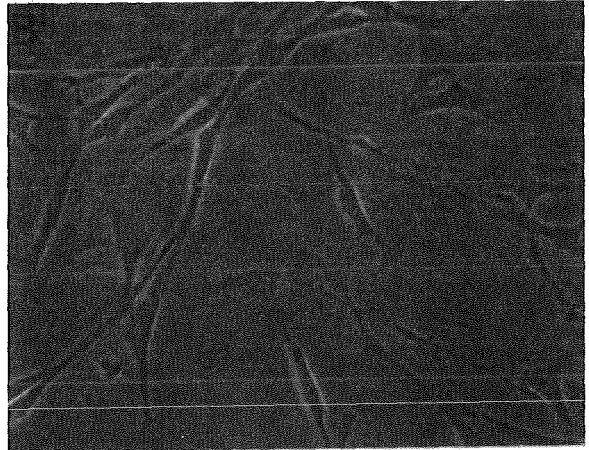
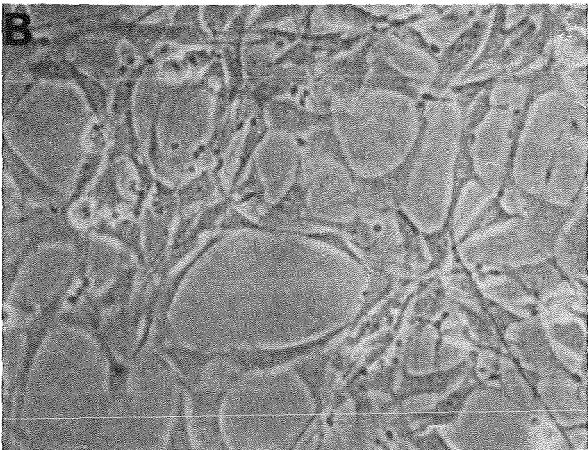
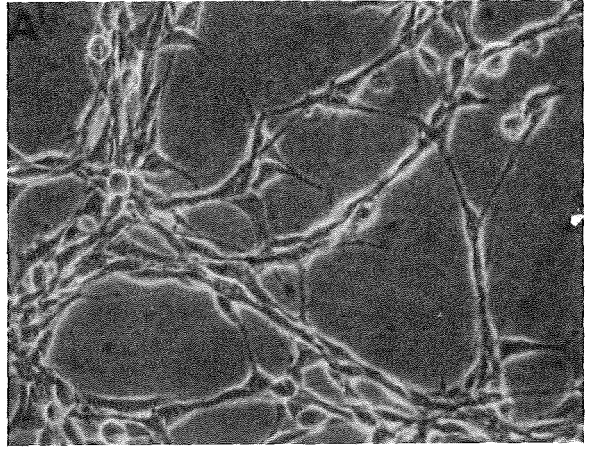
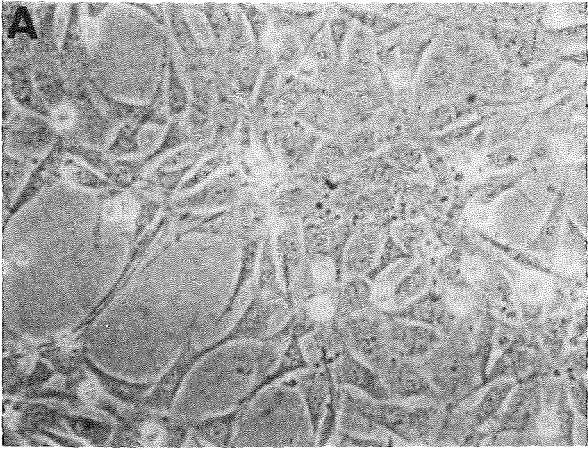


Abb. 7: Induktion eines transfizierten LTRfos Konstrukts führt zu erhöhter fos Protein Menge.

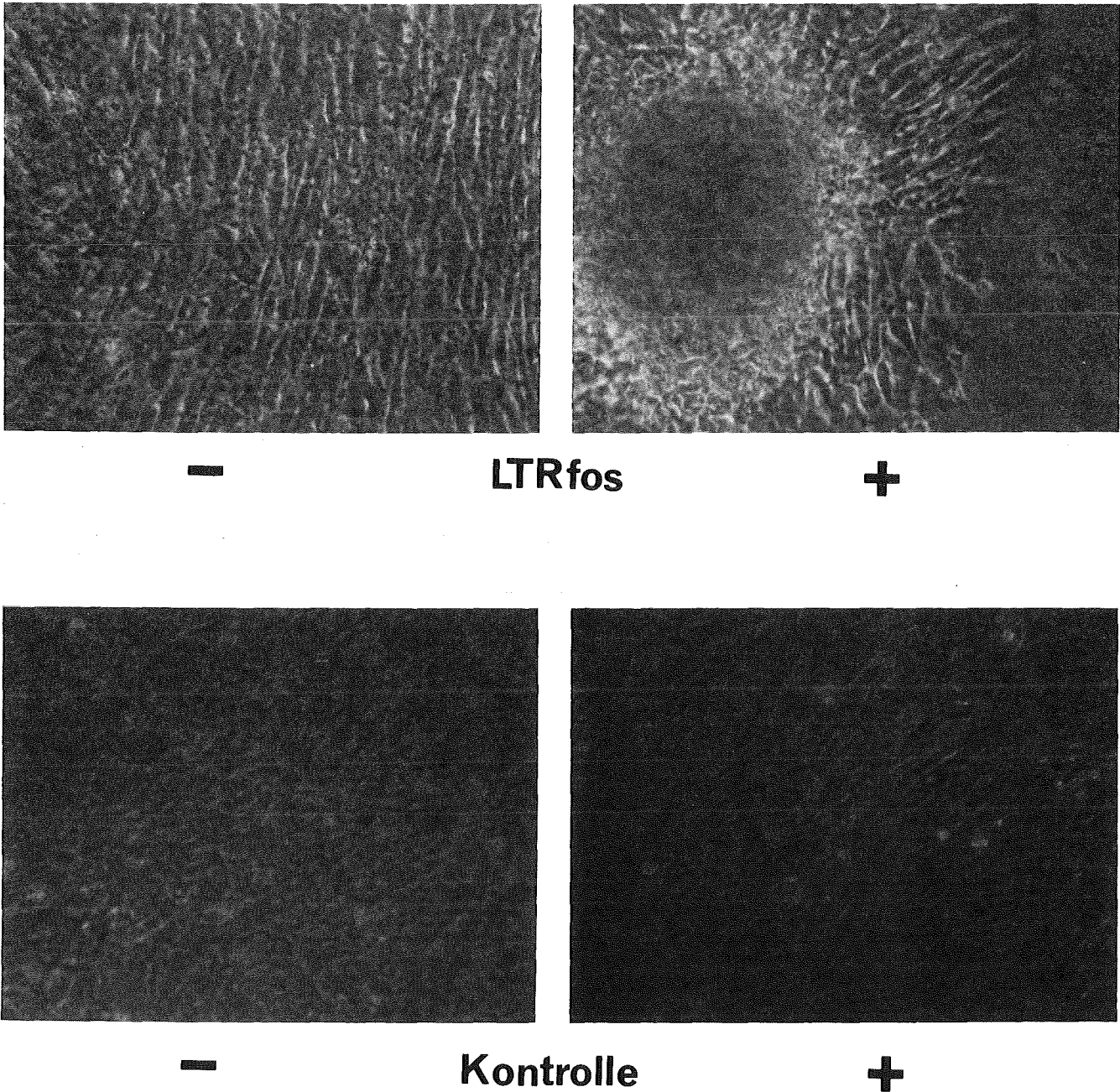
Mit pLTRfos transfizierte Zellen wurden für 2, 4 oder 6 Stunden mit  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason (vgl. Abb. 4) behandelt, für 45 Min. mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin inkubiert und die isolierten Proteine mit fos-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (Herstellung der fos-spezifischen Antikörper siehe Müller et al., 1986; Immunpräzipitation siehe Müller et al., 1984). M bezeichnet den Größenmarker, Proteine der Größen 30, 46, 69 und 92 kDalton. p55 bezeichnet das für fos Protein (55 kDalton, Müller et al., 1984a) indikative Signal. Dieses Experiment wurde durchgeführt von R. Müller, EMBL, Heidelberg.



Somit war ein Zellsystem etabliert, in dem das fos Gen durch einen bestimmten externen Stimulus angeschaltet werden konnte. Nun untersuchte ich in verschiedenen Einzelklonen, welche phänotypischen Konsequenzen sich aus der Induktion des fos Gens ergeben würden. Allein die Gabe von Dexamethason zu logarithmisch wachsenden Klonen pLTRfos und pLTRfos40 veränderte innerhalb von wenigen Stunden deren äußere Morphologie: sie konvertierten vom Normaltyp der Fibroblasten zu einem fusiformen Äußeren, waren spindelförmig mit langen Zellausläufern und gruppierten sich um freie Flächen (Abb. 8). Diese Veränderungen ergaben sich auch - noch stärker ausgeprägt - nach Hormonbehandlung von Zellen, die stabil mit LTRc-ha-ras (A) transfiziert waren. Untransfizierte NIH 3T3 Zellen und Zellen mit pLTRfos<sup>wt</sup> zeigten keine morphologischen Änderungen. Die Behandlung der Kontrollzellen mit dem Tumorpromotor TPA führte zu gleichen äußerlichen Änderungen wie die Onkogen Induktion in pLTRfos und pLTRc-ha-ras (A) Klonen (Abb. 8).

Dies war ein erster Hinweis, daß die hormoninduzierte Expression des fos Gens phänotypische Konsequenzen bewirken kann. Ich untersuchte nun im einzelnen die transfizierten Zellen auf die Fähigkeit zur Fokusbildung, zum Wachstum in Weichagar und -agarose sowie auf die Tumorigenität in Nacktmäusen.

Abb. 8 : Änderung der Zellmorphologie von 3T3 Zellen durch Onkogen Expression.  
A: LTRc-ha-ras(A) transfizierte Zellen. B: LTRfos transfizierte Zellen.  
C: untransfizierte 3T3 Zellen.  
A', B' und C': Zellen 20 Stunden nach Gabe von  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason.  
C'': Zellen 20 Stunden nach Gabe von 100 ng/ml TPA. A', B' und C'' zeigen die typische fusiforme Zellmorphologie transformierter Zellen.  
(Vergrößerung 82x)

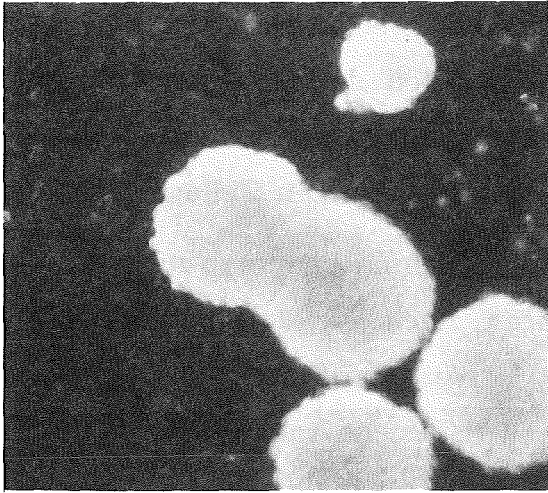


**Abb. 9:** Foci-Bildung von 3T3 Zellen durch Onkogen Expression.

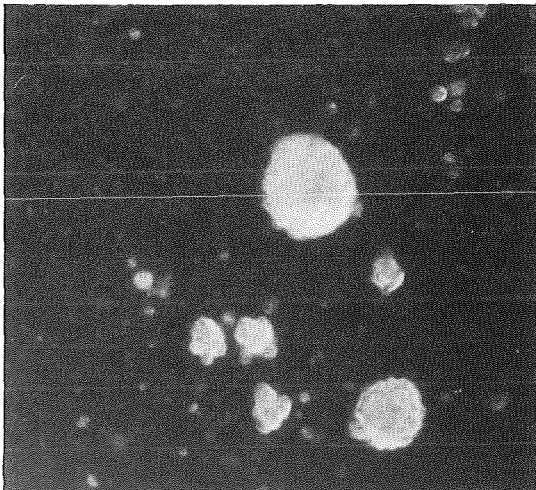
pLTRfos- bzw. pSV2neo(Kontrolle)-transfizierte Zellklone wurden zu  $10^6$  Zellen pro 10 cm Petrischale ausgesät. Am nächsten Tag und dann alle drei Tage wurde das Medium gewechselt und jeweils zur Hälfte der Zellen  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason (vgl. Abb. 4) gegeben. Nach 15 Tagen wurden die Zellen fotografiert. + zeigt Zellen mit, - Zellen ohne Zugabe von Dexamethason. LTRfos + Dex. zeigt einen typischen Fokus, der sich mehrere Hundert pro Petrischale bildeten. (Vergrößerung 82x)

**Focus-Bildung:** Verschiedene Zellklone wuchsen 14 Tage lang in Gegenwart oder Abwesenheit von Dexamethason und wurden dann auf die Bildung von dreidimensionalen Zellhaufen (Foci) untersucht (Abb. 9). Ohne Hormon waren alle Klone kontaktinhibiert: sie wuchsen nur zur einschichtigen Zelllage (Monolayer). Klone mit pLTRfos<sup>wt</sup> oder pLTR $\Delta$ fos veränderten ihren Phänotyp nicht. Klone mit pLTRfos oder pLTRfos40 jedoch verloren nach Dexamethason-Gabe ihre Kontaktinhibition, sie bildeten Foci. Zwei Zellklone, die mit einem hormoninduzierbaren ras Onkogen (pLTRc-ha-ras(A)) bzw. einem hormoninduzierbaren mos Onkogen (pLTRmos) transfiziert waren (Jaggi et al., 1986), bildeten ebenfalls nur nach Dexamethason-Gabe Foci. Jedoch war bei diesen beiden Klonen die Foci-Bildung ausgeprägter als bei den pLTRfos oder pLTRfos40 Zellen, die einzelnen Zellhaufen waren größer (nicht gezeigt). Zellen, die mit pSV2neo allein transfiziert waren, bildeten weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit des Hormons Foci (Abb. 9).

Um zu testen, ob jede Einzelzelle eines Klons in der Lage war, einen Fokus zu initiieren, wurden jeweils 100 Zellen von drei verschiedenen Klonen mit pLTRfos40 zusammen mit  $10^5$  untransfizierten NIH3T3 Zellen ausgesät. Die Hälfte der Zellen erhielt Dexamethason. Nach 18 Tagen hatten sich in den hormonbehandelten Kulturen zwischen 50 und 70 Foci gebildet (nicht gezeigt). Die Mehrzahl der Zellen war also in der Lage, einen Fokus zu bilden.



**LTRc-ha-ras(A)**



**LTRfos**



**Kontrolle**

**Abb. 11:** Vergleich der in Weich-Agar gebildeten Kolonien verschiedener Zellklone.

Die Kolonien wurden nach 20 Tagen Wachstum in Gegenwart von Dexamethason fotografiert. Typische Kolonien von LTRc-ha-ras(A) Zellen bestanden aus mehr als 1000, Kolonien von LTRfos Zellen aus etwa 100-1000 Zellen (jeweils geschätzt). Kontrollzellen (transfiziert mit pSV2neo) bildeten nur ganz vereinzelt kleine Kolonien. (Vergrößerung 30x)

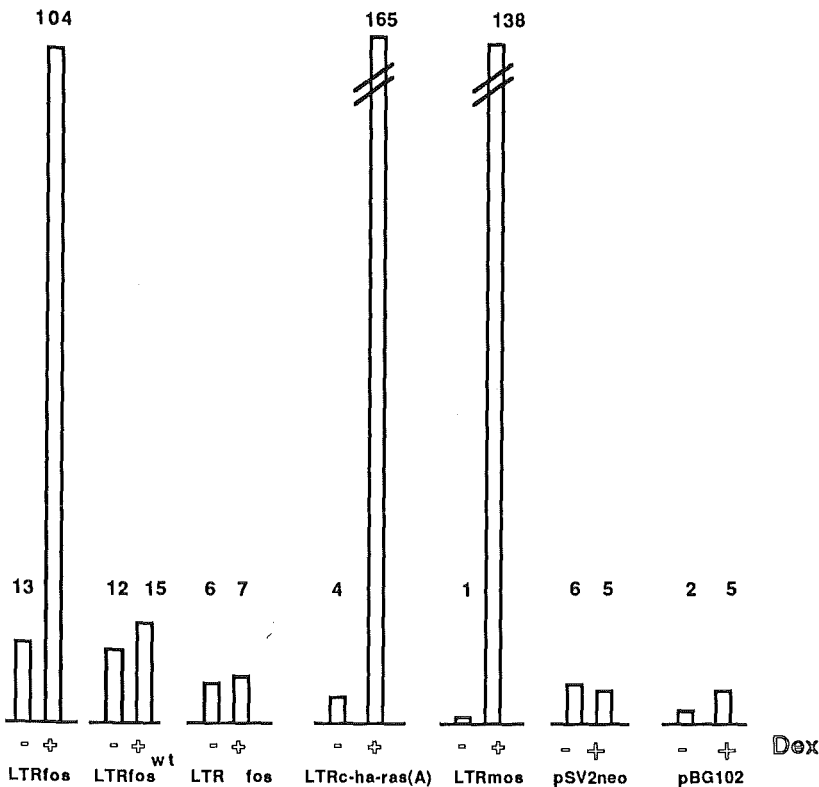


Abb. 10: Die Expression von Onkogenen vermittelt die Fähigkeit zum Wachstum in Weich-Agar.  $10^3$  Zellen je Zellklon wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von  $10^{-6}$  M Dexamethason in Weich-Agar ausgesät und nach 20 Tagen die entstandenen Kolonien gezählt. Die Balken repräsentieren die Anzahl der gebildeten Kolonien. - zeigt die Anzahl der Kolonien ohne, + mit Hormon. LTRfos, LTRc-ha-ras(A) sowie LTRmos zeigen eine drastische Zunahme des Weich-Agar Wachstums nach Induktion des Onkogens.

**Wachstum in Weichagar(ose):** Zellen verschiedener Klone wurden in Weichagar oder Weichagarose mit oder ohne Dexamethason eingebettet. Nach 18 Tagen wurden die entstandenen Kolonien gezählt (Abb. 10). In Weichagar ohne Hormon bildeten alle Klone wenige kleine Kolonien. In Anwesenheit von Hormon nahm die Anzahl und Größe der Kolonien von pLTRfos transfizierten Zellen deutlich zu. Zellen mit pLTRfos<sup>wt</sup> oder pLTRΔfos zeigten keinen deutlichen Unterschied zu nicht hormonbehandelten Zellen. pLTRc-ha-ras(A) und pLTRmos transfizierte Klone zeigten in Anwesenheit von Hormon eine dramatische Zunahme der Kolonienzahl und -größe. Das Wachstum dieser beiden Klone war hier deutlich stärker als das der pLTRfos Zellen (Abb. 11). Zellen mit pSV2neo oder pBG102 (enthält den MMTV-LTR ohne ein nachgeschaltetes Gen; Ponta et al., 1985) zeigten keine wesentliche Änderung.



