

KfK 4458
September 1988

Positive und negative Kontrolle der Expression des Proto- Onkogens c-fos

M. Büscher
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4458

Positive und negative Kontrolle der Expression des Proto-Onkogens c-fos

Marita Büscher

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, 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

In dieser Arbeit wurde die Expression des Proto-Onkogens *cfos* in Maus-Fibroblasten (NIH 3T3) untersucht. In unbehandelten Zellen ist die *cfos* mRNA- und die *cfos* Protein- Menge sehr gering. Eine Behandlung der Zellen mit physiologischen und nicht-physiologischen Agenzien induziert eine starke Zunahme sowohl der *cfos* mRNA- als auch der *cfos* Protein- Menge. Neben den bereits beschriebenen Induktoren UV-Licht (11), TPA (9), Serum (5) und PDGF (6) wurden zwei weitere Agenzien gefunden, die die Expression des *cfos* Gens in NIH 3T3 Zellen induzieren: 8-Br-cAMP und der Phosphodiesterase Inhibitor IMX. Diese Agenzien induzieren alle eine rasche, transiente Expression des *cfos* Gens.

Durch Analyse stabil transfizierter Deletionsmutanten des menschlichen *cfos* Gens konnten zwei DNA-Elemente identifiziert werden, die die Induktion durch die oben beschriebenen Agentien vermitteln: das SRE (serum responsive element, -319/-300; 18,19) und das (+18/+38) Element. Mit Hilfe von Bandshift-Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von NIH 3T3 Zellen mit UV-Licht, TPA und Serum die verstärkte Bindung mindestens eines Kernproteins an das SRE stimuliert.

In nicht-stimulierten NIH 3T3 Zellen ist die Expression des *cfos* Gens reprimiert: durch Ko-Transfektionsexperimente konnten zwei DNA-Elemente identifiziert werden, die reprimierende Faktoren binden: die AP1 Konsensus-Sequenz (-300/-289) und das -60 Element (-73/-54). Diese Elemente spielen ebenfalls eine Rolle bei der Abschaltung der Transkription nach vorheriger Induktion. Beide DNA-Elemente binden Kernproteine, die mit Antikörpern, die gegen das *cfos* Protein gerichtet sind, reagieren.

Positive and negative control of the expression of the proto-oncogene cfos

Summary

The expression of the proto-oncogene cfos in mouse fibroblasts (NIH 3T3) has been analyzed. In untreated cells the expression of the cfos gene is very low. However, treatment of cells with physiological as well as non-physiological agents leads to a dramatic increase in cfos mRNA and cfos protein. Several inducers of the cfos expression have been described in the literature: UV-light (11), TPA (9), serum (5) and PDGF (6). In addition, I have found two further inducers of the cfos expression in NIH 3T3 cells: 8-Br-cAMP and the inhibitor of phosphodiesterase IMX. All agents induce a very rapid and transient expression of the cfos gene. By analysis of stably transfected deletion mutants of the human cfos gene, two DNA elements have been identified which mediate the induction by the agents described above: the SRE (serum responsive element; -319/-300; 18, 19) and the (+18/+38) element. Using bandshift experiments I have demonstrated that treatment of NIH 3T3 cells with UV-light, TPA and serum stimulate the binding of at least one nuclear protein to the SRE. In unstimulated cells the expression of the cfos gene is under negative control: by co-transfection experiments I have identified two DNA elements which bind repressing factors: the AP1 consensus sequence (-300/-289) and the -60 element (-73/-54). These elements are also involved in the shut off of transcription after induction. Both DNA elements bind nuclear proteins which react with antibodies directed against the cfos protein.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Zusammenfassung

Summary

Abkürzungen

1

Einleitung

3

Materialien

1. Chemikalien und Arbeitsmittel

8

2. Radiochemikalien

9

3. Bakterien und Zellen

9

4. Kulturmedien

9

Methoden

Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

11

2. Extraktion von Nukleinsäuren

11

3. Fällung von Nukleinsäuren

11

DNA-Klonierungstechniken

1. Restriktionsverdau

11

2. Dephosphorylierung von DNA

12

3. Auffüllen von 5'Überhängen

12

4. Abverdau von 5'Überhängen

12

5. Herstellung von Bal 31 Deletionen

12

6. Auftrennung von DNA-Fragmenten

13

6.1 Agarose-Gele

13

6.2 Polyacrylamid-Gele	13
7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	13
7.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen	13
8. Ligation	14
8.1 Ligation von Restriktionsfragmenten	14
8.2 Ligation von Linkern	14
8.3 Klonierung von Oligonukleotiden	14
9. Transformation von Bakterien	14
10. Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien	15
11. Konstruktion der Plasmide, graphische Darstellung	15
Zellkultur	
1. Trypsinbehandlung	19
2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	19
3. Transfektion	
3.1 stabile Transfektion	19
3.2 transiente Transfektion	20
4. Proteinpräparation für CAT-Assay	20
5. Induktion der cfos Expression	20
6. RNA-Präparation	21
7. Präparation von Kernextrakten	21
Analytische Methoden	
1. Radioaktive Markierung von S1 Proben	22
2. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	22
3. S1 Analyse	22
3.1 Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen	23
4. Bandshift- Analysen	23

5. Bestimmung der CAT-Aktivität	24
6. Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	25

Ergebnisse

1. Stimulation des Maus-cfos Gens in NIH 3T3 Zellen durch verschiedene Agenzien	27
2. Transkripte des menschlichen sowie des Maus-cfos Gens können durch S1 Analyse selektiv nachgewiesen werden	29
3. Konstruktion der Deletionsmutante pcfos ^H -750	31
4. Die Deletionsmutante pcfos ^H -750 ist durch verschiedene Induktoren ähnlich stimulierbar wie das Maus cfos Gen	32
5. Identifizierung eines DNA-Elementes, das für die Stimulation des cfos Gens durch UV-Licht, TPA und PDGF wichtig ist.	
5.1 Analyse von 5' Deletionsmutanten	34
5.2 Das SRE vor der Position -96 vermittelt UV-Licht-, TPA-, und Serum- und PDGF- stimulierte cfos Expression.	39
5.3 Die TPA- und Serum- Induzierbarkeit kann mit Hilfe des SRE's auf einen heterologen Promoter übertragen werden.	40
5.4 Die Bindung von Proteinen an das SRE wird durch UV-, TPA- und Serum- Behandlung stimuliert.	41
6. Identifizierung eines DNA-Elementes, das die residuale Induzierbarkeit des cfos Gen durch UV-Licht und TPA vermittelt.	44
7. Die Stimulation des cfos Gens durch 8-Br-cAMP und IMX	46
8. Kinetik der induzierten cfos Expression	50

9. Mindestens zwei DNA-Elemente sind in die Abschaltung der Transkription involviert.	51
10. Die Bedeutung der AP1 Konsensus-Sequenz und des -60 Elementes für die basale Expression des cfos Gens	55
11. Die Bindung spezifischer Kernproteine an die AP1 Konsensus-Sequenz und das -60 Element	57
Diskussion	62
Literaturverzeichnis	72

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AP1	activator protein1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
8-Br-cAMP	8-Bromo-3'-5'-Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CSF	colony stimulating factor
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylen- bis (oxyethylnitril) - tetraessigsäure
FBJ-MSV	Finkel-Biskis-Jinkins Murine Sarcoma Virus
FCS	fötale Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IMX	3 - Isobutyl - 1- methyl-xanthin
kb	Kilobasenpaare

kd	Kilodalton
KTartrat	Kaliumtartrat
MMTV	mouse mammary tumor virus
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
nt	Nukleotide
PDGF	platelet derived growth factor
PIPES	Piperazin - N,N', - bis (2 - ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	serum responsive element
SV 40	Simian Virus 40
Tab	Tabelle
TPA	12 - O - Tetradecanoylphorbol - 13 - acetat
tRNA	transfer - Ribonukleinsäure
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethyl - ethylendiamin
Tris	Tris - (hydroxymethyl) - aminoethan
U	Enzymeinheit
UV	ultraviolette Licht

Einleitung

Proto-Onkogene gehören zu einer Klasse von Genen, deren Produkte eine entscheidende Rolle bei der Wachstumskontrolle und Differenzierung eukaryontischer Zellen spielen. Zahlreiche Proto-Onkogene wurden ursprünglich als zelluläre Gegenstücke der retroviralen Onkogene entdeckt: diese Gene enthalten die Erbinformation, die Retroviren transformierende Eigenschaften verleiht. Intensive Untersuchungen der Proto-Onkogene /Onkogene haben ergeben, daß sie für Proteine kodieren, die wichtige Funktionen bei der Übertragung extrazellulärerer Signale in den Zellkern ausüben. Diese Proteine können als Vermittler zwischen einem extrazellulären Stimulus und der Reaktion der Zelle, d.h. einer veränderten Genexpression, betrachtet werden. Entsprechend ihrer Funktion können die Proteine der Proto-Onkogene in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- 1) Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren
- 2) Threonin- und Serin-Kinasen
- 3) GTP-bindende Proteine
- 4) Nukläre Proteine

Das Produkt des Proto-Onkogens *cfos* gehört zur Gruppe der nuklären Proteine. Sein virales Pendant ist das Onkogen *vfos*, das als transformierendes Gen des FBJ Murine Osteosarkoma Virus identifiziert wurde (1). Dieses Virus wurde in einigen Knochentumoren der Maus gefunden. Das virale *fos* Gen wurde als radioaktive Sonde zur Identifizierung und Klonierung des menschlichen und Maus- *cfos* Gens benutzt (2). Beide *cfos* Gene sind bezüglich ihrer Struktur und Nukleotidsequenz sehr ähnlich. Das menschliche *cfos* Gen (*cfos*^H) umfaßt ca. 3500 Basenpaare vom Promoter bis zur Prozessierungs-/

Polyadenylierungsstelle. Die kodierende Sequenz ist auf vier unterschiedlich lange Exons aufgeteilt, die von drei Introns unterbrochen sind. Das *cfos*^H Gen wird in ein 3500 Nukleotide langes Primärtranskript überschrieben, das schließlich zu einer 2200 Nukleotide langen mRNA prozessiert wird. Das Translationsprodukt dieser mRNA ist ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 41kd, bzw. einem apparenten Molekulargewicht von 55kd in der Gelelektrophorese. Diese Diskrepanz zwischen dem theoretischen und apparenten Molekulargewicht mag auf den hohen Prolingehalt zurückzuführen sein, der dem Protein möglicherweise eine ungewöhnliche Struktur verleiht. Neben dem 55kd Protein sind weitere Proteine höheren Molekulargewichts bekannt, die modifizierte Formen des 55kd Proteins darstellen (3).