Wurde für dieses Experiment statt Weich-Agar Weich-Agarose verwandt, ergab sich im Wesentlichen das gleiche Resultat, jedoch war hier insgesamt das Wachstum stärker (nicht gezeigt).

**Tumorigenität in Nacktmäusen:** Zellen von zwei Klonen pLTRfos und dem Klon pLTRc-ha-ras(A) wurden in je 7 athymische Nacktmäuse injiziert (durchgeführt von Siegfried Matzku, DKFZ, Heidelberg). Von den 21 verwendeten Tieren entwickelten 20 Tumoren. Die beiden Klone mit pLTRfos induzierten in 13 Tieren kleine, langsam wachsende Tumoren, die erstmals nach etwa 3 Wochen festgestellt werden konnten. Alle 7 Tiere mit injizierten pLTRc-ha-ras(A) Zellen entwickelten große, schnellwachsende Tumoren, deren Entwicklung bereits nach 10 Tagen erkennbar war.

Um die Zahl der verwendeten Tiere niedrig zu halten, wurde auf die negative Kontrolle (Injektion von Zellen mit pSV2neo) verzichtet: Da entsprechende Zellen schon sehr oft als Kontrolle in Tumorigenitätstests eingesetzt wurden (z.B. Bernstein und Weinberg, 1985; Bradley et al., 1986) und in der Regel keine Tumoren verursachen, gehe ich davon aus, daß die von mir verwendeten Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht tumorigen sind.

Diese Experimente zeigen, daß die gezielte Induktion des fos Gens den Zellen transformierende Eigenschaften verleihen kann. Notwendig ist jedoch auch hier, daß bestimmte Sequenzen des 3'-untranslatierten Bereichs deletiert sind. Die fos transfizierten Zellen prägen den transformierten Phänotyp nicht so drastisch aus wie die verwendeten ras oder mos transfizierten Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür wären klonale Unterschiede: die beiden ras und mos transfizierten Zellklone wurden durch ihre Fähigkeit zum Wachstum in Weichagar isoliert, es wurde also von vorneherein auf stark ausgeprägte transformierte Eigenschaften hin selektioniert (S. Kozma, persönliche Mitteilung). Die von mir etablierten Zellen wurden im Gegensatz dazu jedoch durch ihre Resistenz gegen das Antibiotikum G418 isoliert, transformierte Eigenschaften spielten bei dieser Selektion keine Rolle.

## 2. Hormonentzug führt zur Reversion des fos - transformierten Phänotyps

Bestimmte onkogene Viren vermögen Zellen dauerhaft zu transformieren, ohne daß dann noch virale DNA oder virales Protein nachzuweisen wäre (Galloway und McDougall, 1983). Diese "hit - and - run" Transformation konnte auch für Zellen gezeigt werden, die mit Plasmiden transfiziert wurden (Ching et al., 1985). In Bezug auf die hormoninduzierte fos - Transformation war es nun interessant zu wissen, ob für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps weiterhin fos Expression nötig ist oder ob fos einen "hit - and - run" Impuls initiieren kann.

Hierzu wurden pLTRfos transfizierte Zellen durch Hormonbehandlung zur Bildung von Foci gebracht. Diese Foci wurden trypsiniert und die so vereinzelteten Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von Dexamethason neu ausgesät. Während hormonbehandelte Zellen wiederum Foci bildeten, waren die Zellen ohne Hormon jetzt kontaktinhibiert, sie bildeten keine Foci.

Dies zeigt, daß die fos Expression den transformierten Phänotyp nicht nur induziert, sondern zur Aufrechterhaltung transformierter Eigenschaften auch weiterhin vorhanden sein muß. Die Abschaltung des fos Gens ermöglicht der Zelle, vom transformierten wieder zum normalen Phänotyp zu revertieren. Fos initiiert also keinen der "hit - and - run" Tumorigenese vergleichbaren Impuls.

## 3. Überexpression des fos Proteins ist für die Transformation verantwortlich

Die verschiedenen Mechanismen der Aktivierung von Proto-Onkogenen zu transformierenden Onkogenen resultieren im Endeffekt in einer nicht mehr adäquat geregelten Genexpression oder in einer veränderten Struktur des Genprodukts. Für fos war gezeigt, daß das unveränderte Protein tumorigene Eigenschaften besitzt (diese Arbeit; Miller et al., 1984; Meijlink et al., 1985). Es war also wahrscheinlich, daß fos durch eine rein quantitative Zunahme seines Proteins die Transformation der Zelle bewirkt. Um herauszufinden, wie die Deletion im 3'-untranslatierten Bereich zur tumorigenen Aktivierung des fos Gens führt, untersuchte ich die Expression der verschiedenen LTR - fos Konstrukte.

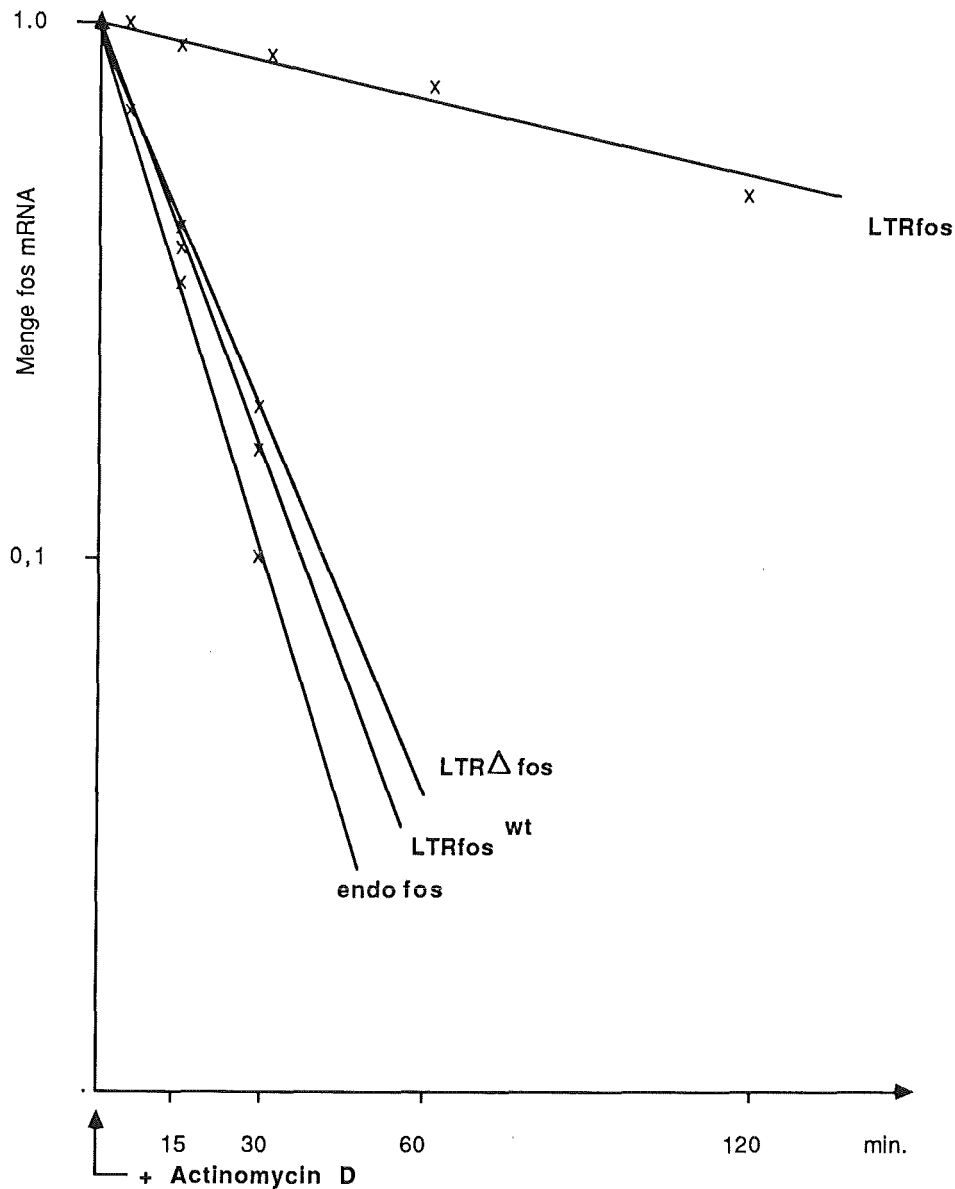


Abb. 12: Deletion des 3'-untranslatierten Endes stabilisiert die fos mRNA.

Die Zellklone mit verschiedenen LTR-fos Konstrukten wurden für 90 Min. mit Dexamethason ( $2 \times 10^{-7} M$ ) inkubiert, dann durch Zugabe von Actinomycin D (20 ug/ml) die Transkription blockiert. In untransfizierten 3T3 Zellen (bezeichnet als "endo fos") wurde die fos mRNA Synthese durch 36stündiges Hungern der Zellen in DMEM mit 0,5 % FCS und anschließender Stimulation mit 15 % FCS in DMEM induziert. 30 Min. nach dieser Serumstimulation wurde ebenfalls Actinomycin D zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Actinomycin D Gabe wurde dann die poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert. Durch "Northern Blot", Hybridisierung der RNA mit einer radioaktiv markierten v-fos Sonde (vgl. Abb. 4) und Messung der Stärke des fos-spezifischen Signals mit einem Joyce-Loebel Densitometer wurde die Menge an fos Transkripten bestimmt.

20 ug/ml Actinomycin D hemmte die Serum- bzw. Hormoninduktion des endogenen bzw. des transfizierten fos Gens, wenn es gleichzeitig mit dem Induktor (Serum bzw. Hormon) gegeben wurde (Kontrolle für Actinomycin D Wirkung).

Aus den Kinetiken der fos mRNA Menge nach einmaliger Hormoninduktion verschiedener Konstrukte war bereits zu sehen, daß die von pLTRfos<sup>wt</sup> oder pLTRΔfos transkribierte mRNA Menge schneller reduziert wurde als die von pLTRfos (Abb. 4 u. 5). Es bot sich daher an, die Halblebenszeiten dieser mRNAs zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Halblebenszeiten der mRNA wurde zunächst das fos Gen induziert und nach Erreichen einer maximalen fos mRNA Menge die Transkription mit Aktinomycin D blockiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde dann die p(A)<sup>+</sup> RNA eluiert und die Menge der fos spezifischen Transkripte bestimmt (Abb. 12). Diese Messungen wurden für mRNA durchgeführt, die vom normalen, endogenen fos Gen oder von den verschiedenen transfizierten LTR-fos Konstrukten transkribiert wurden. Es wurden jeweils zwei verschiedene LTR-fos Klone untersucht. Einmal wurde die fos mRNA Menge durch Hybridisierung einer radioaktiven fos Sonde an filtergebundene RNA ("Northern Blot") bestimmt (Abb. 12), ein zweites Mal wurde die fos mRNA Menge durch eine S-1 Kartierung bestimmt (nicht gezeigt). Die nach den beiden unabhängigen Experimenten ermittelten Halblebenszeiten differierten weniger als 10 %.

Die mRNA des endogenen c-fos Gens besaß wie erwartet eine extrem kurze Halblebenszeit von etwa 9 Minuten. Die Halblebenszeiten der Transkripte von pLTRfos<sup>wt</sup> und pLTRΔfos lagen in der gleichen Größenordnung (12 bzw. 14 Minuten). Im Gegensatz dazu war der Abbau der Transkripte von pLTRfos extrem verlangsamt: die Halblebenszeit betrug 2 Stunden. Ein weiteres Konstrukt, das fos unter Kontrolle eines menschlichen Metallothionein-Promoters exprimierte und dessen 3'-untranslatiertes Ende ersetzt war durch einen viralen LTR (p76/21, Rüther et al., 1985) transkribierte ebenfalls eine mRNA mit drastisch verlängerter Halblebenszeit (hier nicht gezeigt, siehe dazu Rahmsdorf et al., 1987).

Die erhöhte Stabilität der mRNA führt zu vermehrter Protein - Synthese: In pLTRfos transfizierten Zellen ist die Menge an fos Protein gegenüber Kontrollzellen stark erhöht (nicht gezeigt, vgl. Abb. 7; Experiment durchgeführt von Rolf Müller, EMBL, Heidelberg).

Diese Experimente zeigen, daß im 3'-untranslatierten Bereich des fos Gens Sequenzen vorhanden sind, die bei der posttranskriptionellen Regulation der fos Expression eine Rolle spielen. Sie sind verantwortlich für die schnelle Degradation der mRNA, ihre Deletion verlängert die Halblebenszeit von etwa 10 Minuten auf 2 Stunden.

Da nur jene LTR-fos Konstrukte transformierend wirken, die eine Deletion im 3'-untranslatierten Bereich haben, kann man folgern, daß die Konversion des Proto-Onkogens c-fos zum aktivierten Onkogen allein durch seine verstärkte Expression bewirkt werden kann: durch die stark verlängerte Halblebenszeit der mRNA steht diese länger für die Translation zur Verfügung, es wird mehr fos Protein synthetisiert.

Diese erhöhte Syntheserate ist weiterhin notwendig zur Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps: nach Abschalten der fos Expression revertieren die Zellen zum Normaltyp.

Wie das Überangebot eines einzigen Proteins die pleiotropen Effekte bewirken kann, die letztendlich zur Tumorbildung führen, ist Gegenstand des zweiten Teils meiner Arbeit.

## II. Schlüsselrolle des fos Proteins im molekularen Signaltransfer

Man nimmt an, daß Onkoproteine ihren tiefgreifenden Einfluß auf den Phänotyp von Zellen dadurch bewirken, daß sie als Teile von Signalketten diese "kurzschließen" und der Zelle dadurch eine veränderte Genexpression aufzwingen.

Im zweiten Teil meiner Arbeit untersuchte ich eine mögliche Beteiligung von fos und anderen Onkoproteinen an Signaltransferketten und analysierte potentielle Interaktionen zwischen einzelnen Komponenten. Zu diesem Zweck wurde willkürlich die intrazelluläre Menge von fos oder einem anderen Onkoprotein manipuliert und die Auswirkungen auf Indikatorgene untersucht. Ist das betreffende Onkoprotein in einen Signaltransfer involviert, sollte die veränderte Expression ein Signal vortäuschen und durch die Antwort eines Indikatorgens direkt eine funktionelle Rolle des Onkoproteins implizieren.

Für diese Analyse verwendete ich neben konstitutiv fos-exprimierenden Vektoren folgende (Proto-)Onkogene:

**psrc:** ein virales Onkogen, dessen Genprodukt an der Innenseite der Plasmamembran verankert ist und tyrosinspezifische Proteinkinase Aktivität besitzt (Courtneidge et al., 1980; Hunter und Cooper, 1985)

**pc-ha-ras (N):** ein zelluläres Proto-Onkogen, das ebenfalls an der Membran sitzt und GTPase - Aktivität zeigt (entspricht Konstrukt pbc-N1 in Santos et al., 1984; Sweet et al., 1984; Buss und Sefton, 1986).

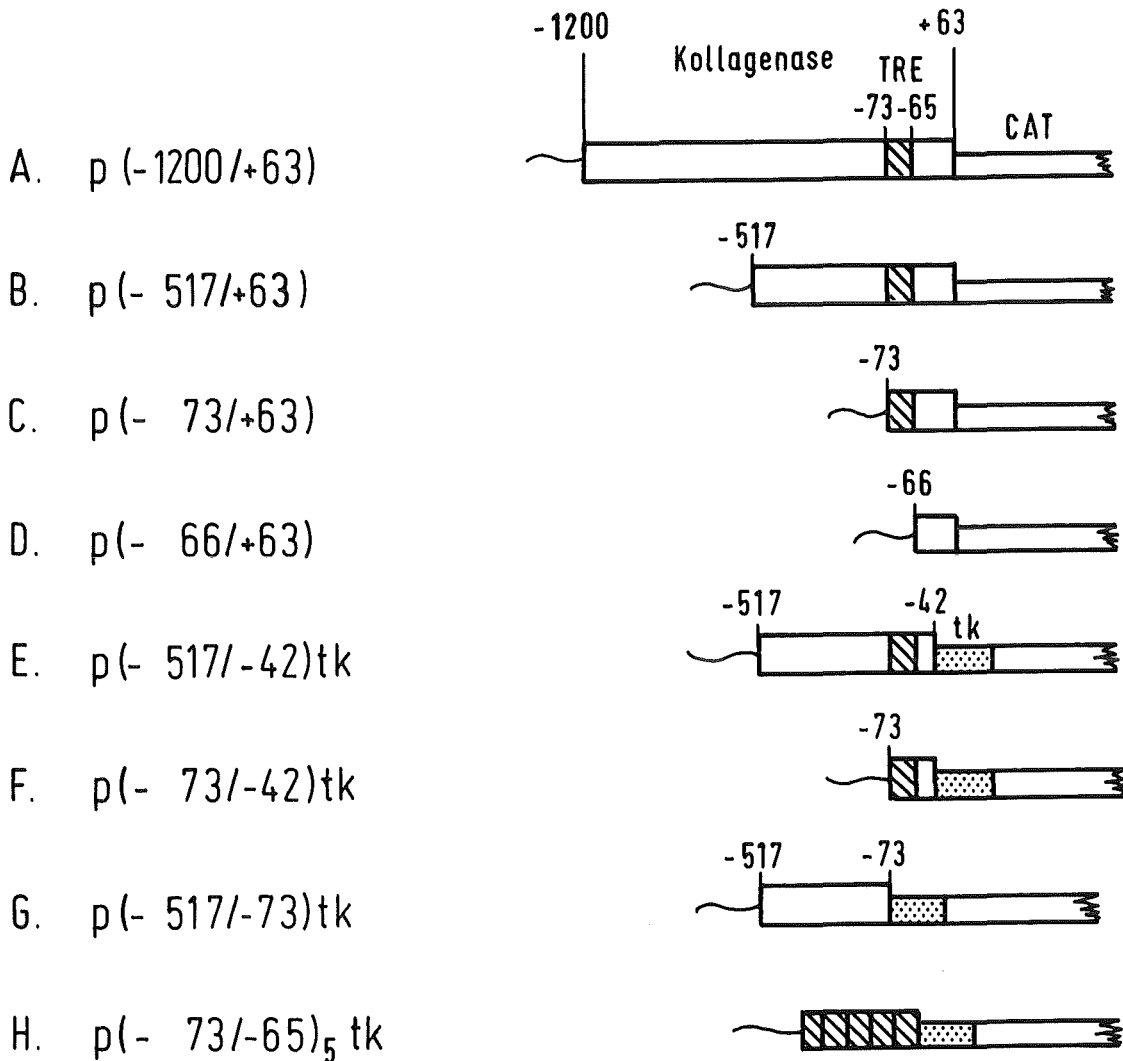
**pc-ha-ras (A):** ist eine onkogene Version von pc-ha-ras (N), es besitzt eine Punktmutation im 12. Codon, was einen Aminosäureaustausch bewirkt (entspricht Konstrukt T24-C3 in Santos et al., 1984; McGrath et al., 1984).

**pLTRc-ha-ras (N) und pLTRc-ha-ras (A)** sind die beiden oben erwähnten ras (Proto-)Onkogene, fusioniert mit dem hormoninduzierbaren Promoter des MMTV (Jaggi et al., 1986).