Die Expression des *cfos* Gens ist in verschiedenen Geweben der Maus intensiv untersucht worden (4). Dabei ergab sich, daß nahezu alle Gewebe und Zelltypen außerordentlich geringe Mengen *cfos* mRNA sowie *cfos* Protein enthalten. Eine Ausnahme bilden Makrophagen und einige extra-embryonale Gewebe (z.B. Chorion, Placenta, visceraler Dottersack). Die Expression des *cfos* Gens kann jedoch in verschiedenen Zelltypen durch eine Behandlung mit physiologischen sowie nicht-physiologischen Agenzien stark stimuliert werden. Induktoren sind: Serum (5), bzw. gereinigte Wachstumsfaktoren wie FGF (5), EGF (5), PDGF (6), NGF (7) und CSF (8), der Tumorpromoter TPA (9), Ca²⁺-Ionophoren (10) sowie UV-Licht (11). In Makrophagen wurde auch eine Stimulation der *cfos* Expression durch synthetische Analoga des cAMP's beobachtet (12). Diese Agenzien stellen Signale für die Zelle dar, auf die diese mit physiologischen Veränderungen (wie z.B. Änderungen des Membranpotentials, Aktivierung der Na⁺/H⁺ Pumpe usw.) und schließlich auch einer veränderten Genexpression reagiert. Betrachtet man die Übertragungswege dieser Signale in die Zelle, so lassen sich die Agenzien grob in drei Gruppen einteilen: 1) Substanzen, die zu einer Aktivierung des Enzyms Proteinkinase C führen, 2) Substanzen, die cAMP-abhängige Proteinkinasen aktivieren und 3) Agenzien, die sich nicht in die beiden ersten Gruppen einordnen lassen, da sie entweder andere Übertragungswege benutzen oder aber ihre Übertragungswege unbekannt sind

(siehe auch Diskussion). Es wird klar, daß eine vermehrte *cfos* Synthese Endpunkt verschiedener Signalketten ist. Auf welcher Ebene der Genexpression ist diese positive Regulation wirksam, welche Mechanismen liegen ihr zugrunde und letztlich: benutzen verschiedene Agenzien die gleichen Regulationsmechanismen?

Für die Serum- und TPA- vermittelte Induktion des *cfos* Gens konnte gezeigt werden, daß sie primär auf einer Steigerung der Transkriptionsrate beruht (9). Diese hat eine Zunahme der mRNA Menge und schließlich auch der *cfos* Proteinmenge zur Folge. Die Antwort des *cfos* Gens auf ein Signal erfolgt sehr schnell, so daß es der Gruppe der "immediate early genes" zugeordnet werden muß. Bereits wenige Minuten nach Gabe eines Induktors nimmt die Transkriptionsrate zu; sie erreicht ihr Maximum nach 15-20 Minuten und fällt nach 30-60 Minuten auf den ursprünglichen Wert ab. Die Reaktion des *cfos* Gens zeichnet sich also durch zwei Charakteristika aus: eine schnelle Anschaltung der Transkription sowie einen schneller Stop. Da außerdem die Halbwertszeit der *cfos* mRNA sehr kurz ist, ca. 10-15 Minuten (13), ist die Zunahme der *cfos* mRNA nach Induktorgabe nur kurzfristig. Eine schnelle Zu- und Abnahme wird auch bei der *cfos* Proteinmenge beobachtet (5, 6).

Welche Mechanismen regulieren die Transkription eukaryontischer, protein-kodierender Gene?

In den letzten Jahren wurden viele Informationen über die Regulation der Transkription gewonnen. Sie wird im wesentlichen durch zwei Faktoren bestimmt: durch *cis*-wirkende DNA-Elemente, die in ihrer Gesamtheit den Promoter eines Gens ausmachen (Übersichtsartikel, 14) sowie *trans*-wirkende Faktoren, Proteine, die mit den *cis*-wirkenden Elementen in Wechselwirkung treten (Übersichtsartikel, 15). Zu den *cis*-wirkenden Elementen gehören sowohl solche, die eine präzise Initiation der mRNA Synthese ermöglichen, als auch andere, die die Effizienz der Transkription bestimmen.

Die präzise Initiation der mRNA Synthese wird bei einer Vielzahl eukaryontischer Gene, auch dem *cfos* Gens, durch ein AT-reiches DNA-Sequenzmotiv, die TATA-Box, bestimmt. Sie befindet sich in der Regel 25-35bp 5' von der mRNA Startstelle. Die Effizienz der Initiation der

Transkription wird von DNA-Sequenzmotiven bestimmt, die sich grob in zwei Gruppen einteilen lassen: 1) die "upstream" Elemente und 2) die "Enhancer". Bei den "upstream" Elementen handelt es sich um DNA-Sequenzen, die sich ca. 40-150 bp 5' von der Startstelle der Transkription befinden. Ihre Wirkung auf die Effizienz der Transkription ist in starkem Maße positionsabhängig. Beispiele für diese Elemente sind die CAAT-Box (16) und die GC-Box (17). Beide Elemente sind im *cfos*^H Gen nicht vorhanden. Im Gegensatz zu den "upstream" Elementen wirken die "Enhancer" positionsunabhängig: sie können bis zu mehrere kbp 5' oder auch 3' von der Initiationsstelle der Transkription entfernt sein. Ihre Wirkung ist unabhängig von ihrer Orientierung relativ zur TATA-Box. Eine Reihe von "Enhancern" übt nicht nur einen stimulierenden Effekt auf die basale Expression eines Gens aus, sondern ist ebenfalls an der Vermittlung induzierter Transkription beteiligt. Es konnte gezeigt werden, daß für die serum-stimulierte Synthese der *cfos* mRNA ein induzierbarer "Enhancer" verantwortlich ist: das SRE (= serum responsive element), das sich an Position -319/-300 im menschlichen *cfos* Gen befindet (18, 19). Interessanterweise überlappt das SRE mit der Konsensus-Sequenz für ein weiteres cis-wirkendes DNA-Element, einer AP1 Bindungsstelle. AP1 Bindungsstellen sind bei einer Reihe von Genen, z.B. dem menschlichen Kollagenase Gen, als TPA-induzierbarer "Enhancer" identifiziert worden (20a, 20b). Diese Sequenz scheint jedoch für die serum-stimulierte *cfos* Expression keine Rolle zu spielen (19).

Neben positiv wirkenden DNA-Elementen wurden in letzter Zeit auch Hinweise auf negativ-wirkende Elemente entdeckt. So wurde für das *cfos*^H Gen festgestellt, daß seine Expression in nicht-stimulierten Zellen durch negativ wirkende Faktoren kontrolliert wird (21). Über den Mechanismus dieser negativen Genregulation ist jedoch noch nichts bekannt.

In den letzten Jahren wurden nicht nur eine Vielzahl cis-wirkender DNA-Elemente charakterisiert, sondern auch einige Proteine, die an diese Elemente binden, identifiziert. Eines davon ist das trans-wirkende Protein AP1 (= activator protein1), das u.a. an den SV40 Enhancer, den "basal level enhancer" des Metallothioneingens und an das TRE (= TPA responsive element) des

Kollagenasegens bindet (22). Der serum-induzierbare "Enhancer" des cfos Gens dagegen bindet ein anderes Protein: das SRF (= serum responsive factor) (23). Die serum-stimulierte Expression des cfos Gens beruht auf einer Interaktion zwischen dem cis-wirkenden SRE und dem trans-wirkenden SRF.

Damit stellt sich die Frage, ob allen Induktoren der cfos Expression eine Beteiligung des SRE/SRF's gemeinsam ist, oder aber mehrere cis-wirkende Elemente existieren, die nur mit je einem Induktor-spezifischen, trans-wirkenden Faktor in Wechselwirkung treten?

Ziel meiner Dissertation war daher die Identifizierung der DNA-Sequenzmotive, die für die Induktion des cfos Gens durch andere Agenzien als Serum verantwortlich sind. Dazu wurden TPA, UV-Bestrahlung, der Wachstumsfaktor PDGF, ein synthetisches Analogon des cAMP's und der Phosphodiesterase Inhibitor IMX ausgewählt. Dabei war von besonderem Interesse, ob Agenzien, die verschiedenen Induktorgruppen angehören, über das gleiche DNA-Element wirken. Zusätzlich wurde auch die negative Regulation des cfos Gens untersucht. Für beide Arten der cfos Regulation gelang es, weitere cis-wirkende DNA-Elemente zu charakterisieren. Daneben wurde ein trans-wirkendes Protein, das an zwei negativ-wirkende Elemente bindet, näher untersucht.

Materialien

1. Chemikalien und Arbeitsmittel

Acetyl Coenzym A	Pharmacia, Freiburg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose Typ II	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
Bal 31 Exonuklease	Gibco-BRL, Karlsruhe
Biogel P60	BioRad, München
8-Br-cAMP	Sigma, München
Caesiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Desoxynukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dichlordimethylsilan	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dithiotreitol	Gibco-BRL, Karlsruhe
DNA Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Schwalbach
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Gibco, Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glasplatten für Elektrophorese	Renner, Darmstadt
Haftsilan	Wacker Chemie, München
HEPES	Sigma, München
IMX	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Machery und Nagel, Düren
Lachs-Spermien DNA, Typ III	Sigma, München
Linker DNA	New England Biolabs, Schwalbach
NACS-Prepac Säulen	Gibco-BRL, Karlsruhe
N, N'-Methylen-bisacrylamid	BioRad, München
Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
PDGF (human, Reinheitsgrad 90%)	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe

PIPES
 PMSF
 Poly dI:dC/Poly dI:C
 Proteinase K
 Quickszint
 Restriktionsendonukleasen

transfer-RNA
 T4 DNA-Ligase
 T4 Polynukleotid-Kinase
 TEMED
 Tris
 Trypsin
 Whatman 3MM Papier
 Zellkulturschalen

Sigma, München
 Sigma, München
 Pharmacia, Freiburg
 Merck, Darmstadt
 Zinsser, Frankfurt
 ABL, Basel
 Boehringer, Mannheim
 Gibco-BRL, Karlsruhe
 Promega Biotec, Heidelberg
 Pharmacia, Freiburg
 Boehringer, Mannheim
 Boehringer, Mannheim
 New England Biolabs, Schwalbach
 BioRad, München
 Sigma, München
 Gibco, Karlsruhe
 Bender und Hobein, Karlsruhe
 Falcon, Becton u. Dickinson,
 Heidelberg

2. Radiochemikalien

D-threo-(dichloroacetyl-1-¹⁴C)-
 Chloramphenicol (7.4MBq/ml,
 1.96 GBq/mmol)
 γ -³²P ATP (>185 TBq/mmol)
 α -³⁵S ATP (14.8 TBq/mmol)

Amersham Buchler, Braunschweig
 Amersham Buchler, Braunschweig
 Amersham Buchler, Braunschweig

3. Bakterien und Zellen

E. coli RRI M15

F⁻, hsd, ara-14, pro A2, lac YI,
 ton A 21, sup E44, I⁻;
 erhalten von U. Rüter, Heidelberg
 embryonale Mausfibroblasten;
 entspricht der 3T3 Zelle der
 American Typ Culture Collection;
 erhalten von P. Gruss, Heidelberg

NIH 3T3

4. Kulturmedien

L-Broth

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

Bakterien-Selektionsmedium

L-Broth mit 100 µg/ml Ampicillin

Kulturmedium für NIH 3T3 Zellen

DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeitsprotokolle der Methodensammlung von Maniatis et al. entnommen (24).

Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine $OD_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide.

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 eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) gegeben, kräftig durchmischt und kurz abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

3. Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit NaAc (pH 5.2) auf eine Endkonzentration von 0.2M gebracht und mit 2 Volumina Ethanol gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei -20°C wurde das Präzipitat für 20 Minuten bei 8800xg abzentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und schließlich unter Vakuum getrocknet.

DNA Klonierungstechniken

1. Restriktionsverdau

Eine Enzyemeinheit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μg DNA des Phagen λ in einer Stunde vollständig verdaut. In der Regel wurde ein 2-3facher Überschuss Enzym verwendet, um einen vollständigen Restriktionsverdau zu

gewährleisten. Für die meisten Enzyme wurde als Reaktionspuffer O'Farrell's Universalpuffer (3.3mM Tris-Acetat pH 7.9, 6.6 mM KAcetat, 10mM MgAcetat, 0.05mM DTT und 10 µg nuklease-freies BSA) verwendet. Das Volumen betrug 10 µl/µg DNA. Für die Enzyme Ava I und AccI wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet.