**pLTRmos:** ist das virale mos Onkogen, fusioniert mit dem MMTV-LTR (Jaggi et al., 1986). Das Genprodukt besitzt serinspezifische Proteinkinase Aktivität und ist im Zytoplasma lokalisiert (Papkoff et al., 1983; Sefton, 1987).

**ptrk:** ist ein zelluläres Onkogen, dessen Protein tyrosinspezifische Proteinkinase Aktivität besitzt und ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist (Martin-Zanca et al., 1986; Mitra et al., 1987; Kozma et al., 1988).

## Kollagenase-CAT Konstrukte



**Abb. 13:** Das bakterielle CAT-Gen unter der Kontrolle des Kollagenase Promoters.

Verschiedene Teile des humanen Kollagenase Promoters mit der Startstelle der Transkription wurden inseriert in pBLCAT 3 (A-D). Teile des Kollagenase Promoters ohne eigene Startstelle wurden in pBLCAT 2 (E-H) kloniert. Hier erfolgte der Start der Transkription vom Promoter des Thymidinkinase Gens (tk, gepunktet) des Herpes Simplex Virus. Die Klonierung wurde durchgeführt von P. Angel und B. Stein (genaue Beschreibung siehe Angel et al., 1987a und Angel et al., 1987b; für pBLCAT 2u.3 siehe Luckow und Schütz, 1987). Schräggestrichnet: TPA-regulatorisches Element (TRE); Die Bezeichnung der KollagenaseCAT Konstrukte repräsentiert jeweils den Anfangs- und Endpunkt des Fragments aus dem Kollagenase Promoter.

**pSVc-myb:** ist das zelluläre myb Proto-Onkogen, fusioniert mit einem SV40 Promoter, sein Genprodukt ist im Zellkern lokalisiert (Klempnauer und Sippel, 1986; Bister und Jansen, 1986).

**pSVv-myb:** ist die virale Form des myb Gens, ebenfalls fusioniert mit einem SV40 Promoter (Klempnauer und Sippel, 1986; Bister und Jansen, 1986).

**pSVc-myc:** ist das zelluläre myc Proto-Onkogen, fusioniert mit einem SV40 Promoter, dieses Genprodukt ist nukleär (entspricht Konstrukt pSVc-myc-1 in Land et al., 1983; Müller und Verma, 1984; Bister und Jansen, 1986).

Die gezielte Veränderung der Expression dieser verschiedenen Onkogene wurde auf drei Wegen erreicht:

1. In Mausfibroblasten, die stabil mit einem Onkogen unter Kontrolle eines hormoninduzierbaren (konditionalen) Promoters transfiziert waren, wurde dieses Onkogen mit Dexamethason induziert.

2. In verschiedene humane und murine Zellen wurde transient ein Onkogen transfiziert, das unter der Kontrolle seines eigenen oder eines konstitutiven viralen (SV40) Promoters exprimiert wurde.

3. Es wurden Plasmide transfiziert, die retrograd eine zu Teilen der fos mRNA komplementäre mRNA (anti-sense fos = sof) transkribierten bzw. es wurden synthetische Oligonukleotide transfiziert, die komplementär zu den ersten fünf Kodons der fos mRNA waren (sof-Pentadecanukleotide).

In allen Fällen wurde als Indikatorgen ein Chloramphenicol-Acetyltransferase Expressionsvektor benutzt, der als regulatorische Sequenzen entweder Teile des humanen Kollagenase Promoters (Abb. 13) oder den c-fos Promoter (Abb. 14) enthielt. Diese beiden Regulationssequenzen waren für meine Zwecke vielversprechend, da sie auf eine Vielzahl extrazellulärer Signale mit einer Aktivierung der Transkription antworten. Die Induktion des c-fos Promoters geschieht sehr schnell, die des Kollagenase Promoters verzögert, was auf verschiedene Mechanismen der Aktivierung hindeutet. Diese CAT-Vektoren wurden transient in die Zellen transfiziert und die Promoter Aktivität unter dem Einfluß des betreffenden Onkogens durch die Bestimmung der CAT-Aktivität in einem Enzymtest ermittelt. In einigen Experimenten wurde parallel dazu die mRNA Menge des transfizierten CAT Gens oder des endogenen fos Gens bestimmt.



## fos - CAT Konstrukt

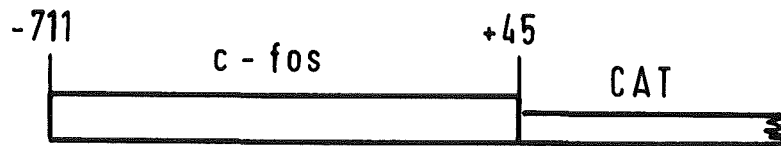


Abb. 14: Das bakterielle CAT-Gen unter der Kontrolle des humanen c-fos Promoters.

Der c-fos Promoter von -711 (Xho I) bis +45 (Not I, umgewandelt in eine Xba I Schnittstelle) (Nummerierung nach Treisman, 1985) wurde in die Polyklonierungsstelle von pBLCAT 3 (Luckow und Schütz, 1987) inseriert. Konstrukt kloniert von M. Büscher, genaue Beschreibung in Büscher et al., in Vorbereitung.

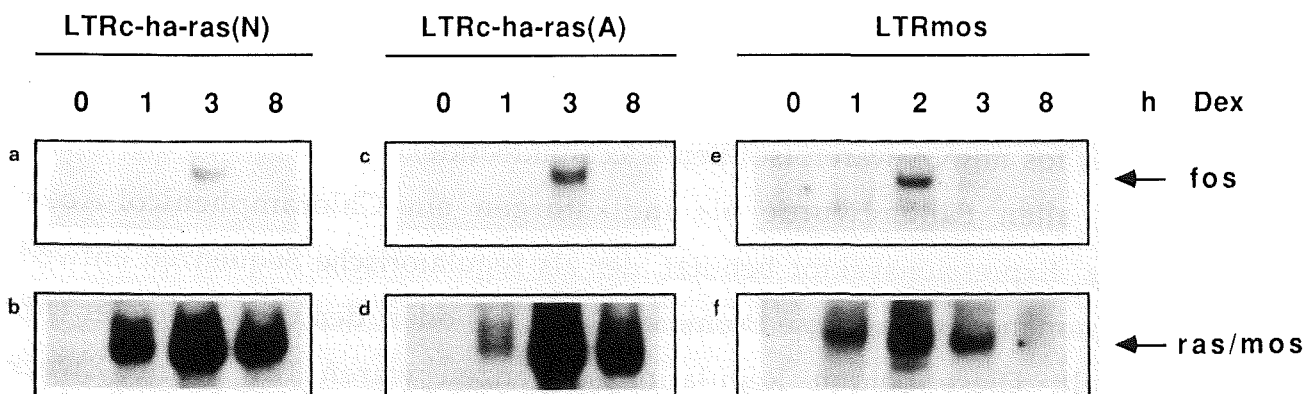


Abb. 15: fos mRNA Induktion durch Onkogene.

Verschiedene NIH 3T3 Zellklone mit hormoninduzierbaren Onkogenen wurden mit Dexamethason (vgl. Abb. 4) inkubiert und danach zu den angegebenen Zeitpunkten poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert. Je 5 µg RNA wurde auf Nitrozellulose transferiert ("Northern Blot") und mit einer radioaktiven v-fos Sonde (vgl. Abb. 4) hybridisiert (a, c, e). Das resultierende Signal ist indikativ für die 2,2 kb große fos mRNA. Parallel dazu wurden die gleichen poly(A)<sup>+</sup> RNAs auf die gleiche Weise hybridisiert mit ras (b, d) bzw. mos (f). Hier dienten als Sonden ein 6,6 kb BamHI Fragment aus pc-ha-ras(A) (entspricht T24-C3 in Santos et al., 1984) bzw. ein Xba I/HindIII v-mos spezifisches Fragment aus pMSV-31 (Papkoff et al., 1981). Der richtige Start der Transkription von LTRc-ha-ras(A) sowie LTRmos wurde durch S-1 Kartierung bestätigt (für ras vgl. Abb. 18, für mos nicht gezeigt, s.a. Jaggi et al., 1986).

In den folgenden Tabellen sind jeweils die Werte eines einzelnen Experiments angegeben, die repräsentativ für eine Serie gleichartiger Experimente sind. Die Experimente wurden mindestens dreimal, z.T. bis zu zehnmal, wiederholt (Ausnahme s. Tab.6). Durch Verwendung unterschiedlicher Präparationen des selben Plasmids sowie durch den Gebrauch der gleichen, aber nicht immer der selben Lösungen, ergaben sich unterschiedliche Transfektionseffizienzen (DNA-Aufnahme) und daraus resultierend unterschiedliche Absolutwerte der CAT Aktivität. Die ermittelten Induktionsfaktoren jedoch waren stets ähnlich.

### 1. Der c-fos Promoter wird durch verschiedene (Proto-)Onkogene aktiviert

Das fos Proto-Onkogen wird durch eine Vielzahl biochemisch verschiedener Signale induziert (Verma, 1987; Curran und Morgan, 1988). Durch die Lokalisation seines Genprodukts im Zellkern ist es ein Kandidat für ein am Ende einer Signaltransferkette gelegenes Glied. Wären andere (Proto-)Onkogene Komponenten derselben Kette, würde man erwarten, daß ihre Aktivierung das fos Gen induziert. Ich untersuchte daher, ob die Expression von bestimmten (Proto-)Onkogenen das fos Gen induzieren kann.

Induktion der mit dem MMTV-LTR fusionierten Onkogene ras oder mos (LTRc-ha-ras(N bzw. A) und LTRmos) durch Dexamethason in stabil transfizierten NIH3T3 Zellen führt zu einer transienten Zunahme der endogenen fos mRNA nach 2-3 Stunden (Abb. 15 a,c,e). Obwohl die ras und mos mRNA (Abb. 15b,d,f) und das entsprechende Protein (vgl. Jaggi et al., 1986) für die Dauer der fos Expression erhöht bleibt, kehrt die Menge der fos Transkripte wieder auf das Ausgangsniveau zurück: nach 8 Stunden ist keine fos mRNA mehr nachweisbar. In NIH3T3 Zellen ohne hormoninduzierbares Onkogen wurde keine Erhöhung der fos mRNA durch Dexamethason gefunden (nicht gezeigt).

Die Aktivität eines transient transfizierten CAT Gens unter der Kontrolle des c-fos Promoters (Abb. 14) konnte ebenfalls durch verschiedene Onkogene deutlich erhöht werden: in Zellen mit hormoninduzierbarem ras oder mos Onkogen erhöhte Dexamethason-Gabe die CAT-Aktivität auf das 3-5 fache (Tab. 1 A-D). Bei Kotransfektion von ras, trk, src oder myc erhöhte sich die Aktivität auf bis zu 10fach (Tab. 1, E-M). Interessanterweise bewirkt hier die aktivierte (transformierende) Version des ras Gens (c-ha-ras(A)) eine stärkere Induktion des

		CAT-Aktivität	Induktionsfaktor
hormoninduzierbare Onkogene			
	Dex		
A.	LTRc-ha-ras(A)	- 1190 + 6230	- 5,2
B.	LTRc-ha-ras(N)	- 2460 + 10460	- 4,3
C.	LTRmos	- 3150 + 9510	- 3,0
D.	Ko (ohne Onkogen)	- 300 + 340	- 1,1
konstitutiv exprimierte Onkogene			
E.	pc-ha-ras(A)	5859	10,3
F.	pc-ha-ras(N)	2800	4,9
G.	psrc	2950	5,2
H.	ptrk	1213	2,1
I.	pBR322 (Ko)	567	-
-----			
K.	pSVc-myc	1270	4,2
L.	pSVv-myb	292	1,0
M.	pSV (Ko)	304	-

Tab. 1: Aktivierung des fos Promoters durch Onkogene.

A-D: 2 ug fos Cat + 8 ug pBR322 (Scutcliffe, 1978) als Träger-DNA wurden transient in die LTRc-ha-ras(N bzw A) und LTRmos Zellklone transfiziert. Als Kontrolle dienten NIH 3T3 Zellen. 16 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium ersetzt durch DMEM mit 0,5 % FCS und zur Hälfte der Schalen  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason (vgl. Abb. 4) gegeben. Nach 30 Stunden wurden die Zellen geerntet.

E-M: 2ug fosCAT + 8 ug onkogen-exprimierendes Plasmid wurden transient in 3T3 Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden wie A-D, jedoch ohne Dexamethason, behandelt. Als Kontrollplasmide dienten die jeweiligen Vektoren ohne Onkogen: für E-H: pBR322, für K u. L: pSV (ist ein Plasmid mit SV40 Promoter sowie Splice- und Adenylierungssignal).

CAT-Aktivität angegeben in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ .

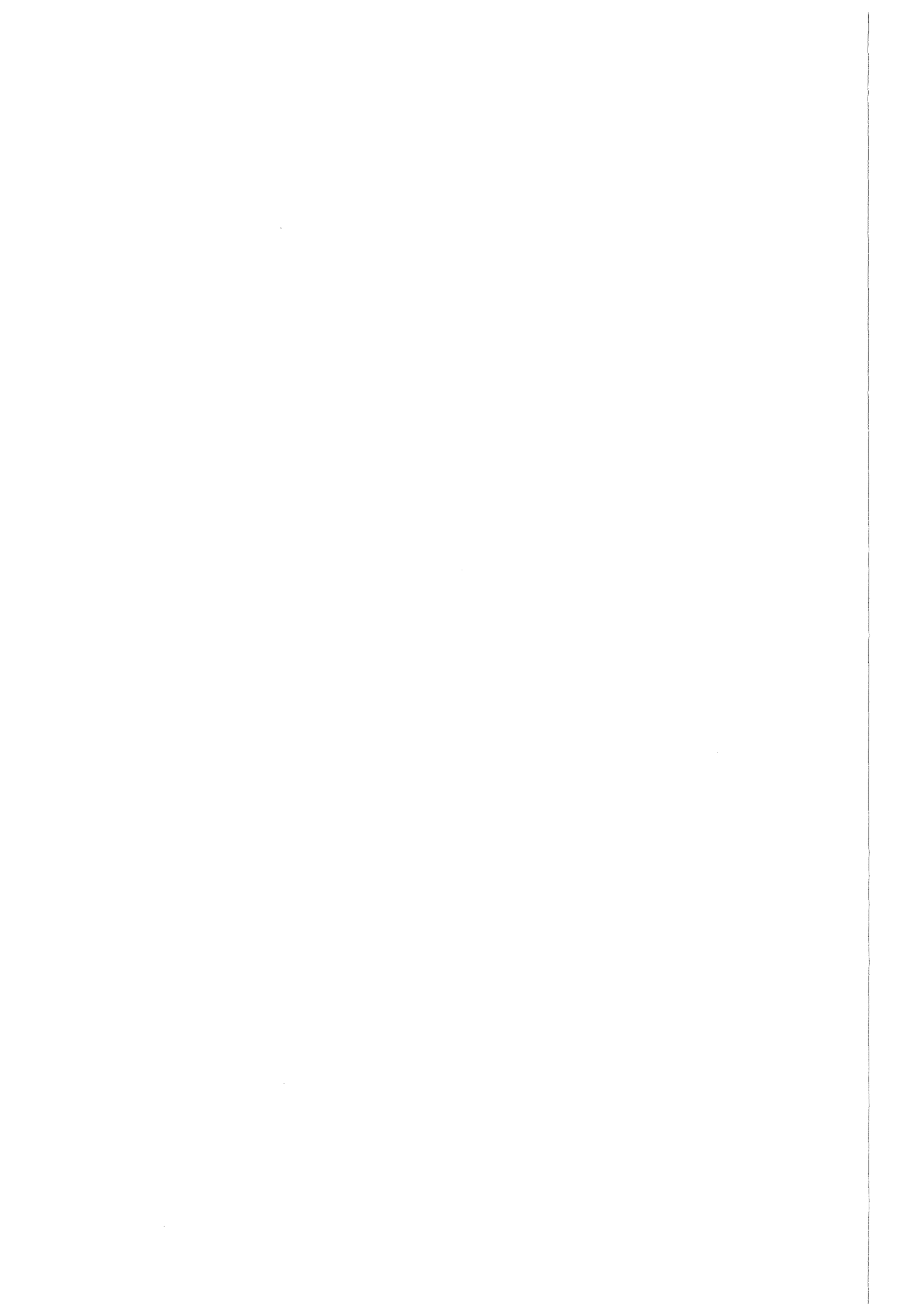
fos Promoters als das normale ras (c-ha-ras(N)) (Tab 1, E). In scheinbarem Gegensatz dazu ist die gleichstarke fosCAT-Aktivität in den LTRc-ha-ras(A) und LTRc-ha-ras(N) enthaltenden Zellen (vgl. Tab. 1, A u. B). Jedoch handelt es sich hier um Einzelklone, die bezüglich der Kopienzahl und der chromosomalen Integrationsorte der stabil transfizierten LTR-ras Konstrukte stark unterschiedlich sein können. Außerdem sind die LTR Promotoren in den beiden Zellklonen unterschiedlich lange aktiv, was in einer unterschiedlichen Menge an ras Protein resultiert (Jaggi et al., 1986). Kotransfektion des viralen oder zellulären myb Gens beeinflusst den fos Promoter nicht (Tab. 1, L; nur gezeigt für v-myb).

Ein Einfluß von Onkogenprodukten auf den fos Promoter wurde kürzlich auch in anderen Laboratorien beobachtet: Die Injektion von ras Protein in 3T3 Zellen induzierte den fos Promoter (Stacey et al., 1987). Kotransfektionsexperimente zeigten eine Transaktivierung des c-fos Promoters durch das Onkoprotein E1A des Adenovirus (Sassone-Corsi und Borelli, 1987).

Meine Ergebnisse zeigen, daß Onkogene mit verschiedenen biochemischen Funktionen die durch extrazelluläre Signale bewirkte fos Induktion nachahmen können: die erhöhte Menge an Onkoprotein ras, src, mos, trk oder myc führt zur Aktivierung des fos Promoters, ohne daß andere extrazelluläre Signale notwendig wären.

## 2. fos und andere (Proto-)Onkogene aktivieren den Kollagenase Promoter über das TRE

Die Kollagenase ist wie fos ein Gen, das durch verschiedene extrazelluläre Signale induziert werden kann (Angel et al., 1987b; Herrlich et al., 1988). Im Gegensatz zu fos, das innerhalb weniger Minuten synthetisiert wird, ist seine Expression nach Stimulation stark verzögert und von vorheriger Proteinsynthese abhängig. Es bot sich daher an zu untersuchen, ob die Expression der Kollagenase durch fos induziert werden kann. Sollte dies der Fall sein, wären dann jene Onkogene, die den fos Promoter aktivieren, ebenfalls Kandidaten für die Kollagenase Induktion.



## SV-fos Konstrukte

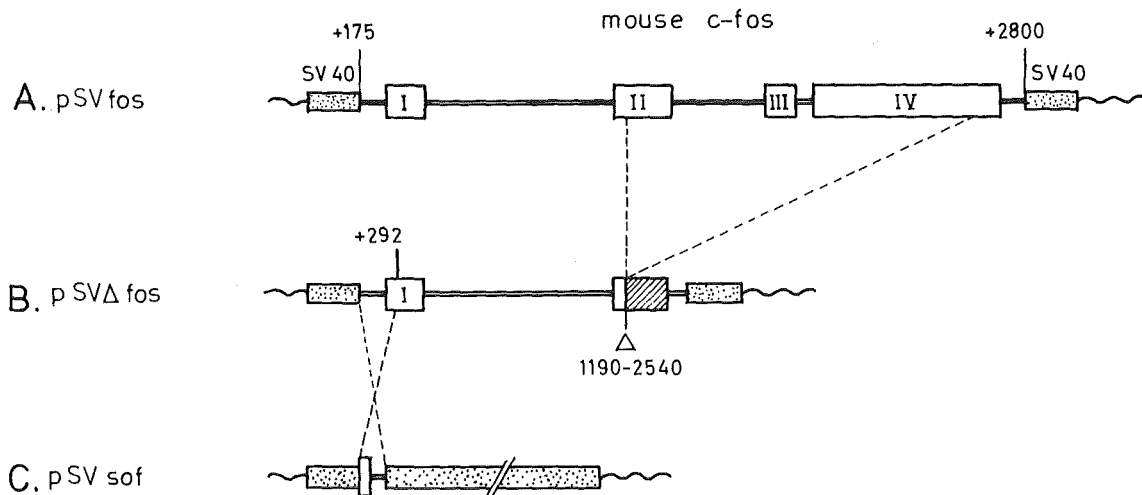


Abb. 16: Konstitutiv exprimierbare fos Konstrukte.

Das c-fos Gen der Maus wurde fusioniert mit dem frühen Promoter des SV40. A: das c-fos BamHI Fragment mit SV40-Polyadenylierungssignal aus pLTRfos40 (vgl. Abb. 2D) wurde vor den SV40 Promoter (Position 185-5107 nach Reddy et al., 1978) in die Bgl II- (Pos. 5107) bzw BamHI- (Pos. 2469) Schnittstelle von pKSV-10 (Pharmacia) kloniert. B: Aus pSVfos wurden die c-fos Sequenzen von Pos. 1190 bis 2540 deletiert (vgl. Abb. 2A). C: Zur Konstruktion von pSVsof wurde zunächst ein 2,6 kb BamHI (Pos. 175) / Sal I (Pos. 2800) c-fos Fragment aus pSVfos unterkloniert in die BamHI/Sal I Schnittstellen von pBR 322 (Scutcliffe, 1978). Dann wurde das 2,4 kb Bgl II / BamHI Fragment mit SV40 Splice- und Polyadenylierungssignal aus pKSV-10 in die BamHI Schnittstelle vor das unterklonierte c-fos Fragment inseriert (Bgl II Schnittstelle ligiert mit BamHI von c-fos). Das resultierende Konstrukt wurde mit Ava I an Position 292 des c-fos aufgeschnitten, die Schnittstellen aufgefüllt, dann mit BamHI das 2,5 kb Fragment mit 117 Basenpaaren c-fos sowie Splice- und Polyadenylierungssignal von SV40 isoliert und in die Bgl II/BamHI Schnittstellen von pKSV-10 inseriert (die Bgl II Schnittstelle wurde zuvor aufgefüllt).

Nummerierung der c-fos Sequenzen nach Van Beveren et al., 1983. I-IV repräsentieren die Exons des c-fos Gens; gestrichelt: Rest des IV. Exons (aus dem Leseraster); gepunktet: SV40 Sequenzen.

Ich brachte das KollagenaseCAT Konstrukt p(-1200/+63) (Abb. 13 A) zusammen mit dem konstitutiv fos exprimierenden Vektor pSVfos (Abb. 16A) in murine Fibroblasten ein und bestimmte die resultierende CAT - Aktivität gegenüber einer Kontrolle (pSVΔfos). In Gegenwart von fos Protein zeigt der Kollagenase Promoter eine 6fach höhere CAT Aktivität (Tab. 2 O u. P, rechte Spalte). Der Kollagenase Promoter war also durch fos induzierbar. Nach Transfektion des KollagenaseCAT Konstrukts in Zellen, die ein hormoninduzierbares ras, mos oder fos Onkogen besaßen, resultierte durch Hormongabe ebenfalls eine erhöhte Aktivität des Kollagenase Promoters (Tab. 2 A-E).

Kollagenase-Promotor		p(-73/-65) <sub>5</sub> tk		p-1200/+63	
Plasmid		CAT-Aktivität	Induktionsfaktor	CAT-Aktivität	Induktionsfaktor
hormoninduzierbare Onkogene					
	Dex				
A.	LTRc-ha-ras(A)	-	380	-	158
		+	2780	7,3	1733
B.	LTRc-ha-ras(N)	-	630	-	120
		+	5670	9	3845
C.	LTRmos	-	1580	-	640
		+	4540	2,9	3334
D.	LTRfos	-	320	-	210
		+	771	2,4	376
E.	Ko (ohne Onkogen)	-	120	-	97
		+	104	0,9	58
konstitutiv exprimierte Onkogene					
F.	pc-ha-ras(A)		554	5,2	478
G.	pc-ha-ras(N)		693	6,5	619
H.	psrc		578	5,4	n.d.
I.	ptrk		249	2,3	n.d.
K.	pBR322 (Ko)		107	-	28
-----					
L.	pSVc-myc		127	3,0	n.d.
M.	pSVv-myb		33	0,8	n.d.
N.	pSV (Ko)		42	-	n.d.
-----					
O.	pSVfos		198	15	109
P.	pSV $\Delta$ fos		13	-	18
-----					
Q.	pFBRfos		1167	18	n.d.
R.	pFBRfos $\Delta$		65	-	n.d.

transient transfiziertes Plasmid	CAT-Aktivität		Induktionsfaktor
	ohne Dex	mit Dex	
A. p-1200/+63 (in pBLCAT3)	158	1733	11
B. p -517/+63 "	161	1616	10
C. p -73/+63 "	152	316	2
D. p -66/+63 "	80	87	1,1
E. pBLCAT3 (Ko)	68	73	1,1
F. p -517/-42tk (in pBLCAT2)	170	2042	12
G. p -517/-73tk "	75	85	1,1
H. p -73/-42tk "	181	476	2,6
I. p (-73/-65) <sub>5</sub> tk "	473	3465	7,3
K. pBLCAT2 (Ko)	73	82	1,1

**Tab. 3:** Das Proto-Onkogen ras aktiviert den Collagenase Promoter über das TRE. je 2 ug verschiedener Kollagenase Promoter Mutanten (A-D u. F-I) + 8 ug pBR322 als Träger Plasmid wurden transient in LTRc-ha-ras(N) enthaltende 3T3 Zellen transfiziert und auf Induktion durch hormoninduziertes ras Onkogen getestet. Die weitere Behandlung erfolgte wie in Tab. 1 A-D beschrieben. CAT-Aktivität angegeben in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ .

**Tab. 2:** Induktion des Kollagenase Promoters durch Onkogene.

A-D: stabil ein hormoninduzierbares Onkogen enthaltende 3T3 Zellen wurden mit 2 ug p(-73/-65)<sub>5</sub>tk oder p(-1200/+63) und jeweils 8 ug pBR322 als Träger-DNA transient transfiziert. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Tab. 1 A-D beschrieben. Als Kontrolle dienten NIH 3T3 Zellen ohne hormoninduzierbares Onkogen.

F-R: 2 ug p(-73/-65)<sub>5</sub>tk oder p(-1200/+63) und jeweils 8 ug onkogen-exprimierendes Plasmid wurden transient in 3T3 Zellen kotransfiziert. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Tab. 1 E-M beschrieben. Als Kontrollplasmide dienten die jeweiligen Vektoren ohne Onkogen (pBR322 für F-I und pSV für L-N, vgl. a. Tab. 1 E-M) bzw. die Vektoren mit einem funktionell inaktiven Onkogen (pSV $\Delta$ fos für O; pFBRfos $\Delta$  für Q).

n.d. = nicht durchgeführt. CAT-Aktivität angegeben in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ .



	p(-73/-65) <sub>5</sub> tk	Induktions- faktor	pfosCAT	Induktions- bzw. Repressions- faktor
<u>A. GM637</u>				
pSVfos	832	11,1	69	0,2
pSVΔfos (Ko)	75	-	340	-
-----				
pFBRfos	1470	8,9	105	0,7
pFBRfosΔ (Ko)	166	-	142	-
-----				
pc-ha-ras(A)	1698	12,0	n.d.	
pBR322 (Ko)	141	-	n.d.	
<u>B. NFB München</u>				
pSVfos	330	3,7	35	0,7
pSVΔfos (Ko)	90	-	50	-
-----				
pFBRfos	1687	9,1	n.d.	
pFBRfosΔ (Ko)	185	-	n.d.	
-----				
pc-ha-ras(A)	3475	17	n.d.	
psrc	5680	28	n.d.	
pBR322 (Ko)	203	-	n.d.	
-----				
pSVc-myc	4222	24	3405	11,4
pSVv-myb	169	1,0	n.d.	
pSV (Ko)	176	-	298	-
<u>C. HeLa</u>				
pSVfos	2046	10,2	n.d.	
pSVΔfos (Ko)	200	-	n.d.	
-----				
pFBRfos	5897	14	120	0,8
pFBRfosΔ (Ko)	420	-	150	-
-----				
pSVc-myc	670	2,9	n.d.	
pSVv-myb	218	1,0	n.d.	
pSV (Ko)	229	-	n.d.	
-----				
pc-ha-ras(A)	n.d.		2527	12,2
pBR322 (Ko)	n.d.		207	-
<u>D. F9 tk<sup>-</sup></u>				
	p(-517/-42)tk			
pSVfos	110	3,7	n.d.	
pSVΔfos (Ko)	30	-	n.d.	
-----				
pc-ha-ras(A)	260	4,3	n.d.	
pBR322	60	-	n.d.	

Zur Analyse, über welche Sequenzen die Aktivierung im Kollagenase Promoter vermittelt wurde, transfizierte ich verschiedene Deletionsmutanten des Kollagenase Promoters (Abb. 13) transient in NIH 3T3 Zellen, die stabil mit pLTRc-ha-ras (N) transfiziert waren. Durch Gabe von Dexamethason wurde ermittelt, welche Mutanten noch auf die ras Expression ansprachen. Tab. 3 zeigt, daß nur jene Teile des Kollagenase Promoters durch die ras Expression aktiviert wurden, die noch das TPA - regulierte Element (TRE, Angel et al., 1987) besitzen (vgl. Abb. 13). Ein Konstrukt, das im wesentlichen nur noch das TRE enthält (p(-73/-42)tk), ist noch zweifach induzierbar. Das pentamerisierte TRE (p(-73/-65)<sub>5</sub>tk) vermittelt eine mehr als 7fache Induktion (Tab. 3 I). In der Folge wurde nun das Konstrukt p(-73/-65)<sub>5</sub>tk verwendet, und es zeigte sich, daß die Onkogene fos, ras, mos, src, trk und myc alle die Induktion der Kollagenase über das TRE bewirken (Tab. 2). Das myb Onkogen, das bereits den fos Promoter nicht aktiviert hatte, zeigte auch hier keinen aktivierenden Effekt auf den Kollagenase Promoter.

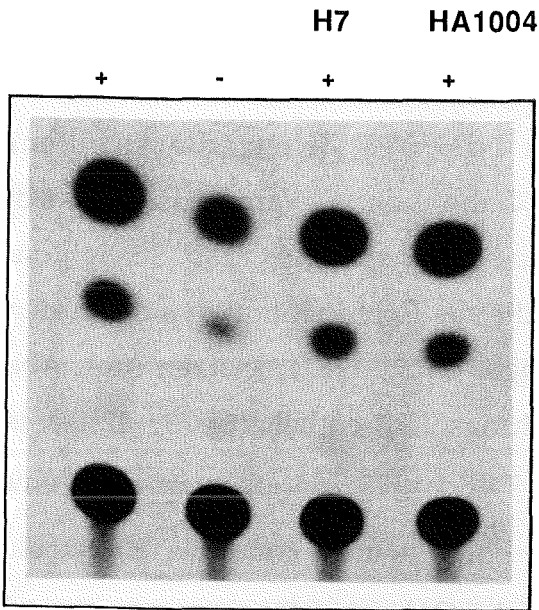
Bei Kotransfektion des KollagenaseCAT Vektors mit Onkogen - exprimierenden Plasmiden in die Zelllinien F9 (murine embryonale Teratokarzinomzellen), GM637 (durch SV40 immortalisierte humane Fibroblasten), HeLa (humane Cervixkarzinomzellen) und NFB München (primäre humane Fibroblasten) ergaben sich im wesentlichen die gleichen Effekte, die Induktionsfaktoren waren jedoch zum Teil unterschiedlich (Tab. 4, linke Spalte).

Tab. 4: Induktion des Kollagenase Promoters und Induktion bzw. Repression des fos Promoters durch Onkogene in verschiedenen Zelllinien.

Je 2 ug p(-73/-65)<sub>5</sub>tk bzw. fosCAT + 8 ug onkogen-exprimierendes Plasmid wurden transient kotransfiziert. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Tab. 1 E-M für 3T3 Zellen beschrieben. Für F9 Zellen wurde als KollagenaseCAT Plasmid p(-517/-42)tk verwendet. Die jeweiligen Kontrollplasmide sind in Tab. 2 F-R beschrieben.

n.d. = nicht durchgeführt. CAT-Aktivität angegeben in pmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>.

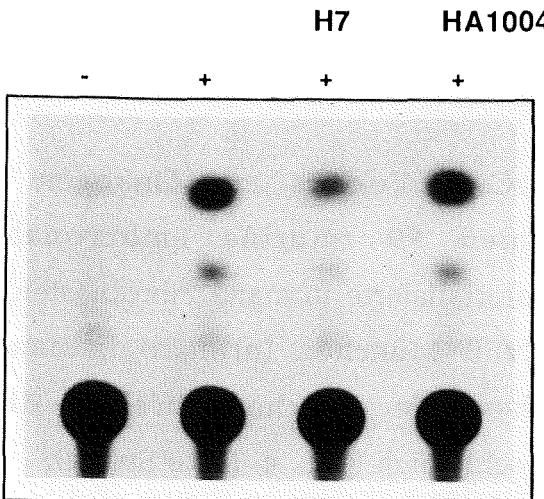
**A. LTRmos**



Dex

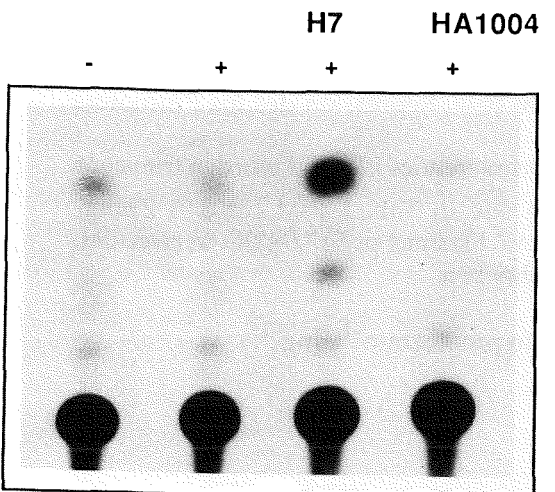
Proteinkinase Inhibitor	Dex	LTRc-ha-ras(A)	LTRmos	NIH3T3 (Ko)
-	-	140	290	115
-	+	1100	1490	75
H7	+	410	1130	430
HA1004	+	1060	1580	60

**B. LTRc-ha-ras(N)**



Dex

**C. NIH3T3 (Ko)**



Dex

**Abb. 17:** Beteiligung von Proteinkinasen an der Kollagenase-Induktion durch Onkogene.

Je 2  $\mu$ g p(-1200/+63) (vgl. Abb. 13) zusammen mit 6  $\mu$ g pBR322 (Scutcliffe, 1978) als Träger Plasmid wurden in LTRmos-, LTRc-ha-ras(N)- oder NIH 3T3 Zellen transfiziert. Nach 14 Stunden wurde das Medium erneuert und zu einem Teil der Zellen Dexamethason ( $2 \times 10^{-7}$ ) und je 50  $\mu$ M H7 oder HA1004 gegeben. Nach 30 Stunden wurden die Proteine isoliert und mit je 300  $\mu$ g Proteinextrakt eine Bestimmung der CAT-Aktivität durchgeführt. A und B zeigt die Erhöhung der KollagenaseCAT-Aktivität durch Dexamethason Induktion des LTRmos bzw. LTRc-ha-ras(N) Gens. Diese Erhöhung wird durch HA1004 nicht beeinflusst. Sie wird jedoch in LTRc-ha-ras(N) Zellen durch H7 stark reduziert. Kontrollzellen (C) zeigen eine Repression des Kollagenase Promoters durch Dexamethason, die auch in Gegenwart von HA1004 stattfindet. Im Gegensatz dazu führt H7 zu einer Erhöhung der Aktivität des Kollagenase Promoters.

Die CAT-Aktivität in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  ist zusammengefaßt in obiger Tabelle dargestellt.

Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (Rozenfurt, 1986). Ich verwendete spezifische Proteinkinase - Inhibitoren und untersuchte, ob sie mit der Induktion der Kollagenase durch Onkogene interferierten: H7 ist ein Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinasen und der Proteinkinase C (Kawamoto und Hidaka, 1984; Hidaka et al., 1984). HA1004 hemmt selektiv cAMP-abhängige Proteinkinasen (Hidaka et al., 1984). H7 blockierte die Induktion des Kollagenase Promoters durch das ras Onkogen, jedoch nicht die Induktion durch das mos Onkogen (Abb. 17A,B). In Kontrollzellen führte H7 zu einer deutlichen Stimulation des Kollagenase Promoters (Abb. 17C). HA1004 zeigte in allen Zellen keinen Effekt. Da in meinem System jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, ob HA1004 tatsächlich seine spezifische blockierende Wirkung entfaltetete, kann aus diesem Experiment zwar nicht die Spezifität der beteiligten Proteinkinase(n) bestimmt werden, es ermöglicht aber den Schluß, daß an der Induktion der Kollagenase durch das ras Protein Proteinkinase(n) beteiligt sind. Das mos Protein ist wohl eine Komponente des Signaltransfers, die unterhalb der Mitwirkung von Protein Kinase C bzw. cAMP-abhängigen Proteinkinasen lokalisiert ist. Die Induktion der Kollagenase durch Hemmung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen bzw. der Proteinkinase C in Kontrollzellen ließe sich durch die Annahme erklären, daß solche Enzyme vielleicht an einer negativen Kontrolle des Kollagenase Promoters beteiligt sind. Ein negativer Effekt auf die Expression der Kollagenase wurde z.B. für Dexamethason nachgewiesen (Bauer et al., 1985; vgl. a. Tab. 2E und Abb. 17).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die hier verwendeten Onkogenprodukte Bestandteile von Signalketten sind, die letztendlich im Zellkern zur Aktivierung des Kollagenasegens führen: Ich zeigte, daß Onkoproteine, die in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind (ras und src an der Innenseite der Zytoplasmamembran; mos und trk im Zytoplasma; myc und fos im Zellkern) zur Aktivierung des Kollagenase Promoters im Kern führen können. Notwendig und ausreichend für die Vermittlung dieser Transaktivierung ist das TRE.

transient ko-transfiziertes Plasmid		pKSV10 (Ko)		pSVsof	
stabil transfiziertes Plasmid	Induktor	CAT-Aktivität	Induktionsfaktor	CAT-Aktivität	Induktionsfaktor
A. LTRc-ha-ras(A)	Ko	305	-	80	-
	Dex	1262	4,1	130	1,6
	TPA	1280	4,2	130	1,6
B. LTRc-ha-ras(N)	Ko	832	-	277	-
	Dex	5053	6,1	668	2,4
	TPA	3828	4,6	587	2,1
C. LTRmos	Ko	353	-	88	-
	Dex	769	2,2	97	1,1
	TPA	634	1,8	59	0,7
D. Ko (ohne Onkogen)	Ko	412	-	130	-
	Dex	330	0,8	128	1,0
	TPA	1063	3,2	184	1,4

Tab. 5: Anti-sense fos RNA inhibiert die Onkogen- und TPA- induzierte CAT-Expression von p(-73/-65)<sub>5</sub>tk.