2. Dephosphorylierung von DNA

5' und 3' Überhänge

Restriktionsverdauete, gereinigte DNA wurde mit 4 Einheiten alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm in 50 µl 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin 15 min bei 37°C, dann 15 min bei 56°C inkubiert. Nach erneuter Enzymzugabe wurde dies noch einmal wiederholt.

3. Auffüllen von 5' Überhängen

1 µg verdaute und gereinigte Plasmid-DNA wurde in 10 µl 7mM Tris-HCl pH7.5, 7mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT mit 1U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) in Anwesenheit von 50 µM dNTP Mix für 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die DNA mit Ethanol präzipitiert.

4. Abverdau von 5' Überhängen

1 µg verdaute und gereinigte Plasmid-DNA wurde in 0.3M NaCl, 30mM NaAc, 3mM ZnSO₄ mit 1 U S1 Nuklease 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die DNA mit Ethanol präzipitiert.

5. Herstellung von Bal 31 Deletionen

25 µg geschnittene und gereinigte Plasmid-DNA wurde in 300 µl Bal 31 Puffer (12mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1) mit 1 U Bal 31 bei 30°C inkubiert. In 30s Abständen wurden dem Reaktionsgemisch je 100 µl entnommen und mit EGTA zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt. Durch die Variation der Zeitabstände konnten entsprechend unterschiedlich große Deletionen erzielt werden. Die deletierten DNA Fragmente wurden anschließend durch eine Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und durch Zugabe von Ethanol präzipitiert.

6. Auftrennung von DNA Fragmenten

6.1 Agarose-Gele

0.8-2% Agarose Typ II wurden in 200 ml Laufpuffer (40mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaAc pH 8.2) durch Erhitzen gelöst und der Gellösung wurden 2µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Gellösung wurde in eine 18x30 cm große horizontale Kammer gegossen und mit Hilfe eines Kamms wurden Taschen zum Auftrag der Proben ausgespart. Das Gel wurde mit Laufpuffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 150V. Über einer UV-Lampe (320nm) konnten die DNA Fragmente sichtbar gemacht werden.

6.2 Polyacrylamid-Gele

Es wurden 6%ige Acrylamidgele aus einer Stammlösung mit 29 Gew.% Acrylamid und 1 Gew.% N, N', -Methylenbisacrylamid hergestellt. Die Endkonzentrationen im Gel waren: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5mM EDTA pH 8.3, 0.1% TEMED und 1% Ammoniumperoxosulfat. Die Gele waren 12x15 cm groß und 0.1 cm dick. Laufpuffer: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.3. Die Auftrennung erfolgte bei 300V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5min mit einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml H₂O) gefärbt und die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht.

7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA wurde in einem Agarose-Gel Typ II aufgetrennt. Das zu isolierende Fragment wurde im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell 2-3 mm unterhalb des Fragmentes ein Spalt in die Agarose geschnitten. In diesen Spalt wurde ein Stückchen DEAE-Papier gesteckt und anschließend die Gelelektrophorese fortgesetzt bis das DNA-Fragment an das DEAE-Papier gebunden war. Dann wurde das DEAE-Papier aus dem Gel genommen, kurz mit destilliertem H₂O abgespült und anschließend in 100-400 µl 1.5 M NaCl für 15min bei 65°C inkubiert. Ein Eppendorf Röhrchen wurde mit einem kleinen Loch versehen, mit Glaswolle gestopft und in eine zweites Eppendorf Röhrchen gesteckt. Das DEAE-Papier sowie die Flüssigkeit wurden über die Glaswolle geschichtet und Papier und Flüssigkeit durch kurze Zentrifugation getrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Ethanol präzipitiert.

7.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen

Die DNA wurde UN bei 50°C aus dem Gelstück in 0.2 M NaCl in TE eluiert,

über Glaswolle gereinigt und anschließend mit Ethanol präzipitiert.

8. Ligation

8.1 Ligation von Restriktionsfragmenten

Die DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und mit 1U T4 DNA Ligase/ pmol Enden versetzt. Die Inkubation erfolgte in 20µl 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 250 µg/ml BSA und 1 mM ATP ÜN bei 16°C.

8.2 Ligation von Linkern

1 µg Linker wurden mit 10U Polynukleotidkinase in Anwesenheit von 10 mM ATP phosphoryliert. Die Inkubation erfolgte in 10 µl 70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl₂ für 30min bei 37°C. 2µl der phosphorylierten Linker wurden zu 1µg gereinigter blunt end DNA gegeben. Die Ligation erfolgte ÜN bei 15°C in 10µl 70 mM Tris-HCl pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP mit 1U T4 DNA Ligase. Anschließend wurde das Volumen mit TE auf 100 µl erhöht, eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert. Durch einen nachfolgenden Restriktionsverdau wurden die Linkerketten getrimmt. Der Restriktionsverdau wurde mit 40-60U Enzym über 3h durchgeführt. Auf einem Agarose-Gel wurde die DNA von den überschüssigen Linkern abgetrennt.

8.3 Klonierung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden auf einem Gene Assembler von Pharmacia hergestellt. Die Oligonukleotide wurden ÜN in 1ml 25% Ammoniak vom Support abgespalten. Je 1µl der beiden komplementären Oligonukleotide wurden zusammen in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100µl 6.25 mM Tris-HCl pH 8.5, 3 mM MgCl₂ gelöst. Nach Kinasierung der Oligonukleotide wurde eine 1:50 Verdünnung im gleichen Puffer zur Annealing-Reaktion auf 100°C gebracht und anschließend langsam auf RT abgekühlt. 2µl von diesem Annealing-Ansatz wurden mit 100ng Vektor in 40µl Volumen nach Standardprotokoll ligiert.

9. Transformation von Bakterien

Herstellung kompetenter E.coli Zellen: Das gewünscht Volumen L-Broth wurde 1:100 mit einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer

Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml inkubiert. Die Kulturen wurden 5min in Eis gestellt und dann die Zellen durch Zentrifugation bei $2000 \times g$ pelletiert. Das Pellet wurde in eiskaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert und 30min in Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 1ml eiskaltem 100 mM CaCl_2 aufgenommen.

Transformation: 100 μl kompetente E.coli Zellen wurden mit 1-100 fMol DNA gemischt und 30min in Eis, dann 2min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 1ml L-Broth zugegeben und die Ansätze weitere 45min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation pelletiert und nach Dekantieren des Mediums auf Antibiotika-haltige Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C .

10. Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien

1ml (200ml) rekombinante Bakterien wurden ÜN bei guter Belüftung bis zur stationären Phase aufgewachsen. Die Zellen wurden durch 5min Zentrifugation bei $5000 \times g$ pelletiert und das Pellet in 100 μl (7ml) Lösung A (50 mM Glukose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) suspendiert. Anschließend wurden 200 μl (14ml) Lösung B (0.2M NaOH, 1% SDS) unter vorsichtigem Mischen zugegeben und der Ansatz 10min in Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 μl (10ml) Lösung C (2M Essigsäure, 3M NaAc) wurde der Ansatz weitere 10min in Eis inkubiert. Anschließend wurde 20min bei $16800 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 3ml Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA aufgenommen, mit 2.87g Caesiumchlorid und 0.3ml Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) gemischt. Das Volumen der Lösung wurde durch Zugabe von Auffülllösung (47.7g Caesiumchlorid, 5ml Ethidiumbromid, 50ml H_2O) auf 5.3ml gebracht und in einem Beckman Vertikalrotor Typ 65 16h mit 55000rpm zentrifugiert. Die plasmid-haltige Bande wurde mit einer Spritze abgezogen und erneut unter denselben Bedingungen 6h zentrifugiert. Wiederum wurde die plasmid-haltige Bande abgezogen, mit 2 Volumina H_2O verdünnt, dreimal mit H_2O gesättigtem Butanol extrahiert und ohne Salzzugabe mit Ethanol gefällt.

11. Konstruktion der Plasmide

Als Ausgangskonstrukt wurde $\text{pcf}^{\text{H}}-750$ verwendet (ausführliche Beschreibung: siehe Ergebnisse, Kapitel 3). Davon wurden die Plasmide $\text{pcf}^{\text{H}}-124$ und $\text{pcf}^{\text{H}}-96$ wie folgt abgeleitet: die Sequenzen zwischen der Bam HI Schnittstelle (-750) und der Not I Schnittstelle (-124) bzw. der Bss HII Schnittstelle (-101) wurden deletiert und die 5'überhängenden Enden entweder

mit Klenow Polymerase aufgefüllt (-124) oder mit S1 Nuklease abverdaut (-96). Nach Anheften von Cla I Linkern wurden die Plasmide rezirkularisiert. Die Plasmide pcfos^H-86, pcfos^H-79 und pcfos^H-52 wurden durch 5'Bal 31 Deletion erhalten: pcfos^H-750 wurde durch Not I Verdau linearisiert und mit der Exonuklease Bal 31 behandelt. Die Enden wurden mit Klenow Polymerase aufgefüllt und Bam HI Linker angeheftet. Nach Bam HI Verdau wurden die Plasmide rezirkularisiert. Das Plasmid pcfos^H Δ+12/+45 wurde durch 3'Bal 31 Deletion erhalten: pcfos^H-750 wurde durch Xba I Verdau linearisiert und mit Bal 31 behandelt. Die Enden wurden mit Klenow Polymerase aufgefüllt und XbaI Linker angeheftet. Nach Xba I Verdau wurden die Plasmide rezirkularisiert. Daraus entstand das Plasmid pcfos^H Δ+12/+80. Dieses Plasmid wurde mit Xba I und Nco I (2531) verdaut und ein entsprechendes Xba I/Nco I Fragment aus dem Plasmid pcfos^H-750 wurde eingefügt. Die Doppelmutante pcfos^H Δ-327/-307//+12/+45 wurde durch Kombination der Plasmide pcfos^H Δ-327/-307 und pcfos^H Δ+12/+45 erhalten. Dazu wurde aus dem Plasmid pcfos^H Δ-327/307 ein Eco RI/Not I Fragment (Partial-Verdau) ausgeschnitten und in das Eco RI/Not I geschnittene Plasmid pcfos^H Δ+12/+45 inseriert. Das Plasmid pcfos^H Δ-65/52 wurde durch Kombination der 5'Deletionsmutante pcfos^H-52 und der 3'Deletionsmutante pcfos^H Δ-65/+45 erhalten: aus dem Plasmid pcfos^H Δ-65/+45 wurde ein Bam HI/Xba I Fragment ausgeschnitten (-750/-65), mit Bam HI Linkern versehen und in das Bam HI verdaute Plasmid pcfos^H-52 inseriert.

Die Plasmide pcfos^H-363, pcfos^H-306 und pcfos^H Δ-327/-307 wurden von R. Treisman zur Verfügung gestellt und sind in der Literatur (18) beschrieben.