Je 2 ug p(-73/-65)<sub>5</sub>tk wurden mit 8 ug pSVsof oder einem Kontrollplasmid (pKSV-10) transient in 3T3 Zellen, die ein hormoninduzierbares Onkogen enthielten, kotransfiziert. Als Kontrollzellen dienten 3T3 Zellen ohne hormoninduzierbares Onkogen. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Tab. 1 A-D beschrieben. TPA: 60 ng/ml. Der Vergleich der rechten Spalte (pSVsof) mit den entsprechenden Werten der linken Spalte (pKSV-10) zeigt die Hemmung der Onkogen (Dex)- bzw. TPA- induzierten CAT-Expression.

CAT-Aktivität angegeben in pmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>.

Da mehrere Gene funktionelle TRE oder TRE - ähnliche Sequenzen enthalten, würde man erwarten, daß sie in ähnlicher Weise auf Onkoproteine ansprechen. Tatsächlich wurde gezeigt, daß die Promotoren des Polyoma "Enhancers" und des Transin Gens - beide mit TRE - auf erhöhte Onkogenexpression, inklusive ras, ansprechen (Matrisian et al., 1986; Wasylyk et al., 1987).

### 3. fos Expression ist notwendig für die Induktion der Kollagenase durch (Proto-)Onkogene und TPA

Phorbolester und verschiedene Onkoproteine aktivieren die Transkription des fos Gens. Die selben Agenzien und auch das fos Gen selbst stimulieren den Kollagenase Promoter über das selbe Element (TRE). Diese Hinweise führten zu der Hypothese, daß fos ein notwendiges Zwischenprodukt in jenen Signalwegen sein könnte, die zur Aktivierung der Kollagenase führen. Um dies zu untersuchen, wurde selektiv die fos Expression blockiert und dann getestet, ob der Kollagenase Promoter noch induzierbar war. Eine Hemmung der fos Aktivität wurde dadurch erzielt, daß zur fos mRNA komplementäre Sequenzen (sof) in die Zellen eingebracht wurden. Vermutlich bilden solche "anti-sense" Sequenzen Hybride mit der mRNA und verhindern dadurch die Translation.

Bei gleichzeitiger Transfektion eines konstitutiv sof mRNA exprimierenden Plasmids (pSVsof, Abb. 16C) war die Induktion des Kollagenase Promoters durch TPA sowie durch hormoninduziertes ras oder mos Onkogen deutlich gehemmt (Tab. 5). Diese Repression durch sof drückte die basale und die induzierte Höhe der CAT Aktivität noch unter die in unstimulierten Zellen nachgewiesene Aktivität. Bei Kotransfektion des gleichen Plasmids ohne sof Sequenzen (pKSV10) war diese Inhibition nicht zu sehen (Tab. 5).

ko-transfizierte Plasmide	35°C	40,2°C
in rat-1/ts src		
A. p(-73/-65) <sub>5</sub> tk + Ko	690	390
B. p(-73/-65) <sub>5</sub> tk + pSVsof	290	250
C. pBLCAT2 + Ko	150	130
D. pBLCAT2 + pSVsof	130	120
-----		
in rat-2 (Ko)		
E. p(-73/-65) <sub>5</sub> tk + Ko	325	330
F. pBLCAT2 + Ko	175	170

Tab. 6: Anti-sense fos RNA hemmt die durch ein temperatursensitives src Onkogen induzierte CAT-Expression von p(-73/-65)<sub>5</sub>tk.

Je 2 ug p(-73/-65)<sub>5</sub>tk wurden mit 10 ug pSVsof oder pKSV-10 (Kontrolle) transient in rat-1 Zellen, die ein temperatursensitives src Onkogen exprimierten, kotransfiziert. Die Transfektion erfolgte für 12 Stunden in 40,2° C (nicht-permissive Temperatur). Dann wurde das Medium durch DMEM mit 0,5 % FCS ersetzt und ein Teil der Zellen in die permissive Temperatur (35° C) überführt. Nach 30 Stunden wurden die Zellen geerntet. A. zeigt die Induktion von p(-73/-65)<sub>5</sub>tk durch Transfer in die permissive Temperatur. B. zeigt die Hemmung dieser Induktion durch anti-sense fos (pSVsof). C u. D: das CAT Gen ohne Kollagenase Sequenzen zeigt keine Änderung durch Aktivierung des src Onkogens. E u. F: In Zellen ohne temperatursensitivem Onkogen findet keine Aktivierung von KollagenaseCAT durch Temperaturwechsel statt. (Dieses Experiment wurde von mir im Labor von Bob Friis, Bern, durchgeführt. Wegen des erheblichen technischen Aufwandes wurde es nur einmal durchgeführt. Das Resultat fügt sich in den Rahmen, der durch die anderen Transfektionsexperimente (Tab. 2, 4, 5) abgesichert wurde.)

CAT-Aktivität angegeben in pmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>.

In einer Ratten-Zelllinie, die mit einem temperatursensitiven src Onkogen (ts-src) exprimierenden Virus infiziert war (Fincham et al., 1982), wurde die Induktion des Kollagenase Promoters (p(-73/-65)<sub>5</sub>tk) nach Einbringen der Zellen in die permissive Temperatur ebenfalls durch pSVsof Transfektion reduziert (Tab. 6).

Die Kotransfektion von sof Pentadekanukleotiden, die komplementär zu den ersten fünf Kodons der fos mRNA waren, verringerten die ras induzierte Kollagenase Aktivität in NIH3T3 Zellen (nicht gezeigt).

TPA, ein Phorbolster, von dem gezeigt war, daß er sowohl das fos Gen als auch das Kollagenase Gen induzieren kann, wirkt ebenfalls über fos: die Induktion des Kollagenase Promoters (p(-73/-65)<sub>5</sub>tk) durch TPA ist in Gegenwart von sof deutlich gehemmt (Tab. 5).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivierung der Kollagenase durch ras, mos, src oder TPA von vorheriger fos Expression abhängt. Die Basalaktivität des Kollagenase Promoters in uninduzierten Zellen, die ebenfalls durch sof Expression verringert werden kann (Tab. 5), reflektiert sehr wahrscheinlich die geringe, aber doch vorhandene fos Expression in diesen Zellen (Bravo et al., 1986). Die Hemmung der Kollagenase Induktion war in verschiedenen Experimenten unterschiedlich stark, was wohl auf die unterschiedliche Mengen an sof mRNA zurückzuführen ist.



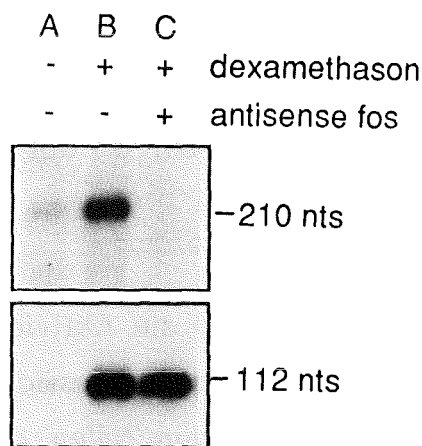


Abb. 18: Die ras-abhängige Kollagenase Expression benötigt fos.

Zellklone mit LTRc-ha-ras(N) wurden zu  $3 \times 10^6$  Zellen pro 15 cm Petrischale angesetzt und am nächsten Tag mit 5 ug p(-73/-65)<sub>5</sub>tk + 20 ug pKSV-10 (A, B; Kontrolle) oder + 20 ug "anti-sense" fos exprimierendem Plasmid pSVsof (C) transfiziert. Nach 16 Stunden wurde das Medium gewechselt und ersetzt durch DMEM mit 0,5 % FCS, wobei ein Teil der Zellen  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason erhielt (B, C). Nach 30 Stunden wurde die poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert und eine S-1 Kartierung durchgeführt. Je 5 ug RNA wurde mit einer LTR-spezifischen Sonde (ein 5'-endmarkiertes Eco RI/BamHI Fragment aus pBG102; Ponta et al., 1985) oder einer tk-CAT-spezifischen Sonde (ein 5'-end markiertes Eco RI/Pvu II Fragment aus pBLCAT 2, vgl. Fig. 2 in Angel et al., 1987b) hybridisiert und nach S-1 Behandlung elektrophoretisch aufgetrennt. 112 Nukleotide (nts) sind indikativ für die mRNA vom LTRc-ha-ras(N) Konstrukt, 210 nts repräsentieren die Kollagenase Promoter regulierten Transkripte von p(-73/-65)<sub>5</sub>tk. Dexamethason induziert LTRc-ha-ras(N) (112 nts, A versus B u. C). Die ras Expression wirkt induzierend auf p(-73/-65)<sub>5</sub>tk (210 nts, A versus B). In Gegenwart von sof ist diese Induktion blockiert (210 nts, B versus C).

Zur Untersuchung, ob die Induktion der Kollagenase transkriptionell reguliert wird, führte ich eine S1-Kartierung der mRNA durch (Abb. 18). Hierfür verwandte ich einen Zellklon, der stabil mit dem hormoninduzierbaren ras Onkogen (pLTRc-ha-ras(N)) transfiziert war. Hormongabe induziert drastisch die Menge an LTR-ras Transkripten. Die Transkripte eines transfizierten Kollagenase Promoters (verwandt wurde p-1200/+63 oder p(-73/-65)<sub>5</sub>tk, siehe Abb. 13) sind ebenfalls stark vermehrt, jedoch bei Kotransfektion des pSVsof Konstruktes nicht mehr nachzuweisen (Abb. 18, gezeigt für p(-73/-65)<sub>5</sub>tk). Die TPA Induktion der Transkription vom Kollagenase Promoter wird ebenfalls in Gegenwart von sof gehemmt (nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis dafür, daß die Kollagenase Expression transkriptionell reguliert wird.

Diese Experimente zeigen, daß fos eine notwendige Komponente von Signalketten ist: die Induktion der Kollagenase durch TPA oder die (Proto-)Onkogene ras, mos und src ist stark reduziert, wenn die Expression des endogenen fos durch "anti-sense" fos mRNA (sof) blockiert wird.

#### 4. Der fos Promoter wird durch fos Protein reprimiert

Die Expression des fos Gens ist sehr stringent reguliert: seine Expression nach Induktorgabe ist die erste feststellbare Änderung der Genexpression; seine Abschaltung erfolgt ebenfalls extrem schnell: nach 30 Minuten nimmt die mRNA Menge bereits wieder ab und ist nach 90 Minuten auf den Ausgangswert zurückgekehrt (Greenberg und Ziff, 1984; Curran und Morgan, 1988); das fos Protein wird posttranskriptionell sehr stark modifiziert und hat eine sehr kurze Halblebenszeit (Curran et al., 1984).

Diese Hinweise ließen vermuten, daß fos möglicherweise an der Regulation seiner eigenen Expression beteiligt ist. Um das zu testen, wurde zusammen mit einem fosCAT Konstrukt (Abb. 14) ein Vektor transfiziert, der das fos Gen konstitutiv unter Kontrolle des viralen SV40 Promoters (pSVfos, Abb. 16A) exprimiert. Als Kontrolle diente eine Deletionsmutante, die nur ein verstümmeltes, also inaktives fos Protein synthetisierte (pSVΔfos, Abb. 16B).

ko-transfiziertes Plasmid		CAT-Aktivität	Aktivität des fos Promoters (%)
A. pSV $\Delta$ fos (Ko)		536	100
B. pSVsof		2426	453
C. pSVfos		189	35
-----			
D. pFBRfos $\Delta$ (Ko)		612	100
E. pFBRfos		108	18
-----			
	stabil transfiziertes Plasmid	Dex	
F. LTRfos	-	1100	100
	+	528	48
G. LTRsof	-	1620	100
	+	1910	118
H. NIH3T3 (Ko)	-	300	100
	+	325	108

Tab. 7: fos reprimiert, anti-sense fos induziert die Aktivität des fos Promoters.

A-E: 2 ug fosCAT + 8 ug fos- oder anti-sense fos(sof)- exprimierendes Plasmid bzw. Kontrollplasmid wurden wie in Tab. 1 E-M beschrieben kotransfiziert. B. versus A. zeigt die Aktivierung des fos Promoters in Gegenwart von anti-sense fos, C. versus A. die Repression durch fos. F.-H.: 2 ug fosCAT + 8 ug pBR322 als Träger DNA wurden wie in Tab. 1 A-D beschrieben transient in 3T3 Zellen transfiziert, die ein hormoninduzierbares fos oder sof enthielten. Als Kontrollzellen diente NIH 3T3 Zellen. F. zeigt die Repression des fos Promoters durch Hormoninduktion von LTRfos, G. die schwache, aber reproduzierbare Induktion durch anti-sense fos.

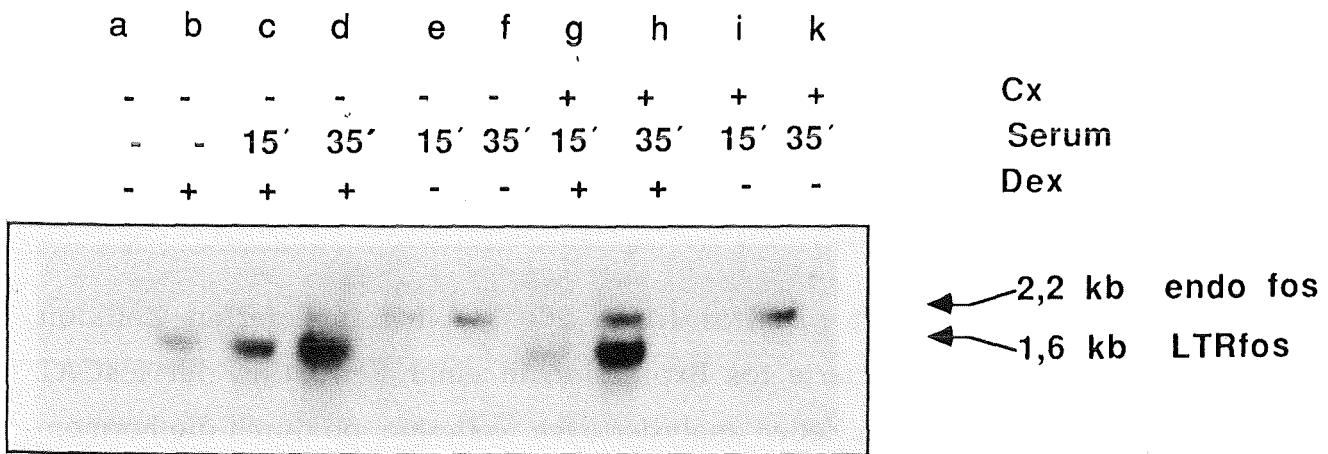
CAT-Aktivität angegeben in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ .

In weiteren Experimenten wurde das "anti-sense" fos Konstrukt (pSVsof, Abb. 16 C) kotransfiziert, um einen möglichen Einfluß des endogenen fos auf fosCAT zu blockieren.

Kotransfektion von pSVfos reprimierte die vom c-fos Promoter gesteuerte CAT Synthese auf etwa ein Drittel, pSV $\Delta$ fos bewirkte keine Änderung (Tab. 7 B,C). Diese Auto-Repression des fos Promoters wurde auch durch virales fos Protein erreicht: Kotransfektion eines viralen fos Gens unter der Kontrolle des FBR Maus Sarkom Virus LTR (pFBRfos, entspricht Konstrukt E300 in Lucibello et al., 1988) hemmt die fosCAT Expression ebenfalls (Tab. 7 D,E). Hier diente als Kontrolle ein virales fos Gen, dessen Protein eine Punktmutation in der DNA Bindungsdomäne besitzt und daher nicht mehr DNA bindend ist (pFBRfos $\Delta$ , entspricht Konstrukt D4 in Lucibello et al., 1988).

Auch in einem mit pLTRfos (Abb. 2C) stabil transfizierten Zellklon resultierte die hormoninduzierte fos Expression in einer Reduktion der fosCAT Aktivität (Tab. 7 F). In diesen Zellen analysierte ich weiterhin, ob durch die hormoninduzierte Expression des fos Gens nicht nur ein transient transfizierter fos Promoter (fosCAT) reprimiert werden kann, sondern ob dieser Effekt auch auf den endogenen c - fos Promoter nachzuweisen war: die Zellen wurden gehungert, dann wurde durch Serumstimulation das endogene c - fos Gen induziert. Dabei wurde in einem Teil der Zellen 90 Min. vor Serumgabe das stabil transfizierte LTRfos Gen durch Dexamethason induziert. Bei vorheriger Stimulation des LTRfos Gens war die Seruminduktion des endogenen c - fos Gens blockiert (Abb. 19). Wurde die Translation der LTRfos mRNA durch Cycloheximid gehemmt, war die serumstimulierte Menge der endogenen fos mRNA ohne und mit Hormon gleich hoch (Abb. 19). Diese Resultate zeigen, daß die Anwesenheit von fos Protein die Induktion des c - fos Promoters reprimiert.

Die transiente Transfektion eines "anti-sense" fos Konstrukts (pSVsof, Abb. 16C) bewirkt die Aktivierung eines kotransfizierten fosCAT Plasmids (Tab.7A,B). Auch die Induktion eines stabil transfizierten LTRsof Konstrukts (entspricht pLTLcfosM.a in Nishikura und Murray, 1987) mit Hormon führte zu einer leichten, aber reproduzierbaren Stimulation eines transient transfizierten fosCAT Konstrukts (Tab. 7G). Dieser geringe Effekt im Vergleich zur Verwendung von pSVsof (Tab. 7B) ist wohl auf die unterschiedliche Stärke der sof - exprimierenden Promotoren zurückzuführen.



**Abb. 19:** fos Protein verhindert die Serumstimulation des c-fos Gens.

Stabil mit LTRfos transfizierte Zellen wurden für 70 Stunden in DMEM mit 0,5 % FCS gehungert, dann mit verschiedenen Kombinationen Dexamethason (Dex,  $2 \times 10^{-7} M$ ), frischem DMEM mit 15 % FCS und Cycloheximid (Cx, 10  $\mu g/ml$ ) behandelt, die poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert und nach "Northern Blot" mit einer fos-spezifischen Sonde (vgl. Abb. 4) hybridisiert. 2,2 kb endo fos repräsentiert mRNA des endogenen c-fos Gens, 1,6 kb ist indikativ für Transkripte des LTRfos Konstrukts. 90 minütige Dex Gabe induziert die Transkription vom LTRfos Konstrukt (a, b). 15 bzw. 35 minütige Serumstimulation führt zur Induktion des endogenen c-fos Gens (e, f). Diese Induktion ist blockiert, wenn 90 Min. vor Serumgabe LTRfos durch Dex induziert wurde (c, d).

Wird der Proteinsynthese-Inhibitor Cx gleichzeitig mit Dex appliziert, wird weiterhin LTRfos mRNA transkribiert (g, h), ebenso erlaubt Cx, gleichzeitig mit Serum gegeben, die Stimulation des endogenen c-fos Gens (i, k). Jedoch ist in Gegenwart von Cx die Serumstimulation des endogenen c-fos nicht mehr durch vorherige Dex Induktion des LTRfos blockierbar (g, h).

Es ist anzunehmen, daß die Expression von *fos* Sequenzen die sehr geringe basale Menge an endogenem *fos* Protein noch weiter reduziert und damit diesen Repressor "aushungert". Als Folge wird der *fos* Promoter aktiv.

Diese Experimente zeigen, daß *fos* sowohl als Aktivator als auch als Repressor wirken kann: es transaktiviert den Kollagenase Promoter und reprimiert die Expression von seinem eigenen Promoter.

Die Resultate des zweiten Teils meiner Arbeit implizieren eine Schlüsselrolle des *fos* Proteins im Signaltransfer: Die Onkogene *ras*, *src*, *mos*, *trk*, *myc* und *fos* aktivieren den Kollagenase Promoter, und zumindest für *ras*, *mos* und *src* konnte ich zeigen, daß für diese Aktivierung die Gegenwart von *fos* Protein notwendig ist. Die Menge an *fos* Protein wird durch die Onkogene *ras*, *src*, *mos*, *trk* und *myc* induziert, *fos* selbst bewirkt eine Repression seines eigenen Promoters und hält u.a. durch diese negative Rückkopplung den Signaltransfer unter der notwendigen stringenten Kontrolle.



## DISKUSSION

Seit der Entdeckung der retroviralen Onkogene und ihrer zellulären Gegenstücke, der Proto - Onkogene, häufen sich die Hinweise, daß Onkoproteine Teil eines zellulären Netzwerkes sind, das die Transduktion von mitogenen oder differenzierungsspezifischen Signalen bis hinein in den Zellkern vermittelt. In diesem Netzwerk könnten die nukleären Onkoproteine Endglieder sein, die das Signal schließlich in eine veränderte Genexpression umsetzen. Bei einem dieser Onkoproteine, dem Produkt des fos Onkogens, deuten zahlreiche Evidenzen darauf hin, daß es tatsächlich durch extrazelluläre Signale beeinflusst wird und das genetische Programm verändern kann: es wird sehr schnell nach Behandlung von Zellen mit biochemisch verschiedenen Agonisten, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Ionophoren oder Tumor Promotoren (Cochran et al., 1984; Greenberg und Ziff, 1984; Kruijer et al., 1984; Bravo et al., 1985; Angel et al., 1985; Pompidou et al., 1987; Rahmsdorf et al., 1987) induziert; es bindet an DNA (Sambucetti und Curran, 1986; Renz et al., 1987) und ist an der Regulation des alpha-1 (III) Kollagen-, des Adipozyten P2- und des Rous Sarkom Virus - Promoters beteiligt (Seytoyama et al., 1986; Distel et al., 1987). Transformationsexperimente, bei denen Revertanten von fos - transformierten Fibroblasten nicht wieder mit fos, ras oder mos Onkogenen retransformiert werden konnten (Zarbl et al., 1987), lassen an eine Onkogen - Kette denken, in der das fos Protein mit einer Aktivitätsregulation anderer Gene beteiligt ist.

Meine Ergebnisse demonstrieren eine funktionelle Rolle verschiedener Onkogene in der Modulation definierter Promoter - Elemente, und sie zeigen, daß das nukleäre fos Onkoprotein ein Effektor ist, der die Konversion eines übertragenen Signals in die Aktivierung eines zellulären Gens, der Kollagenase, bewirkt. Diese Aktivierung wird vermittelt über ein 9 Basenpaare langes DNA Element, das als das TPA - regulierte Element (TRE) der Kollagenase definiert worden war (Angel et al., 1987a). Mit dem TRE übereinstimmende Sequenzen wurden auch in anderen Genen, wie dem Interleukin 2, dem Methallothionein IIa und dem Stromelysin Gen, gefunden (Angel et al., 1987a). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß das Kollagenase Gen stellvertretend für eine größere Gruppe gemeinsam regulierter Gene steht, die alle von fos Protein abhängig sind. In diesem Sinne wäre das fos Protein ein Regulator der Transkription und Bestandteil des Transkriptionskomplexes.



Es gibt Hinweise, daß dies tatsächlich der Fall ist; das fos Protein ist ein Teil des Transkriptionskomplexes des Adipozyten P2 Gens (Distel et al., 1987); es bindet spezifisch an Oligonukleotide, die eine TRE Sequenz enthalten (Franza et al., 1988; B. Stein, unveröffentlicht); es liegt in der Zelle komplexiert mit p39 vor (Curran et al., 1985; Franza et al., 1987), einem Protein, vom dem vermutet wird, daß es AP-1 ist (P. Vogt, persönliche Mitteilung).

Von AP-1 war gezeigt, daß es ein Transkriptionsfaktor ist, dessen Bindung an das TRE notwendig zur Aktivierung des Kollagenase Promoters ist (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987). Man nimmt an, daß die Aktivität dieses Faktors posttranslational modifiziert wird, da die Aktivierung der Kollagenase über das TRE unabhängig von neuer Proteinsynthese zu sein scheint und die Bindungsaktivität des AP-1 in Extrakten phorbolster-behandelter Zellen auf das 4fache ansteigt. Ich zeigte jedoch, daß fos Proteinsynthese eine Voraussetzung für die Genaktivierung über das TRE ist. Eine Erklärung für diesen Widerspruch wäre folgende: Die experimentellen Konditionen zur Inhibition der Proteinsynthese erlauben immer noch eine Residualsynthese von etwa 5 %. Gleichzeitig führen diese Bedingungen zu einer drastischen Überproduktion an fos mRNA (Cochran et al., 1984; Kruijer et al., 1984; Greenberg et al., 1986a). Daher könnte selbst bei Anwesenheit von Proteinsynthese - Inhibitoren eine signifikante Menge an fos Protein produziert werden. Es ist dennoch wahrscheinlich, daß AP - 1 posttranslational modifiziert wird und als ein zweites, unabhängiges Ereignis während der TPA Behandlung von Zellen benötigt wird (Herrlich und Karin, 1987). Dies würde erklären, warum die fos Induktion alleine nicht ausreichend für die Induktion des Kollagenase Promoters ist: Bestrahlung von Zellen mit UV - Licht induziert sehr schnell die Transkription des c - fos Gens (Angel et al., 1985; Büscher et al., eingereicht), aber die Induktion der Kollagenase ist hier im Vergleich zu Serum- oder TPA-behandelten Zellen mehrere Stunden verzögert.

Ein auffälliges Merkmal der Aktivierung des c - fos Gens ist das schnell vorübergehende Erscheinen seiner mRNA und seines Proteins. Dies wird verursacht durch i) die kurze Halblebenszeit der mRNA; ii) den raschen Abbau des Proteins; iii) die schnelle Repression des Promoters; (Curran et al., 1984; Treisman, 1985; Greenberg et al., 1986; Rechsteiner et al., 1987; Verma, 1987). Ich zeigte, daß die Repression des

c - fos Promoters durch fos Protein selbst verursacht wird. Mehrere Befunde führten zu dieser Schlußfolgerung: i) ein c - fos Promoter-CAT Konstrukt wird induziert, wenn die Synthese des endogenen fos Proteins durch "anti - sense" fos blockiert wird; ii) die Aktivität des fos-CAT Konstrukts wird reprimiert, wenn ein fos Protein synthetisierendes Plasmid kotransfiziert wird. Diese Experimente wurden in gehungerten Zellen durchgeführt und implizieren daher, daß selbst unter diesen Bedingungen eine niedrige basale Synthese von fos Protein stattfindet (vgl. Bravo et al., 1986). Dies ist in Übereinstimmung mit meinem Befund, daß die Basalaktivität des Kollagenase Promoters weiter reduziert werden kann, wenn die fos Proteinsynthese durch anti-fos Sequenzen blockiert wird. Weiterhin wird iii) die serumstimulierte fos Expression gehemmt, wenn zuvor ein stabil transfiziertes LTR-fos Konstrukt durch Hormongabe angeschaltet wurde.

Das fos Gen erwirbt durch Modifikationen des 5'- und 3'- Bereiches transformierende Eigenschaften (Miller et al., 1984; Meijlink et al., 1985; Iba et al., 1988). Man nimmt an, daß durch diese Veränderungen die Menge an fos Protein in der Zelle längerfristig erhöht wird, also im Gegensatz steht zur normalen, schnell vorübergehenden Expression von fos nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren. Meine Experimente zeigen, daß dies tatsächlich der Fall ist: i) die Deletion des 3'-untranslatierten Endes bewirkt eine drastische Verlängerung der Halblebenszeit der mRNA; ii) die fos Protein Menge bleibt über mehrere Stunden konstant erhöht; iii) die erhöhte Expression korreliert mit der Ausprägung des transformierten Phänotyps; iv) nach Reduktion der erhöhten fos Expression revertiert die Zelle zum Normaltyp.

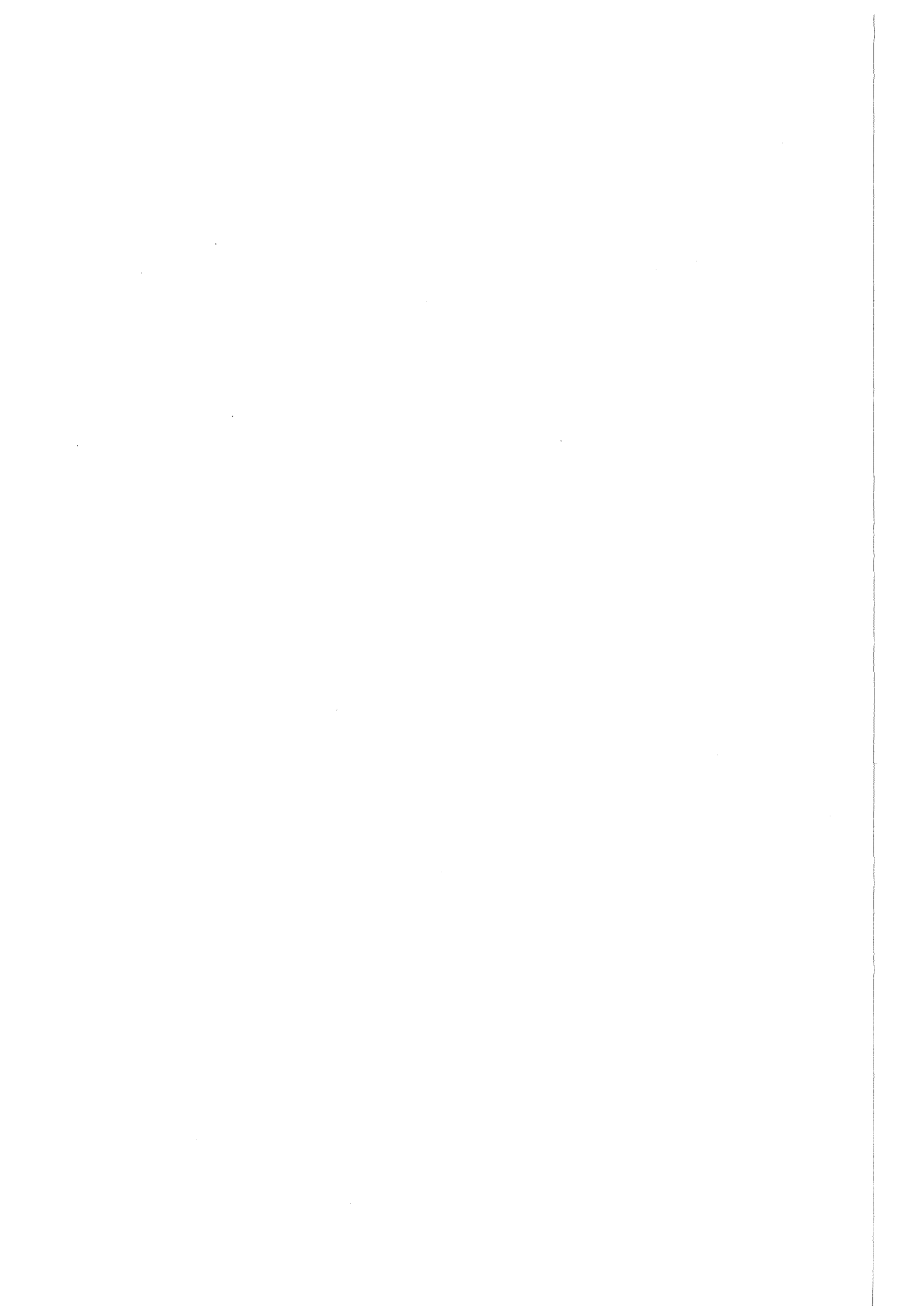
Ist das fos Protein auch an der Transformation der Zellen durch andere Onkogene beteiligt? Sicherlich ist die über fos bewirkte Aktivierung des Kollagenase Gens nicht ausreichend für die Transformation der Zelle: Klone einer Rattenzelllinie (rat-2), die große Mengen Kollagenase exprimierten, zeigen keine Anzeichen eines transformierten Phänotyps (Ponta et al., unveröffentlicht). Jedoch sprechen mehrere Befunde für eine Rolle des fos Proteins in Onkogen- oder TPA-induzierten Transformationsprozessen: i) Nach Steroidhormonbehandlung von NIH 3T3 Zellen, die stabil mit LTRras, LTRmos oder LTRfos transfiziert sind, ändern diese innerhalb weniger Stunden auf die gleiche Weise ihren Phänotyp: sie konvertieren zu einer fusiformen Morphologie; die gleichen Veränderungen resultieren aus der

Behandlung untransfizierter NIH 3T3 Zellen mit dem Tumor Promoter TPA. Dies deutet darauf hin, daß diese verschiedenen induzierenden Agentien - zusätzlich zur Kollagenase - ein ähnliches Gensortiment aktivieren. ii) "Anti-sense" fos RNA restauriert das kontakt-inhibierte Wachstum von Zellen, die mit dem viralen sis Onkogen transformiert wurden (Mercola et al., 1987). iii) NIH 3T3 Zellen, die mit raf, fms oder dem sis Onkogen transformiert wurden, exprimieren erhöhte fos Mengen (Müller et al., 1984; Mercola et al., 1987). iv) Revertanten fos transformierter Fibroblasten können nicht mehr mit fos, ras oder mos Onkogenen retransformiert werden (Zarbl et al., 1987).

Die über fos laufende Signaltransferkette, die hier am Beispiel der Kollagenase Induktion aufgezeigt wurde, ist wohl eine von mehreren, über die Genregulation und Transformation erreicht werden kann. Zum Beispiel können die oben erwähnten Revertanten fos transformierter Zellen leicht mit trk oder Polyoma mittel T Onkogenen retransformiert werden (Zarbl et al., 1987). Potentielle Kandidaten für alternative Signaltransferketten wären die nukleären Onkogene myc, myb, erbA und jun, die möglicherweise direkt in die Kontrolle der Genexpression involviert sind (Kaddurah-Daouk et al., 1987; Sap et al., 1987; Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988; Bos et al., 1988).

Für myc konnte ich zeigen, daß es sowohl den fos-, als auch den Kollagenase-Promoter induziert. Die physiologische Relevanz dieses Befundes ist jedoch noch unklar, da in serumstimulierten Fibroblasten zuerst fos, dann myc induziert wird (Müller et al., 1984a). Möglicherweise spielen dabei gewebsspezifische Faktoren eine Rolle: in undifferenzierten Phaeochromozyten kann unter bestimmten Umständen erst myc, dann fos induziert werden (I. Verma, persönliche Mitteilung). Gewebsspezifische Komponenten sind wohl auch dafür verantwortlich, daß das myb Onkogen in Fibroblasten weder den c - fos-, noch den Kollagenase - Promoter aktiviert: das virale myb transformiert nur hämatopoetische Zellen, keine Fibroblasten (Lipsick et al., 1986). Erste Experimente deuten darauf hin, daß das jun Onkogen -wie fos- den Kollagenase Promoter aktiviert und den fos Promoter reprimiert.

Die Resultate dieser Arbeit weisen darauf hin, daß Onkoproteine Teil eines komplexen Netzwerks sind, das die Umsetzung extrazellulärer Signale in die Aktivierung oder Repression von Genen bewirkt. Entgeht die stringente Regulation der adäquaten Kontrolle, kann durch einen "molekularen Kurzschluß" die tumorigene Transformation der Zelle resultieren. Es wird eine wichtige Aufgabe sein, die einzelnen Komponenten dieser Signaltransferketten weiter zu dissektieren und ihre Funktionen und Interaktionen zu analysieren ☺



## LITERATURVERZEICHNIS

ADAMSON, E.D. (1987).

Oncogenes in development.

Development 99, 449-471.

ANGEL, P., RAHMSDORF, H.J., PÖTING, A., HERRLICH, P. (1985).

c-fos mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle.

Cancer Cells 3, 315-319.

ANGEL, P., IMAGAWA, M., CHIN, R., STEIN, B., IMBRA, R.J., RAHMSDORF, H.J., JONAT, C., HERRLICH, P., KARIN, M. (1987a).

Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.

Cell 49, 729-739.

ANGEL, P., BAUMANN, I., STEIN, B., DELIUS, H., RAHMSDORF, H.J., HERRLICH, P. (1987b).

12-O-tetradecanoyl-phorbol-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region.

Mol. Cell. Biol. 7, 2256-2266.

ANGEL, P., ALLEGRETTO, E., OKINO, S., HATTORI, K., BOYLE, W.J., HUNTER, T., KARIN, M. (1988).

The c-jun proto-oncogene encodes a sequence specific DNA-binding protein similar or identical to the transcriptional activator AP-1.

Nature 332, 166-171.

ARMELIN, H.A., ARMELIN, M.C.S., KELLY, K., STEWART, T., LEDER, P., COCHRAN, B.H., STILES, C.D. (1984).

Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor.

Nature 310, 655-660.

BARBACID, M. (1986).

Mutagens, oncogenes and cancer.

Trends in Genetics 7, 188-192.

BARBER, J.R. und VERMA, I.M. (1987).

Modification of fos proteins: phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum.

Mol. Cell. Biol. 7, 2201-2211.

BAUER, E.A., KRONBERGER, A., VALLE, K.-H., JEFFREY, J.J., EISEN, A.Z. (1985).

Glucocorticoid modulation of collagenase expression in human skin fibroblast cultures. Evidence for a pre-translational inhibition.

Biochim. Biophys. Acta 825, 227-235.