Die Insertionsmutanten pcfos^H (SRE) - 96 und pcfos^H (SRE+AP1) - 96 wurden durch Klonierung von synthetischen Oligonukleotiden in die Cla I Schnittstelle des pcfos^H-96 erhalten. Die Oligonukleotide hatten die folgende Sequenz:

5'CGGGATGTCCATATTAGGACATCT3'(SRE) und

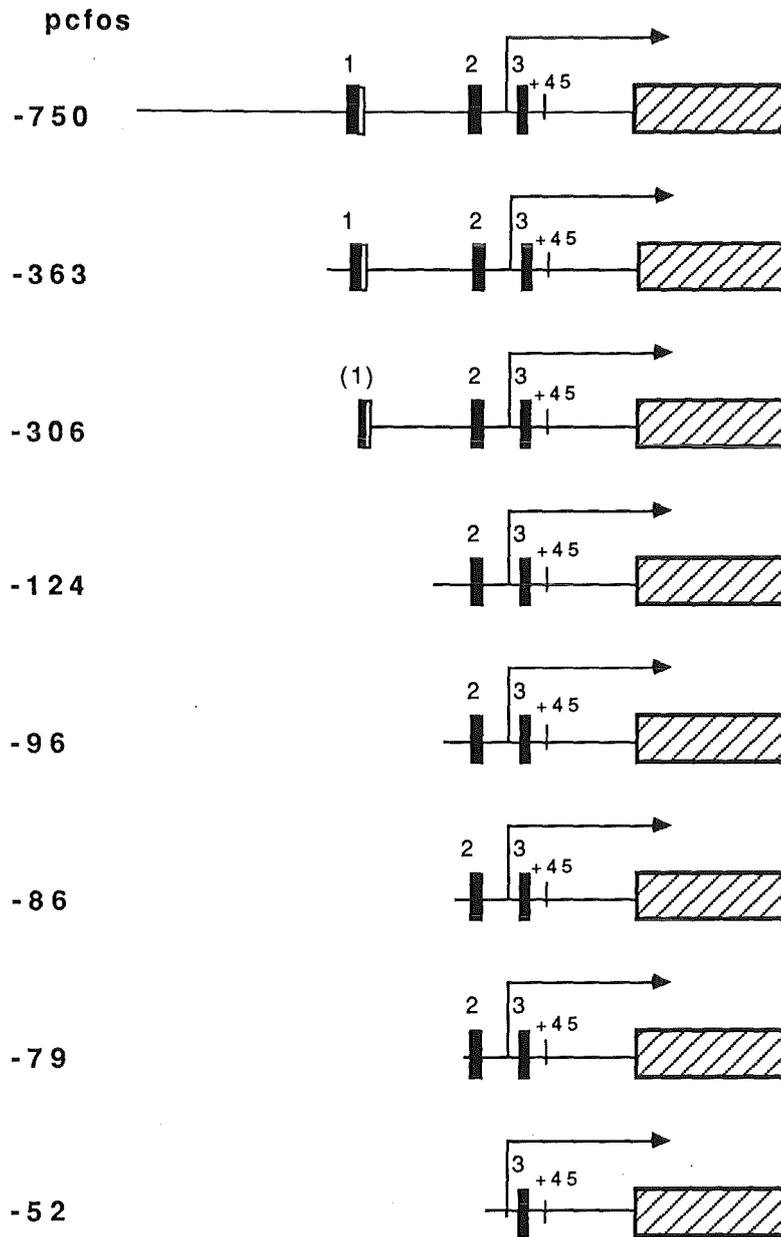
5'CGGGATGTCCATATTAGGACATCTGCGTCAGCAG3'(SRE+AP1).

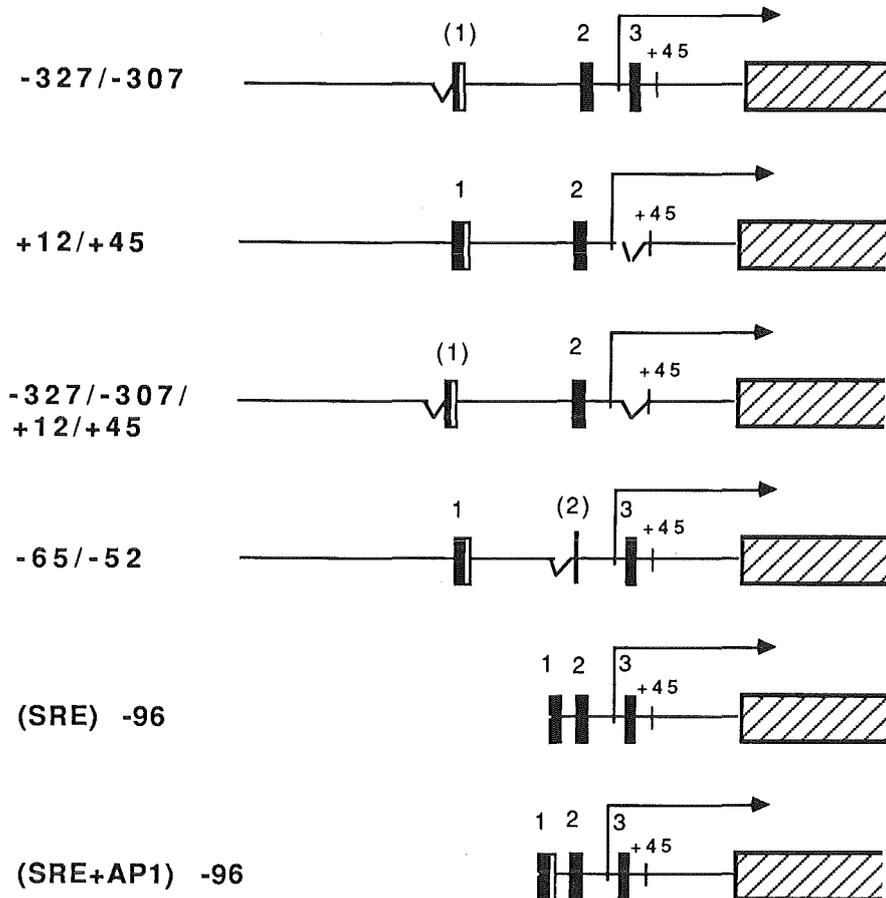
Das Plasmid (SRE)- Tk-CAT wurde durch Insertion des SRE's in die Acc I Schnittstelle in den Polylinker des Vektors pEMBL 8+ (33) erhalten.

Das Plasmid OVEC-1(+18/+38) wurde durch Insertion eines synthetischen Oligonukleotides in die Acc I Schnittstelle (+41) des OVEC-1 (34) erhalten. Die Sequenz des Oligonukleotides ist: 5'CGGAGCAACTGAGAAGCCAAGACT3'.

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung der entscheidenden Bereiche bestätigt.

Mutanten des menschlichen cfos Gens





Alle in dieser Arbeit verwendeten Mutanten des menschlichen *c-fos* Gens sind dargestellt. Die Initiationsstelle der Transkription ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die kodierende Region ist durch ein schraffiertes Rechteck gezeigt. Cis-wirkende DNA-Elemente sind durch schwarze Balken dargestellt: 1=SRE (-319/-300), die weiße Umrahmung am rechten Rand deutet die AP1-Konsensus-Sequenz (-300/-292) an. 2= -60 Element (-73/-54). 3= (+18/+38) Element. Die äußeren Grenzen der Elemente sind aus "footprint" Daten abgeleitet: SRE (R. Treisman), -60 Element und (+18/+38) Element (B. Gloss). Die cis-wirkenden DNA-Elemente sowie interne Deletionen sind zur Verdeutlichung nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Zellkultur

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen (Durchmesser 94mm) unter 6% CO₂ in einem Brutschrank bei 37°C gezogen. Den Zellen wurden 10ml Medium zugesetzt, das alle 3 Tage gewechselt wurde. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und rekultiviert. Alle 4-6 Wochen wurden frische NIH 3T3 Zellen aus dem Stock entnommen. Stabil transfizierte Zellen wurden in großer Menge vermehrt, eingefroren und für jedes Experiment wurde ein frisches Aliquot verwendet.

1. Trypsinbehandlung

Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 5ml 0.25%igem Trypsin gewaschen und mit weiteren 2ml Trypsin 5min bei RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/94mm Gewebekulturschale ausgesät.

2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, zentrifugiert und in 1ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und zunächst 30min in Eis inkubiert, dann mehrere Stunden bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

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

3. Transfektionen

Die Transfektionen wurden mit einer modifizierten Form der Calciumphosphatpräzipitationsmethode durchgeführt (25).

3.1 Stabile Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden 8×10^5 Zellen/94mm Gewebekulturschale ausgesät. Zur Transfektion wurden pro Schale 10µg Träger-DNA aus Lachs-Spermien, 10-15µg des entsprechenden Plasmids und 1µg pSV2neo (32) (dieses Plasmid trägt den Selektionsmarker Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase) verwendet. Die DNA wurde mit 125 mM CaCl₂ in HBS

(8g/l NaCl, 0.37g/l KCl, 0.125g/l Na₂HPO₄x2H₂O, 0.1g/l Dextrose und 5g/l HEPES pH 7.05) in einem Volumen von 1ml kopräzipitiert. Das Präzipitat wurde in das Medium gegeben und 12-14h auf den Zellen gelassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit Medium ohne Serum gewaschen und schließlich frisches Kulturmedium mit Serum zugegeben. Nach weiteren 24h wurden die Zellen 1:5 trypsinisiert und in Selektionsmedium (400 µg/ml G418) ausgesät. Nach ca. 10-14 Tagen hatten sich G418 resistente Kolonien gebildet. Die Kolonien wurden abtrypsinisiert und zu Massenkulturen vereinigt.

3.2 Transiente Transfektion

Je 15 µg fos/CAT (-711/+45) Plasmid und 2-10 µg gereinigte und "annealte" Oligonukleotide wurden transfiziert. Die DNA Gesamtmenge wurde durch Zugabe von SP64 Plasmid auf 25 µg/Ansatz gebracht. Diese Mischung wurde wie unter 3.1 beschrieben mit CaCl₂ in HBS Puffer kopräzipitiert. Das Präzipitat wurde in das Medium gegeben und 12-14h auf den Zellen gelassen. Dann wurden die Zellen gewaschen und für 2min mit 25% Glycerin geschockt, dreimal mit Kulturmedium ohne Serum gewaschen und schließlich mit frischem Medium (10% FCS) für 40h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet.

4. Proteinpräparation für CAT-Assay

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen und in 1ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden 5min mit 8800xg abzentrifugiert und in 100 µl 250 mM Tris-HCl pH 7.6 resuspendiert. Anschließend wurden sie durch dreimaliges Frieren (-80°C) und Tauen (37°C) aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden 10min bei 8800xg abzentrifugiert und der protein-haltige Überstand bei -20°C aufbewahrt.

5. Induktion der cfos Expression

Die Zellen wurden in 94mm Gewebekulturschalen bis zum Erreichen von 70-80% Konfluenz kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 10ml frisches Medium mit 0.5% FCS zugegeben. Nach 40-48h wurde das Medium gesammelt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Medium wieder auf die Zellen gegeben, entweder ohne weitere Zugabe (Kontrolle) oder nach Zugabe von TPA (200ng/ml), IMX (0.5mM) oder 8-Br-cAMP (1mM). TPA und IMX lagen als

1000fach konzentrierte Stammlösungen in DMSO vor. 8-Br-cAMP wurde als 100fach konzentrierte Stammlösung in H₂O bereit. Die UV-Bestrahlung wurde mit PBS gewaschenen Zellen durchgeführt: es wurde UV-Licht der Wellenlänge 254nm und eine Dosis von 30J/m² verwendet. Nach Bestrahlung wurde das ursprüngliche Medium wieder auf die Zellen gegeben. Zur Serum-Stimulation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 10ml frisches Medium mit 20% FCS auf die Zellen gegeben. Zur PDGF Induktion wurden 10ml frisches Medium mit 5ng PDGF/ml auf PBS gewaschene Zellen gegeben. PDGF wurde als 1000fach konzentrierte Stammlösung in 1mM Essigsäure/1% BSA bereit.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Behandlungen für 30min durchgeführt.

12. RNA-Präparation (26)

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zellen aus 4-5 Gewebekulturschalen wurden in 5ml PBS mit einem Gummispatel abgeschabt und 5min bei 4°C mit 670xg abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml PBS resuspendiert und mit 1ml 2x PK-Puffer (0.2M Tris-HCl pH 7.5, 25mM EDTA, 0.3M NaCl und 2% SDS) versetzt. Durch mehrfaches Aufziehen der Lösung durch eine Kanüle wurde die hochmolekulare DNA geschert. Es wurden dann 50 µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben und das Ganze 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Die nukleinsäurehaltige Oberphase wurde mit einem Volumen 4M LiCl versetzt. Die RNA wurde ÜN bei 4°C ausgefällt und 30min bei 16800xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl H₂O gelöst, einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit zwei Volumina Ethanol präzipitiert, anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und schließlich unter Vakuum getrocknet.

13. Präparation von Kernextrakten (27)

NIH 3T3 Zellen wurden in 15cm Gewebekulturschalen bis zu 70-80% Konfluenz kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich frisches Medium mit 0.5% FCS zugegeben. Nach 40-48h wurden die Zellen wie unter Punkt 11 beschrieben, behandelt. Nach 30minütiger Behandlung wurde das Medium abgegossen, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. (Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.) Die Zellen wurden 10min bei 2000rpm abzentrifugiert, noch einmal mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Volumen des Zellsedimentes wurde bestimmt (PCV= packed cell volume).

Die Zellen wurden in 5 PCV Puffer A (10mM Hepes-KOH pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT) aufgenommen und für 10min auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 10min bei 5000rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2 PCV Puffer A aufgenommen und in einen Dounce Homogenisator passender Größe gefüllt. Die Zellen wurden durch 10 Stöße mit dem S-Kolben aufgebrochen, wobei die Zellkerne freigelegt wurden. Die Zellkerne wurden durch 10min Zentrifugation bei 2500rpm pelletiert. Das Kernsediment wurde nach der Zentrifugation in Puffer C (20mM Hepes-KOH pH 7.9, 25% Glycerin, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 1mM PMSF) aufgenommen (250 µl Puffer/10⁸ Zellen). Die Lösung wurde mit 10 Stößen im Dounce Homogenisator bearbeitet. Die Suspension wurde in ein Becherglas überführt und 30min auf dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde die Proteinlösung 5-6h mit 3 Pufferwechseln gegen 200 Volumina Puffer D dialysiert (20mM Hepes-KOH pH 7.9, 20% Glycerin, 40mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 1mM PMSF). aufgenommen. Der dialysierte Extrakt wurde in einer Eppendorf Tischzentrifuge für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde in kleine Portionen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Analytische Methoden

1. Radioaktive Markierung von S1 Proben

Ca. 1pmol dephosphorylierte DNA Fragmente wurden mit 10U Polynukleotidkinase und 100 µCi γ-(³²P) ATP in 30 µl 50mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM Spermidin, 0.1 mM EDTA für 30min bei 37°C inkubiert. Die radioaktiv markierte DNA wurde durch Gelfiltration über eine Biogel P60 Säule von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt.

2. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Zur Markierung von 20ng Oligonukleotid wurden 50 µCi γ-(³²P) ATP eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren wie oben beschrieben. Über eine NACS prepac Säule wurde das markierte Oligonukleotid von den freien Nukleotiden abgetrennt. Das markierte Oligonukleotid wurde nach Zugabe von 10 µg t-RNA mit Ethanol präzipitiert und unter Vakuum getrocknet.

3. S1 Analyse

Ca. 20 µg Gesamt-RNA wurden mit 20-50 fMol 5'endmarkierter S1 Probe in 0.2M NaAc mit Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 80% Ethanol und Trocknen

unter Vakuum wurde das Präzipitat in 10 µl Hybridisierungspuffer (80% deionisiertes Formamid, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA und 0.4 M NaCl) gelöst, 5min bei 85°C denaturiert und ÜN bei 50°C hybridisiert. Der S1 Verdau wurde durch Zugabe von 100 µl eiskaltem S1 Puffer (300 mM NaCl, 30 mM NaAc pH 4.5, 3 mM ZnSO₄, 10 µg/ml denaturierte Lachsspermien DNA) inklusive 35U S1 Nuklease gestartet. Die Inkubation wurde für 90min bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gestoppt und die Reaktionsprodukte mit Ethanol präzipitiert. Die Präzipitate wurden abzentrifugiert, zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

3.1 Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen

Das getrocknete Präzipitat wurden in 3.5 µl Sanger Probenpuffer (100 ml deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA, 0.03g Xylenxanol, 0.03g Bromphenolblau) gelöst, 5min bei 85°C inkubiert, sofort in Eis gestellt und rasch auf das Gel aufgetragen.

Ein Gel war folgendermaßen vorbereitet worden: 6% Acrylamid, 8 M Harnstoff, in 90 mM Tris-HCl pH 8.3, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA wurden nach Zugabe von 0.1% TEMED und 0.5% Ammoniumperoxosulfat zwischen zwei Glasplatten (20x40) mit 0.15 mm dicken Abstandshaltern gegossen.

Eine der Glasplatten war zuvor mit 2 ml Dichlordimethylsilan silikonisiert worden; die andere war mit 5 ml 0.3% Haftsilan in Ethanol mit 0.15 ml Essigsäure beschichtet worden.

Die Gele wurden 20min bei 30 W vorelektrophoresiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte ebenfalls bei 30W. Laufpuffer war 90 mM Tris-HCl pH 8.3, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA.

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

4. Bandshift Analysen

³²P endmarkierte Oligonukleotide, poly dI:dC sowie nicht-markierte Oligonukleotide wurden in Bandshift Puffer (20 mM Hepes-KOH, 20% Glycerin, 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSE, 5 mM Spermidin) gelöst. Alle Reaktionen wurden in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Die einzelnen Komponenten wurden in der folgenden Reihenfolge zusammengegeben: Bandshiftpuffer, poly dI:dC, (Kompetitor-Oligonukleotide) und 4 µg Kernextrakt (SRE, -60 Element), bzw. 10

μg Kernextrakt (AP1 Konsensus-Sequenz). Diese Ansätze wurden 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 50 fMol markiertes Oligonukleotid zugegeben und weitere 15min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden in nativen, 4%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Gel- und Lauf- Puffer waren: 22.5 mM Tris-HCl pH 8.3, 22.5 mM Borsäure, 0.25 mM EDTA. Die Gelelektrophorese wurde für 90min bei 0.15W/cm bei RT durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für 10min in 10% Essigsäure fixiert, getrocknet und autoradiographiert.

Bandshift Analysen in Gegenwart von anti-fos Antikörpern (die Antikörper wurden von R. Müller, Marburg zur Verfügung gestellt): Kernextrakte wurden ÜN bei 0°C mit einem polyklonalen Kaninchen Antiserum (455), bzw. einem monoklonalen Antikörper (411) inkubiert (0.125 μl Antikörper/1 μg Kernprotein). Die weiteren Komponenten wurden wie oben beschrieben zusammengegeben und für 30min bei 0°C inkubiert. Die Gelelektrophorese wurde für 3h bei 4°C durchgeführt.

5. Bestimmung der CAT-Aktivität (28)

Die Proteinkonzentration der Extrakte aus transient transfizierten Zellen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Dazu wurden 5 μl Extrakt mit 995 μl Lösung I (2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH) gemischt und mit 2 ml Lösung IV (1 ml 2% KTartart, 1 ml CuSO_4 , 100 ml Lösung I) versetzt und 10min bei RT inkubiert. Dann wurden 0.2 ml frisch angesetzte 50%ige Folin Lösung (in H_2O) zugegeben und die Reaktionslösung 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 735 nm bestimmt. Mit Hilfe von Standard-Proben (BSA) wurde eine Eichkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentrationen in den Proben abgeleitet wurden.

Für den CAT-Assay wurden 1.25 μCi ^{14}C -Chloramphenicol unter Vakuum getrocknet und in 300 μg Proteinlösung aufgenommen. Mit 0.25 M Tris-HCl pH 7.6 wurde das Volumen auf 80 μl gebracht. Nach 5min Vorinkubation bei 37°C wurden 20 μl 4 mM Acetyl Coenzym A zugegeben und die Reaktionslösung für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Chloramphenicol mit 1 ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert. Das Ethylacetat wurde dann in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Das Chloramphenicol wurde in 15 μl Ethylacetat gelöst und punktweise auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetropft. Als Laufmittel diente ein Chloroform/Methanol Gemisch (9:1). Nach der Chromatographie wurde die Platte an der Luft getrocknet und autoradiographiert.

Zur Bestimmung der umgesetzten Mengen Chloramphenicol wurden die nicht-acetylierten und acetylierten Formen ausgeschnitten, mit 5 ml Quickszint

versetzt und im Szintillationszähler 5min gezählt. Die spezifische Enzymaktivität in $\text{pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ wurde nach folgender Formel berechnet:

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

6. Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA (29)

20 μg gereinigte Plasmid-DNA wurde zunächst in 100 μl TE mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase 15min bei RT inkubiert. Nach dem RNase Verdau wurde das Volumen auf 400 μl erhöht. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol präzipitiert. Die ausgefällte DNA wurde 10min bei 8800xg abzentrifugiert, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Sediment wurde in 20 μl TE aufgenommen und die Konzentration der DNA bestimmt.

2 μg DNA wurden getrocknet und alkalisch denaturiert. Dazu wurde die DNA in 40 μl Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA pH 8.0) aufgenommen und 5min bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung wurden 4 μl Ammoniumacetat (2M Ammoniumacetat pH 4.5) zugegeben und die DNA mit Ethanol gefällt. Nach 10min Zentrifugation bei 8800xg wurde die denaturierte Plasmid-DNA mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Die so vorbehandelte DNA wurde mit 5 μl Primer (0.5pmol/ μl), 1.5 μl Annealing-Puffer (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM MgCl_2 , 300 mM NaCl, 100

mM DTT, 1 mM EDTA) und 2 μl α -(^{35}S) dATP (8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 660 Ci/mmol) und 6.5 μl H_2O versetzt. Während der Hybridisierung, 15min bei 37°C, wurden 4

Eppendorf Röhrchen, mit für jede Sequenzierreaktion entsprechenden dNTP/ddNTP Lösungen vorbereitet. Zum Hybridisierungsansatz wurden dann 2U DNA Polymerase I (Klenow Fragment) gegeben und je 3 μl dieses Gemisches wurden auf die vorbereiteten Eppendorf Röhrchen verteilt. Die Reaktion wurde für 30min bei 30°C durchgeführt. Nach Zugabe von 1.5 μl Chase-Lösung (0.125 mM dNTP's) wurden die Proben weitere 15min bei 30°C inkubiert.