BELLARD, F., SASSONE-CORSI, A., CHAMBON, P. (1981).

A reliable method for the recovery of DNA-fragments from agarose and acrylamide gels.

Anal. Biochem. 112, 295-298.

BERNSTEIN, S.C. und WEINBERG, R.A. (1985).

Expression of the metastatic phenotype in cells transfected with human metastatic tumor DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1726-1730.

BERRIDGE, M.J. (1986).

Growth factors, oncogenes and inositol lipids.

Cancer Surveys 5, 413-430.

BISHOP, J.M. (1985a).

Trends in oncogenes.

Trends in Genetics 9, 245-249.

BISHOP, J.M. (1985b).

Viral oncogenes.

Cell 42, 23-38.

BISHOP, J.M. (1987).

The molecular genetics of cancer.

Science 235, 305-311.

BISTER, K. und JANSEN, H.W. (1986).

Oncogenes in retroviruses and cells: Biochemistry and Molecular Genetics.

Advances in Cancer Research 47, 99-187.

BLUMBERG, P.M. (1988).

Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters:  
Sixth Rhoads Memorial award lecture.  
Cancer Res. 48, 1-8.

BOHMANN, D., BOS, T.J., ADMON, A., NISHIMURA, T., VOGT, P.K., TJIAN, R. (1987).

Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural  
and functional properties of transcription factor AP-1.  
Science 238, 1386-1392.

BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNEKER, H.L.,  
BOYER, H.W. (1977).

Construction and characterization of new cloning vehicles.  
Gene 2, 95-113.

BOS, T.J., BOHMANN, D., TSUCHIE, H., TJIAN, R., VOGT, P.K. (1988).

v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1.  
Cell 52, 705-712.

BRADLEY, M.O., KRAYNAK, A.R., STORER, R.D., GIBBS, J.B. (1986).

Experimental metastases in nude mice of NIH 3T3 cells containing various  
ras genes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5277-5281.

BRADSHAW, R.A. und PRENTIS, S. (Hrsg.) (1987).

Oncogenes and Growth Factors.  
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford.

BRAVO, R., BURCKHARDT, J., CURRAN, T., MÜLLER, R. (1985).

Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell  
clones is accompanied by the rapid induction of c-fos and c-myc  
proto-oncogenes.  
EMBO J. 4, 1193-1197.

BRAVO, R., BURCKHARDT, J., CURRAN, T., MÜLLER, R. (1986).

Expression of c-fos in NIH 3T3 cells is very low but inducible  
throughout the cell cycle.  
EMBO J. 5, 695-700.



- BRAVO, R., NEUBERG, M., BURCKHARDT, J., ALMENDRAL, J., WALLICH, R.,  
MÜLLER, R. (1987).  
Involvement of common and cell type-specific pathways in c-fos gene  
control: stable induction by cAMP in macrophages.  
Cell 48, 251-260.
- BUSS, J.E. und SEFTON, B.M. (1986).  
Direct identification of palmitic acid as the lipid attached to p21<sup>ras</sup>.  
Mol. Cell. Biol. 6, 116-122.
- CALABRETTA, B. (1987).  
Dissociation of c-fos induction from macrophage differentiation in  
human myeloid leukemic cell lines.  
Mol. Cell. Biol. 7, 769-774.
- CHANDLER, V.L., MALER, B.A., YAMAMOTO, K.R. (1983).  
DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro  
render a heterologous promoter hormone responsive in vivo.  
Cell 33, 489-499.
- CHIU, I.M., REDDY, P.E., GIVOL, D., ROBBINS, K.C., TRONICK, S.R.,  
AARONSON, S.A. (1984).  
Nucleotide sequence analysis identifies the human c-sis proto-oncogene  
as a structural gene for platelet-derived growth factor.  
Cell 37, 123-129.
- CHING, C.L., GADI, I.K., KALVONJIAN, S., ANISOWICZ, A.,  
SAGER, R. (1985).  
Plasmid-induced "hit-and-run" tumorigenesis in Chinese hamster  
embryo fibroblast (CHEF) cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2839-2843.
- COCHRAN, B.H., ZULLO, J., VERMA, I.M., STILES, C.D. (1984).  
Expression of the c-fos oncogene and of fos-related gene stimulated  
by platelet-derived growth factor.  
Science 226, 1080-1082.
- COLETTA, G., CIRAFICI, A.M., VECCHIO, G. (1985).  
Induction of the c-fos oncogene by thyrotropic hormone in rat  
thyroid cells in culture.  
Science 233, 458-460.

- COLLART, M.A., BELIN, D., VASSALLI, J.-D., VASSALLI, P. (1987).  
Modulations of functional activity in differentiated macrophages are accompanied by early and transient increase or decrease in c-fos gene transcription.  
J. Immunol. 139, 949-955.
- COLOTTA, F., WANG, J.M., POLENTARUTTI, N., MANTOVANI, A. (1987).  
Expression of c-fos protooncogene in normal human peripheral blood granulocytes.  
J. Exp. Med. 165, 1224-1229.
- CONSCIENCE, J.-F., VERRIER, B., MARTIN, G. (1986).  
Interleukin-3-dependent expression of the c-myc and c-fos proto-oncogenes in hemopoietic cell lines.  
EMBO J. 5, 317-323.
- COURTNEIDGE, S.A., LEVINSON, A.D., BISHOP, J.M. (1980).  
The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp69<sup>src</sup>) and a homologous protein in normal cells (pp60<sup>proto-src</sup>) are associated with the plasma membrane.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3783-3787.
- CURRAN, T. (1984).  
Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc.  
Nature 312, 716-720.
- CURRAN, T. und MORGAN, J.I. (1984).  
Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines.  
Science 229, 1265-1268.
- CURRAN, T. und MORGAN, J.I. (1986).  
Barium modulates c-fos expression and post-translational modification.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8521-8524.
- CURRAN, T. und MORGAN, J.I. (1988).  
Induction of c-fos is mediated by diverse biochemical pathways.  
In: Growth Factors, Tumor Promoters and Cancer Genes.  
(Hrsg.) N.H. Colburn, H.L. Moses und E.J. Stanbridge, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series 58, 215-221.

CURRAN, T. und TEICH, N.M. (1982).

Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene:  
Characterization of a 55,000-Dalton phosphoprotein.  
J. Virol. 42, 114-122.

CURRAN, T. und VERMA, I.M. (1984).

FBR murine osteosarcoma virus. I. Molecular analysis and characterization  
of a 75,000-Da gag-fos fusion product.  
Virology 135, 218-228.

CURRAN, T., PETERS, G., VAN BEVEREN, C., TEICH, N.T., VERMA, I.M. (1982).

FBJ murine osteosarcoma virus: Identification and molecular cloning  
of biologically active proviral DNA.  
J. Virol. 44, 674-682.

CURRAN, T., MACCONNELL, W.P., VAN STRAATEN, F., VERMA I.M. (1983).

Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: Molecular  
cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of  
the c-fos gene from mouse and human cells.  
Mol. Cell. Biol. 3, 914-921.

CURRAN, T., MILLER, A.D., ZOKAS, L., VERMA, I.M. (1984).

Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis.  
Cell 36, 259-268.

CURRAN, T., VAN BEVEREN, C., LING, N., VERMA, I.M. (1985).

Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39,000-Dalton  
cellular protein.  
Mol. Cell. Biol. 5, 167-172.

DAVIS, L.G., DIBNER, M.D., BATTEY, J.F. (1986).

Basic Methods in Molecular Biology.  
Elsevier, New York, Amsterdam, London.

DISTEL, R.J., RO, H.-S., ROSEN, B.S., GROVES, D.L., SPIEGELMAN, B.M. (1987).

Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte  
differentiation: direct participation of c-fos.  
Cell 49, 835.

DONY, C. und GRUSS, P. (1987).

Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and  
mesodermal web tissue.  
Nature 328, 711-714.

- DOOLITTLE, R.F., HUNKAPILLER, M.W., HOOD, L.E., DEVARE, S.G., ROBBINS, K.C.,  
AARONSON, S.A., ANTONIADES, H.N. (1983).  
Simian sarcome virus oncogene, v-sis, is derived from the gene (or genes)  
encoding a platelet-derived growth factor.  
Science 221, 275-276.
- DOTTO, G.P., GILMAN, M.Z., MARUYAMA, M., WEINBERG, R.A. (1986).  
c-myc and c-fos expression in differentiating mouse primary keratinocytes.  
EMBO J. 5, 2853-2857.
- DOWNWARD, J., YARDEN, Y., MAYES, E., SCRACE, G., TOTTY, N., STOCKWELL, P.,  
ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J., WATERFIELD, M.D. (1984).  
Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B  
oncogene protein sequences.  
Nature 307, 521-527.
- EDELMAN, A.M., BLUMENTHAL, D.K., KREBS, E.G. (1987).  
Protein serine/threonine kinases.  
Ann. Rev. Biochem. 56, 567-614.
- EISENMAN, R.N., TACHIBANA, C.Y., ABRAMS, H.D., HANN, S.R. (1985).  
v-myc and c-myc-encoded proteins are associated with the nuclear matrix.  
Mol. Cell. Biol. 5, 114-126.
- EISENMAN, R.N. und THOMPSON, C.B. (1986).  
Oncogenes with potential nuclear function: myc, myb and fos.  
Cancer Surveys 5, 309-327.
- FINCHAM, V.J., CHISWELL, D.J., WYKE, J.A. (1982).  
Mapping of nonconditional and conditional mutants in the src gene of  
prague strain Rous Sarcoma Virus.  
Virology 116, 72-83.
- FINKEL, M.P., BISKIS, B.O., JINKINS, P.B. (1966).  
Virus induction of osteosarcomas in mice.  
Science 151, 698-701.
- FINKEL, M.P., REILLY, C.A., BISKIS, B.O., GRECO, I.L. (1973).  
Bone tumor viruses.  
Colston Pap 24, 353-366.

FLEISCHMANN, L.F., CHAHWALA, S.B., CANTLEY, L. (1986).

Ras-transformed cells: altered levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and catabolites.

Science 231, 407-410.

FORT, P., RECH, J., VIE, A., PIECHACZYK, M., BONNIEN, A., JEANTEUR, P., BLANCHARD, J.-M. (1987).

Regulation of c-fos gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation.

Nucl. Acids Res. 15, 5657-5667.

FRANZA, B.R., SAMBUCETTI, L.C., COHEN, D.R., CURRAN, T. (1987).

Analysis of fos protein complexes and fos-related antigens by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis.

Oncogene 1, 213-221.

FRANZA, B.R., RAUSCHER III, F.J., JOSEPHS, S.F., CURRAN, T. (1988).

The fos-complex and fos-related antigens are associated with specific nucleic acid sequences including a region in the HIV long-terminal repeat.

Science 239, 1150-1153.

GALLOWAY, D.A. und MCDUGALL, J.K. (1983).

The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism.

Nature 302, 21-24.

GORMAN, C., MOFFAT, L., HOWARD, B. (1982).

Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.

Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051.

GORMAN, C. (1985).

High efficiency gene transfer into mammalian cells. In: DNA cloning Vol. II, a practical approach. D.M. Glover (Ed.). IRL Press, Oxford.

GRAHAM, F.L. und VAN DER EB, A.J. (1973).

A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.

Virology 52, 456-467.

GREENBERG, M.E. und ZIFF, E.B. (1984).

Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene.

Nature 311, 433-438.

GREENBERG, M.E., GREENE, L.A., ZIFF, E.B. (1985).

Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC 12 cells.

J. Biol. Chem. 260, 14101-14110.

GREENBERG, M.E., HERMANOWSKI, A.L., ZIFF, E.B. (1986a).

Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription.

Mol. Cell. Biol. 6, 1050-1057.

GREENBERG, M.E., ZIFF, E.B., GREENE, L.A. (1986b).

Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induced rapid gene transcription.

Science 234, 80-83.

GRONER, B., HYNES, N.E., RAHMSDORF, U., PONTA, H. (1983).

Transcription initiation of transfected mouse mammary tumor virus LTR DNA is regulated by glycocorticoid hormones.

Nucl. Acids Res. 11, 4713-4725.

HAMES, B.D. und HIGGINS, S.J. (1984).

Transcription and translation - a practical approach.

IRL Press, Oxford, Washington DC.

HANAHAN, D. (1983).

Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.

J. Mol. Biol. 166, 557-580.

HARRIS, C.C. (1987).

Human tissues and cells in carcinogenesis research.

Cancer Res. 47, 1-10.

HELDIN, C.-H. und WESTERMARK, B. (1984).

Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes.

Cell 37, 9-20.

HERRLICH, P. und KARIN, M. (1987).

Regulation of gene expression by posttranslational modification of transcription factors. In: The Roots of Modern Biochemistry.

Energetics of the Cell. Fritz Lipmann Memorial Symposium (H. Kleinkauf, H. von Döhren, L. Jaenicke, eds.). Walter de Gruyter, Berlin, New York.

HERRLICH, P., JONAT, C., RAHMSDORF, H.J., ANGEL, P., HASLINGER, A.,  
IMAGAWA, M., KARIN, M. (1988).

Signals and sequences involved in the ultraviolet- and 12-O-tetra-  
decanoylphorbol-13-acetate (TPA)-dependent induction of genes.

In: Growth Factors, Tumor Promoters and Cancer Genes. (Hrsg.) N.H. Colburn,  
H.L. Moses und E.J. Stanbridge, UCLA Symposia on Molecular and Cellular  
Biology, New Series 58, 249-256.

HIDAKA, H., INAGAKI, M., KAWAMOTO, S., SASAKI, Y. (1984).

Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic  
nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C.

Biochemistry 23, 5036-5041.

HOLT, J.T. und NIENHUIS, A.W. (1988).

c-fos proto-oncogene expression is necessary for normal growth of  
mouse 3T3 cells. In: Growth Factors, Tumor Promoters and Cancer Genes.  
Hrsg.) N.H. Colburn, H.L. Moses und E.J. Stanbridge, UCLA Symposia  
on Molecular and Cellular Biology, New Series 58, 313-320.

HOLT, J.T., GOPAL, T.V., MOULTON, A.D., NIENHUIS, A.W. (1986).

Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell  
proliferation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4794-4798.

HUANG, A.L., OSTROWSKI, M.C., BERARD, D., HAGER, G.L. (1981).

Glucocorticoid regulation of the Ha-MuSV p21 gene conferred by  
sequences from Mouse Mammary Tumor Virus.

Cell 27, 245-255.

HUNT, S.P., PINI, A., EVAN, G. (1987).

Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following  
sensory stimulation.

Nature 328, 632-634.

HUNTER, T. (1984).

Oncogenes and Proto-oncogenes: How do they differ?

J. natn. Cancer Inst. 73, 773-786.

HUNTER, T. (1985).

Oncogenes and growth control.

TIBS 10, 275-280.

- HUNTER, T. und COOPER, J.A. (1985).  
Protein-tyrosine kinases.  
Ann. Rev. Biochem. 54, 897-930.
- HYNES, N., VAN OUYEN, A.J.J., KENNEDY, N., HERRLICH, P., PONTA, H.,  
GRONER, B. (1983).  
Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid -  
responsive expression of mouse mammary tumor virus and of an  
adjacent gene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 3637-3641.
- IBA, H., SHINDO, Y., NISHINA, H., YOSHIDA, T. (1988).  
Transforming potential and growth stimulating activity of the v-fos and  
c-fos genes carried by avian retrovirus vectors.  
Oncogene Research 2, 121-133.
- JAGGI, R., SALMONS, B., MÜLLENER, D., GRONER, B. (1986).  
The v-mos and Ha-ras oncogene expression represses glucocorticoid  
hormone-dependent transcription from the mouse mammary tumor virus LTR.  
EMBO J. 5, 2609-2616.
- JAKOBOVITS, E.B., MAJORS, J.E., VARMUS, H.E. (1984).  
Hormonal regulation of the Rous Sarcoma Virus src gene via a  
heterologous promoter defines a threshold dose for cellular  
transformation.  
Cell 38, 757-765.
- JIMINEZ, A. und DAVIES, J. (1980).  
Expression of a transposable antibiotic resistance element in  
Saccharomyces.  
Nature 287, 869-871.
- KAWAMOTO, S. und HIDAKA, H. (1984).  
1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective  
inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 258-264.
- KADDURAH-DAOUK, R., GREENE, J.M., BALDWIN, A.S., KINGSTON, R.E. (1987).  
Activation and repression of mammalian gene expression by the c-myc  
protein.  
Genes & Development 1, 347-357.



KAWAI, S. und NISHIZAKU, M. (1984).

New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide.  
Mol. Cell. Biol. 4, 1172-1174.

KELLY, K., COCHRAN, B.H., STILES, C.D., LEDER, P. (1983).

Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and  
platelet-derived growth factor.  
Cell 35, 603-610.

KLEIN, G. und KLEIN, E. (1984).

Oncogene activation and tumor progression.  
Carcinogenesis 5, 429-435.

KLEIN, G. und KLEIN, E. (1985).

Evolution of tumours and the impact of molecular oncology.  
Nature 315, 190-195.

KLEIN, G. und KLEIN, E. (1986).

Conditioned tumorigenicity of activated oncogenes.  
Cancer Res. 46, 3211-3224.

KLEMPNAUER, K.-H. und SIPPEL, A.E. (1986).

Subnuclear localization of proteins encoded by the oncogene v-myb  
and its cellular homolog c-myb.  
Mol. Cell. Biol. 6, 62-69.

KLEMPNAUER, K.-H., SYMONDS, G., EVAN, G.I., BISHOP, J.M. (1984).

Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian  
myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the cellular  
c-myb gene.  
Cell 37, 537-547.

KNUDSON, Jr., A.A. (1986).

Genetics of human cancer.  
Ann. Rev. Genet. 20, 231-251.

KOZMA, S.C., REDMOND, S.M.S., XIAO-CHANG, F., SAURER, S.M., GRONER, B.,  
HYNES, N.E. (1988).

Activation of the receptor kinase domain of the trk oncogene by  
recombination with two different cellular sequences.  
EMBO J. 7, 147-154.

- KRIS, R.M., LIBERMANN, T.A., AVIVI, A., SCHLESSINGER, J. (1985).  
Growth factors, growth factor receptors and oncogenes.  
Biotechnology 3, 135-140.
- KRUIJER, W., COOPER, J.A., HUNTER, T., VERMA, I.M. (1984).  
Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression  
of the c-fos gene and protein.  
Nature 312, 711-716.
- KRUIJER, W., SCHUBERT, D., VERMA, I.M. (1985).  
Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7330-7334.
- LAND, H., PARADA, L.F., WEINBERG, R.A. (1983).  
Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least  
two cooperating oncogenes.  
Nature 304, 596-602.
- LARSON, L.-G., GRAY, H.E., TÖTTERMAN, T., PETTERSON, U., NILSSON, K. (1987).  
Drastically increased expression of myc and fos protooncogenes during  
in vitro differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 223-227.
- LEE, F., MULLIGAN, R., BERG, P., RINGOLD, G. (1981).  
Glucocorticoids regulate overexpression of dihydrofolate reductase  
cDNA in mouse mammary tumor virus chimaeric plasmids.  
Nature 294, 228-232.
- LEE, W., MITCHELL, P., TJIAN, R. (1987).  
Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer  
elements.  
Cell 49, 741-752.
- LEOF, E.B., PROPER, J.A., GOUSTIN, A.S., SHIPLEY, G.D., DICORLETO, P.E.,  
MOSES, H.L. (1986).  
Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth  
factor by transforming growth factor  $\beta$ : a proposed model for indirect  
mitogenesis involving autocrine activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2453-2457.
- LINDL, T. und BAUER, J. (1987).  
Zell- und Gewebekultur.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

LIPSICK, J.S., IBANEZ, C.E., BALUDA, M.A. (1986).

Expression of molecular clones of v-myb in avian and mammalian cells independently of transformation.

J. Virol. 59, 267-275.

LUCIBELLO, F.C., NEUBERG, M., HUNTER, J.B., JENUWEIN, T., WALLICH, R., STEIN, B., SCHÖNTHAL, A., HERRLICH, P., MÜLLER, R. (1988).

Transactivation of gene expression by fos protein: Involvement of a binding site for the transcription factor AP-1.

Oncogene, im Druck.

LUCKOW, B. und SCHÜTZ, G. (1987).

CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements.

Nucl. Acids Res. 15, 5490.

LUTHMANN, H. und MAGNUSSON, G. (1983).

High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells.

Nucl. Acids Res. 11, 1295-1308.

MAJERUS, P.W., WILSON, D.B., CONNOLLY, T.M., BROSS, T.E., NEUFELD, E.J. (1985).

Phosphoinositide turnover provides a link in stimulus-response coupling.

Trends Biochem. Sci. 4, 168-171.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1982).

Molecular Cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

MANNE, V., BEKESI, M., KUNG, H.-F. (1985).

Ha-ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-ras gene products result in decreased GTPase activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 376-380.

MARKS, P.A., SHEFFERY, M., RIFKIND, R.A. (1987).

Induction of transformed cells to terminal differentiation and the modulation of gene expression.

Cancer Res. 47, 659-666.

MARTIN-ZANCA, D., HUGES, S.H., BARBACID, M. (1986).

A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences.

Nature 319, 743-748.

MARX, J.L. (1987).

The fos gene as a "master switch".

Science 237, 854-856.

MASON, I., MURPHY, D., HOGAN, B.L.M. (1985).

Expression of c-fos in parietal endoderm, amnion and differentiating F9 teratocarcinoma cells.

Differentiation 30, 76-81.

MATRISIAN, L.M., LEROY, P., RUHLMANN, CH., GESNEL, M.-C., BREATHNACH, R. (1986).

Isolation of the oncogene and epidermal growth factor-induced transin gene: complex control in rat fibroblasts.

Mol. Cell. Biol. 6, 1678-1686.

MCGRATH, J.P., CAPON, D.J., GOEDEL, D.V., LEVINSON, A.D. (1984).

Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein.

Nature 310, 644-649.

MCMASTER, G. und CARMICHAEL, G. (1977).

Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838.

MEIJLINK, F., CURRAN, T., MILLER, D.A., VERMA, I.M. (1985).

Removal of a 67-base-pair sequence in the noncoding region of proto-oncogene fos converts it to a transforming gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4987-4991.

MERCOLA, D., RUNDELL, A., WESTWICK, J., EDWARDS, S.A. (1987).

Antisense RNA to the c-fos gene: restoration of density-dependent growth arrest in a transformed cell line.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 147, 288-294.

MILLER, D.A., CURRAN, T., VERMA, I.M. (1984).

c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene.

Cell 36, 51-60.

MITCHELL, R.L., ZOKAS, L., SCHREIBER, R.D., VERMA, I.M. (1985).

Rapid induction of the expression of proto-oncogene fos during human monocytic differentiation.

Cell 40, 209-217.

- MITRA, G., MARTIN-ZANCA, D., BARBACID, M. (1987).  
Identification and biochemical characterization of p70<sup>TRK</sup>, product of  
the human TRK oncogene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6707-6711.
- MOHUN, T., GARRETT, N., TREISMAN, R. (1987).  
Xenopus cytoskeletal actin and human c-fos gene promoters share a  
conserved protein-binding site.  
EMBO J. 6, 667-673.
- MOORE, J.P., TODD, J.A., HESKETH, T.R., METCALF, J.C. (1986).  
c-fos and c-myc gene activation, ionic signals and DNA synthesis  
in thymocytes.  
J. Biol. Chem. 261, 8158-8162.
- MORGAN, J.I. und CURRAN, T. (1986).  
Role of ion flux in the control of c-fos expression.  
Nature 322, 552-555.
- MORGAN, J.I., COHEN, D.R., HEMPSTEAD, J.L., CURRAN, T. (1987).  
Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system  
after seizure.  
Science 237, 192-197.
- MÜLLER, R. (1986).  
Proto-oncogenes and differentiation.  
Trends Biochem. Sci. 11, 129-132.
- MÜLLER, R. und VERMA, I.M. (1984).  
Expression of cellular oncogenes.  
Current Topics in Microbiology and Immunology 112, 74-115.
- MÜLLER, R. und WAGNER, E.F. (1984).  
Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer  
of c-fos proto-oncogenes.  
Nature 311, 438-442.
- MÜLLER, R., BRAVO, R., BURCKHARDT, J., CURRAN, T. (1984a).  
Induction of c-fos gene and protein by growth factor precedes  
activation of c-myc.  
Nature 312, 716-720.

MÜLLER, R., MÜLLER, D., GUILBERT, L. (1984b).

Differential expression of c-fos in hematopoietic cells: correlation with differentiation of monomyelocytic cells in vitro.

EMBO J. 3, 1887-1890.

MÜLLER, R., CURRAN, T., BURCKHARDT, J., RÜTHER, U., WAGNER, E.F., BRAVO, R. (1985a).

Evidence for a role of the c-fos proto-oncogene in both differentiation and growth control.

Cancer Cells 3, 289-300.

MÜLLER, A.D., VERMA, I.M., CURRAN, T. (1985b).

Deletion of the gag region from FBR murine osteosarcoma virus does not affect its enhanced transforming activity.

J. Virol. 55, 521-526.

MÜLLER, R., MÜLLER, D., VERRIER, B., BRAVO, R., HERBST, H. (1986).

Evidence that expression of c-fos protein in amnion cells is regulated by external signals.

EMBO J. 5, 311-316.

NISHIKURA, K. und MURRAY, J.M. (1987).

Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells.

Mol. Cell. Biol. 7, 639-649.

NISHIMURA, S. und SEKIYA, T. (1987).

Human cancer and cellular oncogenes.

Biochem. J. 243, 313-327.

NISHIZUKA, Y. (1984).

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion.

Nature 308, 693-698.

NISHIZUKA, Y. (1986).

Studies and perspectives of protein kinase C.

Science 234, 305-312.

- NORDSTROM, J.L., HALL, S.L., KESSLER, M.M. (1985).  
Polyadenylation of sea urchin histone RNA sequences in transfected  
cos cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1094-1098.
- NUSSE, R. (1986).  
The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion.  
Trends in Genetics 9, 244-247.
- PAPKOFF, J., LAI, M., H.-T., HUNTER, T., VERMA, I.M. (1981).  
Analysis of transforming gene products from moloney murine sarcoma virus.  
Cell 27, 109-119.
- PAPKOFF, J. und RINGOLD, G.M. (1984).  
Use of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat to promote  
steroid-inducible expression of v-mos.  
J. Virol. 52, 420-430.
- PAPKOFF, J., NIGG, E.A., HUNTER, T. (1983).  
The transforming protein of moloney murine sarcoma virus is a soluble  
cytoplasmic protein.  
Cell 33, 161-172.
- PASTI, G., LACAL, J.-C., WARREN, P.S., AARONSON, S.A., BLUMBERG, P.M. (1986).  
Loss of mouse fibroblast cell response to phorbol esters restored by  
microinjected protein kinase C.  
Nature 324, 375-377.
- PERSONS, D.A., WILKISON, W.O., BELL, R.M., FINN, O.J. (1988).  
Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3  
fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA.  
Cell 52, 447-458.
- POMPIDOU, A., CORRAL, M., MICHEL, P., DEFER, N., KRUIH, J., CURRAN, T. (1987).  
The effects of phorbol ester and Ca-ionophore on c-fos and c-myc  
expression and on DNA synthesis in human lymphocytes are not directly  
related.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 148, 435-442.

PONTA, H., BALL, R., STEINMETZ, M., GRONER, B. (1985).

Hormonal regulation of cell surface expression of the major histocompatibility antigen H-2L<sup>d</sup> in transfected cells.

EMBO J. 4, 3447-3453.

RADZIOCH, D., BOTTAZZI, B., VAREGIO, L. (1987).

Augmentation of c-fos mRNA expression by activators of protein kinase C in fresh, terminally differentiated resting macrophages.

Mol. Cell. Biol. 7, 595-599.

RAHMSDORF, H.J., SCHÖNTHAL, A., ANGEL, P., LITFIN, M., RÜTHER, U., HERRLICH, P. (1987).

Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression.

Nucl. Acids Res. 15, 1643-1659.

RAU, W., DEAN, M., LEVINE, R.A., HENKLE, C., CAMPIST, J. (1986).

Induction of c-fos and c-myc mRNA by epidermal growth factor or calcium ionophore is cAMP dependent.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8216-8220.

RAUSCHER III, F.J., SAMBUCETTI, L.C., CURRAN, T., DISTEL, R.J., SPIEGELMAN, B.M. (1988).

Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP-1.

Cell 52, 471-480.

RECHSTEINER, M., ROGERS, S., ROTE, K. (1987).

Protein structure and intracellular stability.

TIBS 12, 390-394.

REDDY, V.P., THIMMAPAYA, B., DHAR, R., SUBRAMANIAN, K.N., ZAIN, B.S., PAN, J., GHOSH, P.K., CELMA, M.L., WEISSMAN, S.M. (1978).

The genome of simian virus 40.

Science 200, 494-502.

RENZ, M., VERNIER, B., KURZ, C., MÜLLER, R. (1987).

Chromatin association and DNA binding properties of the c-fos proto-oncogene product.

Nucl. Acids Res. 15, 277-292.



ROZENGURT, E. (1986).

Early signals in the mitogenic response.  
Science 234, 161-166.

RÜTHER, U., WAGNER, E.F., MÜLLER, R. (1985).

Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells.  
EMBO J. 4, 1775-1781.

RÜTHER, U., GARBER, C., KOMITOWSKI, D., MÜLLER, R., WAGNER, E.F. (1987).

Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice.  
Nature 325, 412-416.

SAMBUCETTI, L.C. und CURRAN, T. (1986).

The fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose.  
Science 234, 1417-1419.

SANTOS, E., PULCIANI, S., BARBACID, M. (1984).

Characterization of a human transforming gene isolated from T24 bladder carcinoma cells.  
Federation Proceedings 43, 2280-2286.

SAP, J., MUNOZ, A., DAMM, K., GOLDBERG, Y., GHYSDAEL, J., LENTZ, A., BEUG, H., VENNSTRÖM, B. (1986).

The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone.  
Nature 324, 635-640.

SASSONE-CORSI, P. und BORRELLI, E. (1987).

Promoter trans-activation of protooncogenes c-fos and c-myc, but not c-Ha-ras, by products of adenovirus early region 1A.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6430-6433.

SASSONE-CORSI, P. und VERMA, I.M. (1987).

Modulation of c-fos gene transcription by negative and positive cellular factors.  
Nature 326, 507-510.

SCUTCLIFFE, J.G. (1978).

Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322.  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43, 77-90.

SEFTON, B.M. (1987).

Oncogenes encoding protein kinases. In: *Oncogenes and Growth Factors*.  
(Hrsg.) R.A. Bradshaw und S. Prentis. Elsevier, Amsterdam, New York,  
Oxford.

SETOYAMA, C., FRUNZIO, L., LIAN, G., MUDRYJ, M., DE CHROMBRUGGHE, B. (1986).

Transcriptional activation encoded by the v-fos gene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3213-3217.

SHERR, CH.J. und RETTENMIER, C.W. (1986).

The fms gene and the CSF-1 receptor.  
Cancer Surveys 5, 221-232.

SHERR, C.J., RETTENMIER, C.W., SACCA, R., ROUSSEL, M.F., LOOK, A.T.,  
STANLEY, E.R. (1985).

The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the  
mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1.  
Cell 41, 665-676.

SHUIN, T., BILLINGS, P.C., LILLEHANG, J.R., PATERNO, S.R., ROY-BURMAN, P.,  
LANDOLPH, J.R. (1986).

Enhanced expression of c-myc and decreased expression of c-fos proto-  
oncogenes in chemically and radiation-transformed C3H/10T1/2 Cl8  
mouse embryo cell lines.  
Cancer Res, 46, 5302-5311.

SMITH, M.R., DE GUDICIBUS, S.J., STACEY, D.W. (1986).

Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation.  
Nature 320, 540-543.

SPANDIDOS, D.A. und WILKIE, N.M. (1984).

Expression of exogenous DNA in mammalian cells. In: *Transcription And  
Translation - A Practical Approach*. (Eds.) B.D. Hames und S.J. Higgins.  
IRL Press, Oxford, Washington D.C.

SOUTHERN, E.M. (1975).

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel  
electrophoresis.  
J. Mol. Biol. 98, 503-517.

SOUTHERN, P.J. und BERG, P. (1982).

Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter.  
J. Molec. Appl. Genetics 1, 327-341.

STACEY, D.W., WATSON, T., KUNG, H.-F., CURRAN, T. (1987).

Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression.  
Mol. Cell. Biol. 7, 523-527.

STUDZINSKI, S., BRELVI, Z.S., FELDMAN, S.C., WATT, R.A. (1986).

Participation of c-myc protein in DNA synthesis of human cells.  
Science 234, 467-470.

STUMPO, D.J. und BLACKSHEAR, P.J. (1986).

Insulin and growth factor effects on c-fos expression in normal and protein kinase C - deficient 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9453-9457.

SWEET, R.W., YOKOYAMA, S., KAMATA, T., FERAMISCO, J.R., ROSENBERG, M.,  
GROSS, M. (1984).

The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity.  
Nature 311, 273-275.

THOMAS, P.S. (1980).

Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transfected to nitrocellulose.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205.

TOOZE, J. (Ed.) (1981).

The Molecular Biology of Tumor Viruses, Ed. 2, Part. 2,  
DNA Tumor Viruses.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

TRAMONTANO, D., CHIN, W.W., MOSES, A.C., INGBAR, S.H. (1986).

Thyrotropin and dibutyryl cyclic AMP increase levels of c-myc and c-fos mRNAs in cultured rat thyroid cells.  
J. Biol. Chem. 261, 3919-3922.

- TREISMAN, R. (1985).  
Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences.  
Cell 42, 889-902.
- VAN BEVEREN, C., VAN STRAATEN, F., CURRAN, T., MÜLLER, R., VERMA, I.M. (1983).  
Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini.  
Cell 32, 1241-1255.
- VAN DER HOORN, F.A. und MÜLLER, V. (1985).  
Differential transformation of C3H10T1/2 cells by v-mos: sequential expression of transformation parameters.  
Mol. Cell. Biol. 5, 2204-2211.
- VAN STRAATEN, F., MÜLLER, R., CURRAN, T., VAN BEVEREN, C., VERMA, I.M. (1983).  
Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: Deduced amino acid sequence of the human c-fos protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3183-3187.
- VARMUS, H.E. (1984).  
The molecular genetics of cellular oncogenes.  
Ann. Rev. Genet. 18, 553-612.
- VARMUS, H. und SWANSTROM, R. (1982).  
Replication of Retroviruses. In: RNA Tumor Viruses. R.Weiss, N.Teich, H.Varmus und J.Coffin (Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., S. 369-512.
- VERRIER, B., MÜLLER, D., BRAVO, R., MÜLLER, R. (1986).  
Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene.  
EMBO J. 5, 913-917.
- VERMA, I.M. (1987).  
Proto-oncogene fos: a multifaceted gene. In: Oncogenes and Growth Factors. R.A. Bradshaw und S.Prentis (Hrsg.). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

- VERMA, I.M., CURRAN, T., MÜLLER, R., VAN STRAATEN, F., MACCONNELL, W.P.,  
MILLER, A.D., VAN BEVEREN, C. (1984).  
The fos gene: Organization and Expression.  
Cancer Cells 2: Oncogenes and Viral Genes. Cold Spring Harbor, S. 309-321.
- VERMA, I.M., MITCHELL, R.L., KRUIJER, W., VAN BEVEREN, C., ZOKAS, L.,  
HUNTER, T., COOPER, J.A. (1985).  
Proto-oncogene fos: Induction and Regulation during Growth and  
Differentiation.  
Cancer Cells 3: Growth Factors and Transformation. Cold Spring Harbor  
S. 275-287.
- WASYLYK, C., IMLER, J.L., PEREZ-MUTUL, J., WASYLYK, B. (1987).  
The c-Ha-ras oncogene and a tumor promoter activate the polyoma  
virus enhancer.  
Cell 48, 525-534.
- WATERFIELD, M.D., SCRAGE, G.T., WHITTLE, N., STROOBANT, P., JOHNSON, A.,  
WASTESON, A., WESTERMARK, B., HELDIN, C.-H., HUANG, J.S., DENEL, T.F.  
(1983).  
Plated-derived growth factor is structurally related to the putative  
transforming protein p28<sup>sis</sup> of simian sarcoma virus.  
Nature 304, 35-39.
- WATT, R.A., SHATZMAN, A.R., ROSENBERG, M. (1985).  
Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein.  
Mol. Cell. Biol. 5, 448-456.
- WEINBERG, R.A. (1984).  
Cellular oncogenes.  
Trends Biochem. Sci. 4, 131-133.
- WEINBERG, R.A. (1985).  
The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus.  
Science 230, 770-776.
- WEINBERGER, C., HOLLENBERG, S.M., ROSENFELD, M.G., EVANS, R.M. (1985).  
Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship  
to the v-erb A oncogene product.  
Nature 318, 670-672.

- WEISS, R., TEICH, M., VARMUS, H., COFFIN, J. (Eds.) (1984).  
The Molecular Biology of Tumor Viruses, Ed. 2, Part. 1.  
RNA Tumor Viruses.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- WIGLER, M., SILVERSTEIN, S., LEE, L.-S., PELLICIER, A., CHENG, T.,  
AXEL, R. (1977).  
Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured  
mouse cells.  
Cell 11, 223-232.
- WILLIAMS, J.G. und MASON, P.J. (1985).  
Hybridisation in the analysis of RNA. In: Nucleic Acid Hybridisation -  
A Practical Approach. B.D. Hames und S.J. Higgins (Hrsg.).  
IRL Press, Oxford, Washington D.C.
- WOLFMAN, A. und MACARA, I.G. (1987).  
Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester  
sensitivity in ras-transformed fibroblasts.  
Nature 325, 359-361.
- ZARBL, H., LATREILLE, J., JOLICOEUR, P. (1987).  
Revertants of v-fos-transformed fibroblasts have mutations in cellular  
genes essential for transformation by other oncogenes.  
Cell 51, 357-369.
- ZULLO, J., STILES, C.D., GARCEA, R.L. (1987).  
Regulation of c-myc and c-fos mRNA levels by polyoma-virus:  
Distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1210-1214.