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

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

A-Mix: 100 μ M dTTP
100 μ M dCTP
100 μ M dGTP
100 μ M ddATP

G-Mix: 100 μ M dTTP
100 μ M dCTP
5 μ M dGTP
120 μ M ddGTP

C-Mix: 100 μ M dTTP
10 μ M dCTP
100 μ M dGTP
100 μ M ddCTP

T-Mix: 5 μ M dTTP
100 μ M dCTP
100 μ M dGTP
500 μ M ddTTP

Ergebnisse

Zur Identifizierung von DNA-Sequenzmotiven, die für die Induktion des menschlichen cfos Gens wichtig sind, wurden Deletionsmutanten konstruiert, durch Transfektion in eukaryontische Zellen eingeführt und ihre Induzierbarkeit mit verschiedenen Agenzien analysiert. Dieser Ansatz erforderte die Wahl eines geeigneten Zellsystems, das die folgenden Kriterien erfüllen mußte: die Expression zumindest des endogenen Gens muß durch verschiedene Agenzien gut induzierbar sein; die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA sollte hoch und die Kulturbedingungen einfach sein. Die Zelllinie NIH 3T3, das sind embryonale Mausfibroblasten, erfüllt diese Bedingungen. In früheren Experimenten wurde festgestellt, daß in dieser Zelllinie die Expression des cfos Gens durch eine Behandlung mit Serum (5) und PDGF (6) stark stimulierbar ist. Außerdem zeichnet sie sich durch leichte Kulturbedingungen sowie eine hohe Transfektionseffizienz aus.

1. Stimulation des Maus-cfos Gens in NIH 3T3 Zellen durch verschiedene Agenzien

Zunächst wurde die Effizienz der cfos Stimulation in NIH 3T3 Zellen durch Behandlung mit verschiedenen Agenzien untersucht. Dazu wurden UV-Strahlung, ein synthetisches Analogon des cAMP's sowie der Phosphodiesterase-Inhibitor IMX verwendet. Die Induktion der cfos Expression durch diese Agenzien wurde mit der, die durch bereits bekannte Induktoren, Serum, PDGF, TPA, hervorgerufen wird, verglichen. Dieses, sowie alle weiteren Experimente wurden mit Serum-gehungerten Zellen durchgeführt. Die Änderung der cfos Expression wurde durch Bestimmung der cfos mRNA Menge vor bzw. 30 Minuten nach Induktorgabe gemessen. (Ein genaues Protokoll für die Zellbehandlung ist im Teil Methoden auf Seite 20 angegeben). Die cfos mRNA Menge wurde durch S1 Analysen nachgewiesen: eine zur mRNA

partiell komplementäre DNA-Probe wird an ihrem 5'Ende radioaktiv markiert, mit einer entsprechenden RNA-Präparation gemischt und die DNA-Probe durch einen Hitzeschritt denaturiert. Anschließend wird das Gemisch bei einer Temperatur inkubiert, die eine Renaturierung komplementärer Sequenzen erlaubt. Unter geeigneten Bedingungen bildet ein Teil der DNA-Probe ein stabiles Hybrid mit der mRNA, das bei einem darauffolgenden Verdau mit einer Einzelstrang-spezifischen Nuklease (S1) vor dem Abbau geschützt ist. Schließlich wird das DNA-RNA Hybrid wieder in Einzelstränge getrennt, die Reaktionsprodukte werden auf einem Gel aufgetrennt und nach Autoradiographie sowohl die Länge als auch die Intensität des radioaktiven Produktes bestimmt. Wird die DNA-Probe im Überschuß in diese Reaktion eingesetzt, so ist die Intensität des radioaktiven Produktes ein direktes Maß für die mRNA Menge. Die Intensität der radioaktiven Signale wird durch Densitometrie bestimmt. Die Länge des radioaktiven Produktes erlaubt eine qualitative Aussage: da sie den Abstand von der radioaktiven Markierung zum Endpunkt der mRNA angibt, können korrekt initiierte Transkripte von aberrant initiierten unterschieden werden.

Mit Hilfe einer S1 Analyse konnte nachgewiesen werden, daß durch 30minütige Behandlung von NIH 3T3 Zellen mit UV-Licht, TPA, Serum , 8-Br-cAMP, IMX sowie PDGF eine Zunahme der *cfos* mRNA erfolgt (Abb. 1).

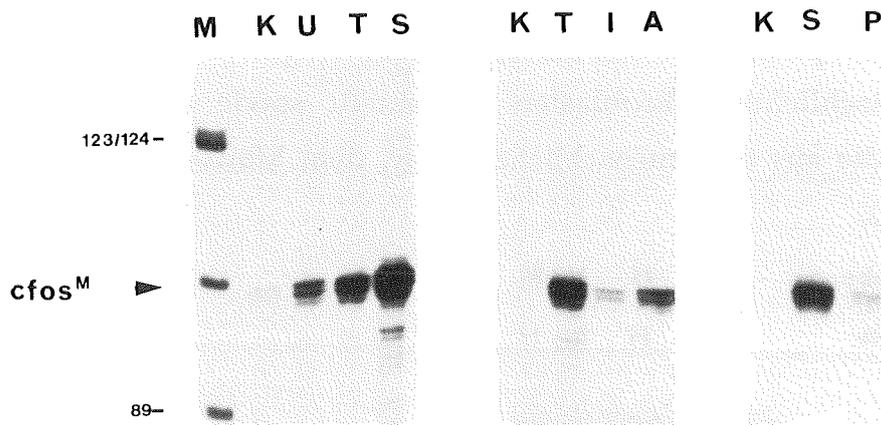


Abb.1: S1 Analyse von Maus-cfos RNA aus unbehandelten, bzw. behandelten NIH 3T3 Zellen. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden mit einer Maus-spezifischen cfos Probe analysiert (als Probe wurde ein 500bp langes TaqI Fragment verwendet. Dieses Fragment ist kolinear zur Maus-cfos RNA von Position +41/+146. Da die Probe an der Position +146 ³²P endmarkiert war, ergab sich durch S1 Verdau ein 105nt langes, indikatives Fragment. Dieses Fragment zeigte nicht die Initiationsstelle der Transkription an.) K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA, S=Serum, I=IMX, A= 8-Br-cAMP, P=PDGF (Beschreibung der Behandlung: siehe Methoden, Seite 20).

Längenmarker: pBR 322 x Hae III

Die verschiedenen Agenzien wirkten nicht in gleichem Maße stimulierend auf die cfos Expression: Serum war der stärkste Induktor; er induzierte eine ca. 40fache Zunahme der cfos mRNA Menge, TPA eine ca. 20fache, UV-Licht und PDGF je eine ca. 10fache. Die schwächsten Induktoren waren 8-Br-cAMP und IMX, die eine ca. 8fache bzw. 4fache Zunahme zur Folge hatten.

2. Transkripte des menschlichen sowie des Maus-cfos Gens können durch S1 Analyse selektiv nachgewiesen werden

Zur Identifizierung von DNA-Sequenzmotiven, die eine Rolle bei der Induktion des menschlichen cfos Gens spielen, sollten Deletionsmutanten des Gens in NIH 3T3 Zellen analysiert werden. Da das menschliche sowie das endogene Maus-cfos Gen in weiten Bereichen Sequenzhomologie zeigen, war es zuvor notwendig zu prüfen, ob die Transkripte beider Gene spezifisch

nachgewiesen werden können, auch wenn sie im Gemisch vorliegen. Dazu wurden RNA-Präparationen aus Serum-behandelten NIH 3T3 Zellen, bzw. primären menschlichen Fibroblasten hergestellt sowie zwei verschiedene DNA-Proben, die aus dem menschlichen, bzw. dem Maus-cfos Gen präpariert wurden (Abb.2).

Probe	M	H	H	M
RNA	M	H	M	H

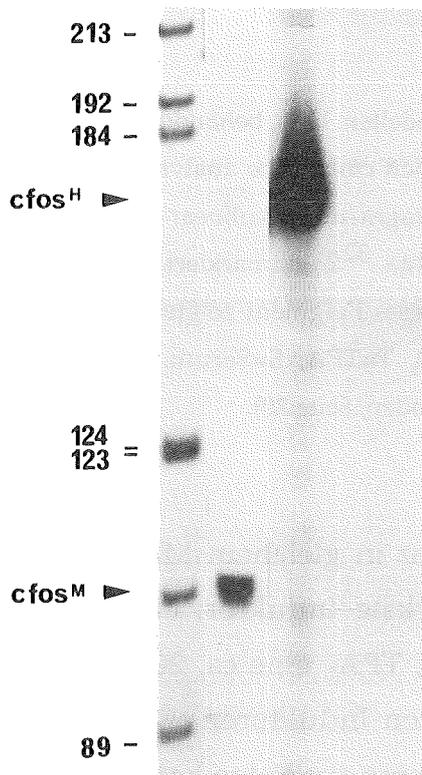


Abb.2: S1 Analyse von Maus-cfos, bzw. menschlicher cfos RNA aus Serum-behandelten Zellen. Je 20 µg Gesamt-RNA aus NIH 3T3 Zellen, bzw. 20 µg poly A⁺ RNA aus primären, menschlichen Fibroblasten (NFB München) wurden in die Analyse eingesetzt. Als Maus-spezifische cfos Probe wurde das Taq I Fragment, als Mensch-spezifische Probe ein AvaI Fragment verwendet (ein 649bp langes AvaI Fragment wurde aus dem Vektor pcfos human-1 (2) präpariert und an Position +168 ³²P endmarkiert. Das indikative Fragment für korrekt initiierte Transkripte war 168nt lang). M=Maus; H=Mensch. Längenmarker: pBR 322 x Hae III.

Zuerst wurde die aus NIH 3T3 Zellen gewonnene RNA mit der Maus-cfos Probe analysiert (Abb.2, Spur 1): ein starkes Signal wies auf einen hohen Gehalt cfos mRNA hin. Die aus menschlichen Zellen gewonnene RNA enthielt ebenfalls sehr viel cfos mRNA (Spur 2). Eine Analyse der aus NIH 3T3 Zellen gewonnenen RNA mit der menschlichen cfos Probe ergab jedoch kein Signal (Spur 3), ebensowenig die aus menschlichen Zellen gewonnene RNA mit der Maus-cfos Probe (Spur 4). D.h., die Transkripte des menschlichen bzw. des Maus-cfos Gens wurden durch die verwendeten S1 Proben spezifisch erkannt. Eine Kreuzreaktion war auszuschließen.

Der selektive Nachweis von Transkripten des menschlichen, bzw. des Maus-cfos

Gens eröffnete gleichzeitig die Möglichkeit, die experimentellen Bedingungen zu kontrollieren: während für die Deletionsmutanten des transfizierten Gens unterschiedliche Induktionsfaktoren erwartet wurden, sollte die Induzierbarkeit des endogenen Maus-Gens gleich bleiben. Diese Kontrolle wurde an einigen Stellen berücksichtigt.

3. Konstruktion der Deletionsmutante pcfos^H-750

Ein genomischer Klon des menschlichen cfos Gens wurde in der Gruppe von I. Verma isoliert (pcfos human-1, (2)) und von R. Müller, Marburg, zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt enthielt auf einem 9kb großen Eco RI Restriktionsfragment das vollständige cfos Gen sowie ca. 2kb 5'flankierende und ca. 3.5kb 3'flankierende Sequenzen. Das Eco RI Fragment war in den bakteriellen Vektor pBR 322 eingefügt. Die DNA-Sequenz des cfos Gens sowie 733Bp der 5'flankierenden Region wurden ebenfalls in der Gruppe von I. Verma ermittelt und veröffentlicht (30), während die weiter entfernt liegenden Regionen nicht charakterisiert waren (Abb.3).

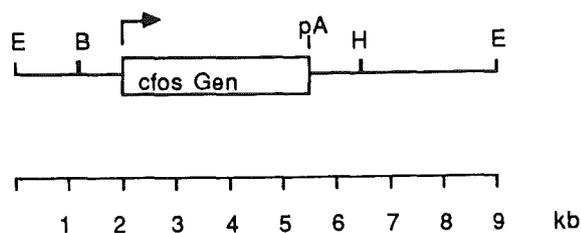


Abb.3 Struktur des 9kb Eco RI Fragmentes.
Die Initiationsstelle der Transkription ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. pA= Polyadenylierungs/Prozessierungsstelle. B=Bam HI, E=Eco RI, H=Hind III

Um den zu analysierenden DNA-Bereich zu begrenzen, wurde aus dem pcfos human-1 ein Subklon konstruiert, der zusätzlich zum vollständigen Gen nur einen Teil der 5'flankierenden Region sowie möglichst wenig 3'flankierende Region enthalten sollte. Für die Subklonierung mußten geeignete Restriktionsschnittstellen gefunden werden, mit Hilfe derer ein kleineres Fragment herausgelöst werden konnte, ohne dabei das cfos Gen zu zerstören. Dazu wurde zunächst für die nicht-sequenzierten Bereiche des 9kb Fragmentes eine Restriktionskarte aufgestellt, wozu Enzyme benutzt wurden, für die keine Erkennungsstelle im cfos Gen war. Zur Subklonierung wurden die Enzyme BamHI und Hind III verwendet, die ein ca. 5.3kb großes Fragment ergaben, das neben dem cfos Gen 0.75kb 5'flankierende und 1.1kb 3'flankierende Bereiche umfaßte. Dieses Fragment wurde in einen anderen bakteriellen Vektor, den pUC9 (31) kloniert, der sich durch eine hohe Replikationseffizienz in bakteriellen Zellen und daher hohe DNA-Ausbeuten auszeichnet. Um weitere Klonierungen zu erleichtern (siehe: Methoden, Seite 15) wurde eine Modifikation im cfos Gen eingeführt. An Position +43 (bezogen auf die mRNA Startstelle) befand sich eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Not I. Durch Verdau der DNA mit dem Enzym Not I, Abverdau der 5'überhängenden Enden und einer anschließenden Linker-Klonierung wurde an dieser Stelle eine Erkennungssequenz für das Enzym Xba I eingeführt. Diese Modifikation führte dazu, daß das Konstrukt pcfos^H-750 an Position +45 durch einen Xba I Verdau linearisierbar war. Die Deletionsmutante pcfos^H-750 war die Grundlage weiterer Deletionsmutanten (genaue Beschreibung der Deletionsmutanten siehe Methoden, Seiten 15-17).

4. Die Deletionsmutante pcfos^H-750 ist durch verschiedene Induktoren ähnlich stimulierbar wie das Maus cfos Gen

Das Konstrukt pcfos^H-750 wurde gemeinsam mit dem Selektionsmarker pSV2neo (32) stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert. Durch eine anschließende

Selektion in G418-haltigem Medium wurden Neomycin-resistente Kolonien erhalten, die zu einer Massenkultur vereinigt wurden. Aus zahlreichen früheren Experimenten ist bekannt, daß eine solche Ko-Transfektion zweier unabhängiger Plasmide nicht nur zur stabilen Integration des Selektionsmarkers in das Genom der Wirtszelle führt, sondern auch eine stabile Integration des zweiten Plasmids, das keinem Selektionsdruck unterliegt, stattfindet. Die Anzahl stabil integrierter Moleküle variiert stark und ist durch die experimentellen Bedingungen nur zum Teil beeinflussbar. Die Integrationsstellen im Genom sind ebenfalls nicht beeinflussbar. Die das Konstrukt $pcfos^H$ -750 enthaltende Massenkultur wurde mit den Induktoren UV-Licht, TPA, Serum, 8-Br-cAMP, IMX und PDGF behandelt, nach 30 Minuten RNA präpariert und wiederum durch S1 Analyse die Menge der menschlichen und Maus-*cfos* RNA bestimmt. Zur Kontrolle wurde RNA aus unbehandelten, bzw, DMSO-behandelten Zellen präpariert (DMSO ist das Lösungsmittel für TPA und IMX; siehe Methoden, Seite 20). Die Abb. 4 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

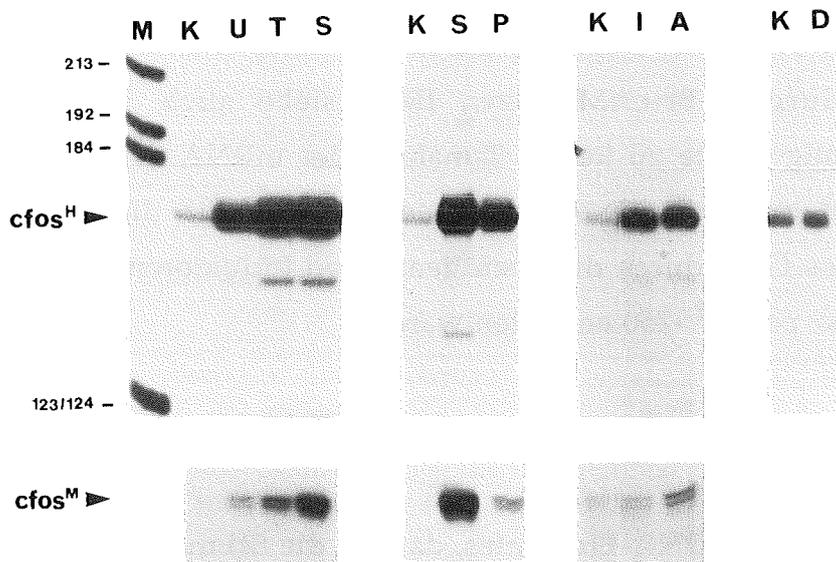


Abb.4 S1 Analyse von Transkripten des stabil transfizierten Konstruktes $pcfos^H$ -750. Je 20 μ g Gesamt-RNA aus unbehandelten, bzw. behandelten NIH 3T3 Zellen wurden in die Analyse eingesetzt. Spezifische Probe: Ava I Fragment. Korrekt initiierte Transkripte (Fragmentlänge 168 nt) sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Einige schwächere Signale sind vermutlich auf aberrant initiierte Transkripte zurückzuführen. K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA; S=Serum, P=PDGF, I=IMX, A=8-Br-cAMP, D=DMSO. Längenmarker: pBR 322 x Hae III.

Mit der menschlichen cfos Probe wurden radioaktive Signale mit der erwarteten Länge von 168 nt erhalten. Dies bedeutete, daß zumindest von einem Teil der transfizierten Genkopien korrekt initiierte Transkripte gebildet wurden. Vergleicht man die Menge der menschlichen bzw. der Maus- cfos Transkripte miteinander, fällt auf, daß sowohl in unbehandelten als auch stimulierten Zellen wesentlich mehr menschliche als Maus- cfos mRNA enthalten war. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß durch die Transfektion so viele Genkopien ins Genom integriert wurden, daß im Durchschnitt pro Zelle mehr als zwei Kopien vorhanden waren. Eine Integration einiger Kopien in der Nähe eines konstitutiven "Enhancers" kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Expression der Deletionsmutante pcfos^H-750 wurde durch alle Agenzien stimuliert. Mehr noch, die Induktionsfaktoren, die mit den verschiedenen Agenzien erreicht wurden, waren ähnlich denen, die für das endogene Maus- cfos Gen beobachtet wurden. In mehreren unabhängigen Experimenten wurden folgende Werte bestimmt: eine 20-30fache Induktion durch Serum, eine 12-18fache durch TPA, eine 6-12fache durch UV-Licht, eine 9fache durch PDGF und 4-7fache durch 8-Br-cAMP bzw. IMX (siehe auch Tab.1, Seite 37). DMSO-Behandlung führte zu keiner Zunahme der mRNA. Diese Beobachtung ließ den Schluß zu, daß alle DNA-Sequenzen, die für die Induktion des menschlichen cfos Gens durch die oben genannten Induktoren notwendig sind, in dem Konstrukt pcfos^H-750 enthalten waren.

5. Identifizierung eines DNA-Elementes, das für die Stimulation des cfos Gens durch UV-Licht, TPA und PDGF wichtig ist

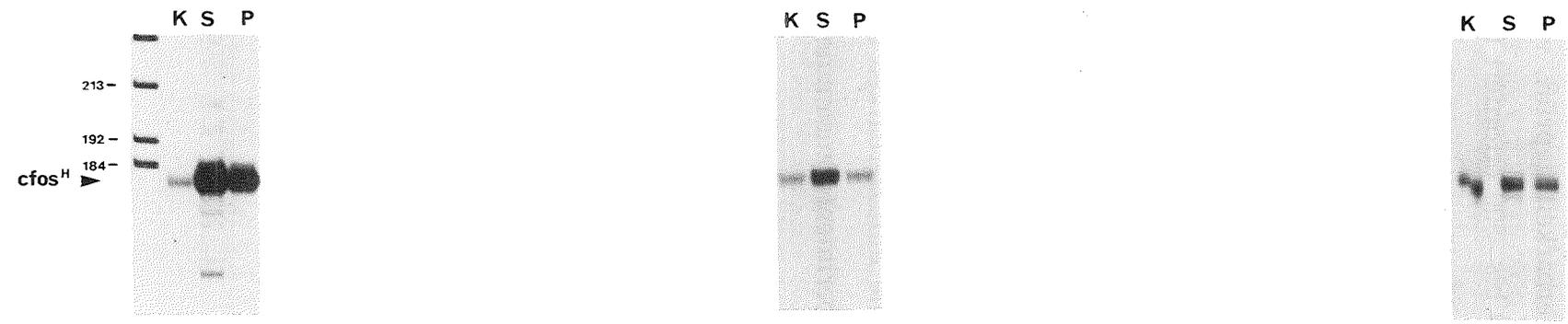
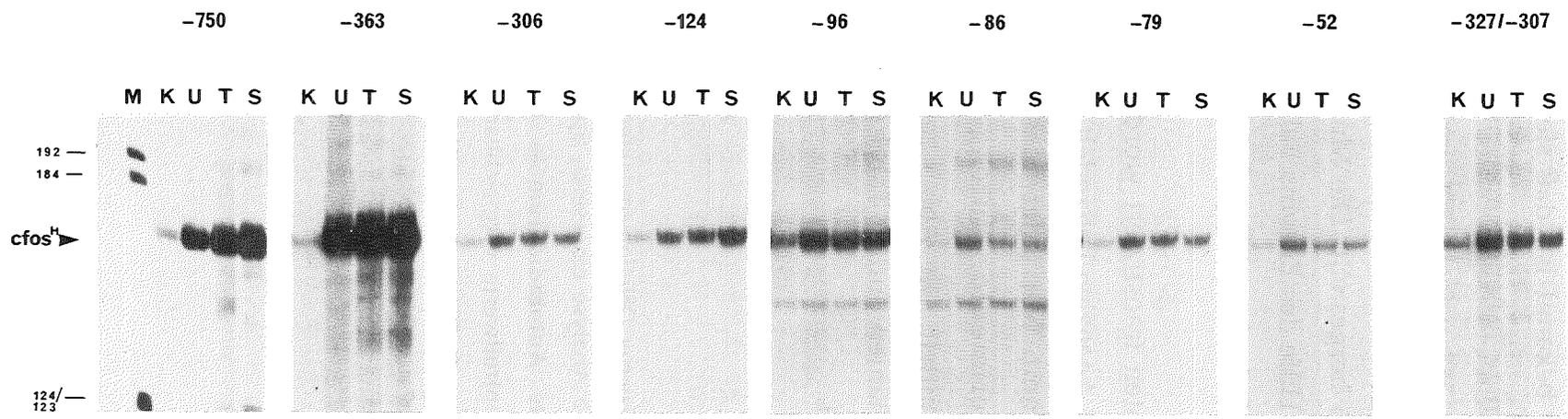
5.1 Analyse von 5'Deletionsmutanten

Um die DNA-Sequenzmotive zu definieren, die für die stimulierte Expression des cfos Gens notwendig sind, wurden eine Reihe von 5'Deletionsmutanten

stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert und ihre Induzierbarkeit durch UV-Licht, TPA und PDGF analysiert. Zur Kontrolle wurde ebenfalls die Seruminduzierbarkeit geprüft, von der bekannt ist, daß sie eine Sequenz von Position -319 bis -300 erfordert (19). Einige Deletionsmutanten wurden von R. Treisman zur Verfügung gestellt: pcfos^H-363, pcfos^H-306 und pcfos^H-327/-307 (18). Zusätzlich wurden unter Ausnutzung von Restriktionsschnittstellen die Mutanten pcfos^H-124 und pcfos^H-96 hergestellt. Die Mutanten pcfos^H-86, pcfos^H-79 und pcfos^H-52 wurden mit Hilfe des Enzyms Bal 31 konstruiert. Die Konstruktion dieser Mutanten ist im Methodenteil beschrieben und graphisch dargestellt (siehe Seiten 15-17).

Massenkulturen, die mit diesen Mutanten transfiziert worden waren, wurden für 30 Minuten mit den oben genannten Agenzien behandelt und die Menge der cfos mRNA durch S1 Analyse bestimmt. Mit jeder Massenkultur wurden mehrere unabhängige Einzelerperimente durchgeführt und die Induktionsfaktoren densitometrisch ermittelt. Die Abb.5 zeigt je ein typisches Beispiel für die Induzierbarkeit der Mutanten und in Tab.1 sind die Ergebnisse der Einzelerperimente zusammengefaßt.

Abb.5 S1 Analyse von Transkripten stabil transfizierter Deletionsmutanten des menschlichen cfos Gens. Je 20-30 µg Gesamt-RNA wurden in die Analyse eingesetzt. Spezifische Probe: Ava I Fragment. Unterschiedlich lang exponierte Autoradiogramme (12h-3d) wurden so zusammengestellt, daß die Intensität der Kontrollwerte vergleichbar ist. Korrekt initiierte Transkripte sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA, S=Serum, P=PDGF. Längenmarker: pBR 322 xHaeIII.



<u>Mutante</u>		<u>UV-Licht</u>	<u>TPA</u>	<u>Serum</u>	<u>PDGF</u>
pcfos ^H	-750	8 (6-12)	15 (12-18)	24 (20-30)	9
	-363	12	20	27	-
	-306	4 (3-5)	4	6 (6-7)	-
	-124	3 (3-4)	2 (2-3)	2 (1-3)	-
	- 96	3	3	2	1
	- 86	2	2	3	-
	- 79	3	2	3 (2-4)	-
	- 52	3	2	2	-
Δ -327/-307		4	3	3	1
(SRE) - 96		6	12 (10-15)	26 (20-30)	4
(SRE+AP1)					
- 96		5	9 (8-10)	14 (12-15)	-
Δ +12/+45		4 (3-5)	11 (7-14)	13 (11-15)	-
Δ -327/-307//					
+12/+45		1	1	2 (2-3)	-
Tk-CAT		8	4	2	-
(SRE)-Tk-CAT		11	20	56	-
(korrigiert)		1.4	5	23	-

Tab.1 Expression stabil transfizierter Mutanten des menschlichen cfos Gens

Die Induzierbarkeit der Mutanten wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (mit Ausnahme von PDGF). Angegeben sind die durchschnittlichen Induktionsfaktoren, in Klammern die Variation.

Die Deletionsmutante $\text{pcf}^{\text{H}}-363$ war durch UV-Licht, TPA, PDGF und Serum in ähnlichem Maße induzierbar wie der Ausgangsklon $\text{pcf}^{\text{H}}-750$. D.h., die zwischen diesen Positionen liegenden ca. 400bp enthalten kein DNA-Element, das für die Induktion notwendig ist. Bei weiterer Verkürzung des 5'flankierenden Bereiches bis zur Position -306 wurde jedoch eine drastische Abnahme der Induzierbarkeit beobachtet; die Induktionsfaktoren sanken bis auf eine residuale Aktivität von 3-6fach (bzw. 1 für PDGF). Die Entfernung weiterer 5'Sequenzen bis zur Position -52 hatte nur einen schwachen Einfluß auf die residuale Induzierbarkeit: es wurden 2-3fache Induktionen gemessen. Die Bedeutung von DNA-Sequenzen zwischen Position -363 und -306 wurde auch bei der Analyse einer internen Deletionsmutante, $\text{pcf}^{\text{H}}\Delta-327/-307$ deutlich: die Entfernung dieser 20bp aus 711bp 5'flankierender Region führte zu einer drastischen Abnahme der Induzierbarkeit auf Faktoren von 3-4 (bzw. 1 für PDGF). D.h., diese 20bp enthielten, oder überlappten mit einem DNA-Bereich, der für die Induktion des *cfos* Gens durch UV-Licht, TPA, PDGF und Serum notwendig ist. Von R. Treisman wurde gezeigt, daß die Serum-Induktion des *cfos* Gens ein DNA-Element von Position -319/-300 erfordert (SRE; 19). Die hier vorliegenden Daten zeigen, daß dieses Element ebenfalls für die UV-Licht-, TPA- und PDGF- vermittelte Induktion wichtig ist.

Das SRE überlappt mit der Konsensus-Sequenz für ein weiteres cis-wirkendes DNA-Element, einer AP1 Bindungsstelle (Position -300/-292). Für das menschliche Kollagenase-Gen wurde gezeigt, daß eine AP1 Bindungsstelle für die TPA Induktion des Gens verantwortlich ist (20b). Damit stellte sich die Frage, ob nur das SRE für die Stimulation der *cfos* Expression notwendig ist, oder ob das SRE und die AP1 Konsensus-Sequenz kooperieren müssen, um eine vollständige Induktion zu vermitteln.

5.2 Das SRE vor der Position -96 vermittelt UV-Licht-, TPA-, Serum- und PDGF-stimulierte cfos Expression

Der Einfluß des SRE's bzw. einer Kombination von SRE und AP1 Konsensus-Sequenz auf die Expression des cfos Gens wurde mit Hilfe von Insertionsmutanten untersucht. Dazu wurden die DNA-Bereiche von Position -320/-299 (SRE) bzw. -320/-289 (SRE plus AP1 Konsensus-Sequenz) synthetisch hergestellt und vor die nur schwach induzierbare Mutante pcfos^H -96 kloniert (siehe auch Methoden, Seite 15). Nach Transfektion in NIH 3T3 Zellen wurden entsprechende Massenkulturen mit UV-Licht, TPA, PDGF und Serum behandelt und die Menge der cfos Transkripte durch S1 Analyse bestimmt.

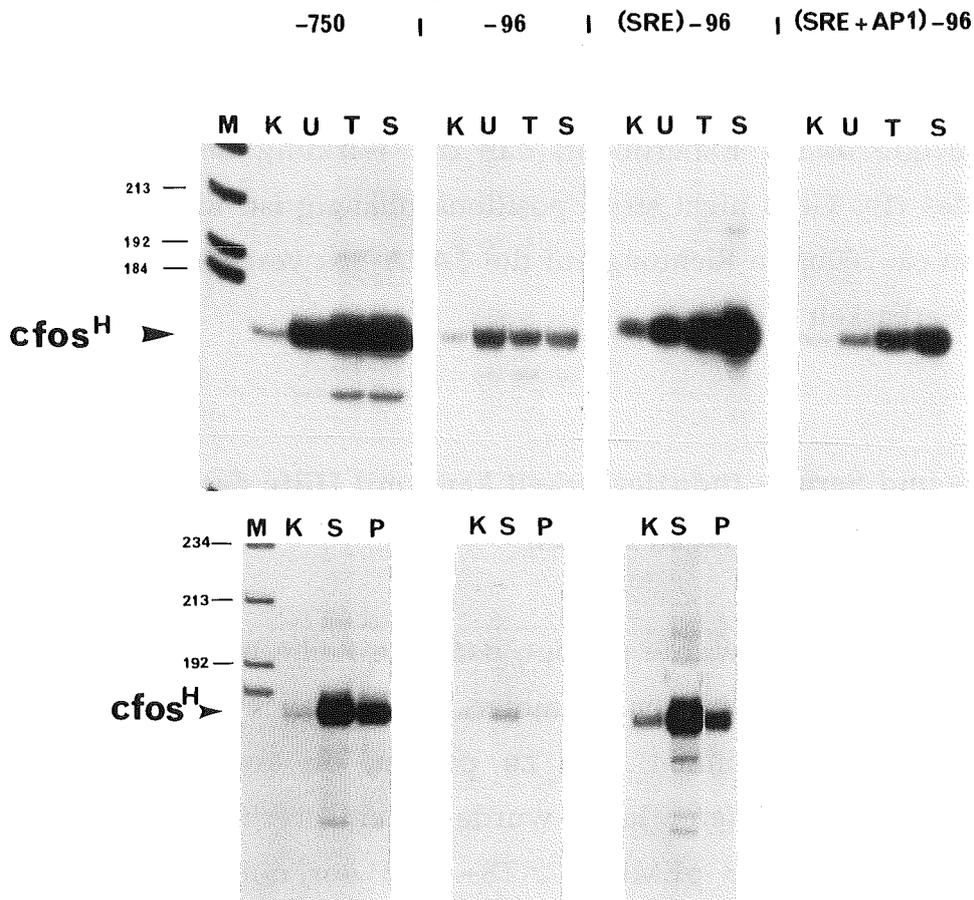


Abb.6 S1 Analyse von Transkripten stabil transfizierte Mutanten des menschlichen cfos Gens. Je 20µg Gesamt-RNA wurden in die Analyse eingesetzt. Spezifische Probe Ava I. Unterschiedlich lang exponierte Autoradiogramme wurden so zusammengestellt, daß die Intensität der Kontrollwerte vergleichbar ist. K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA, S=Serum, P=PDGF. Längenmarker: pBR 322 x Hae III.

Die Abb.6 zeigt die stark induzierbare Mutante pcfos^H -750 und die schwach induzierbare Mutante pcfos^H -96. Das SRE vor der Position -96 rekonstituierte die Induzierbarkeit mit TPA und Serum, so daß Induktionsfaktoren, die denen des "Wildtyps" ähnlich waren erhalten wurden (siehe Tab.1). Das SRE hatte ebenfalls einen positiven Einfluß auf die Induzierbarkeit durch UV-Licht und PDGF; die Induktionsfaktoren waren jedoch etwas niedriger als die des "Wildtyps". Die Induktionsfaktoren konnten durch die Kombination von SRE und AP1 Konsensus-Sequenz nicht weiter erhöht werden (für PDGF nicht getestet). Im Gegenteil, sie waren generell etwas niedriger. Diese Analyse zeigt, daß das SRE vor der Position -96 die vollständige TPA- und Serum-Induzierbarkeit vermittelt. Die Induktion durch UV-Licht und PDGF wurde gesteigert. Die AP1 Konsensus-Sequenz trug nicht zur Induzierbarkeit durch UV-Licht, TPA und Serum bei.

Außerdem zeigte dieses Experiment, daß die Wirkung des SRE's auf die Expression des cfos Gens nicht strikt positionsabhängig ist. Eine Verschiebung des SRE's um ca. 200bp in Richtung auf die TATA-Box verändert die TPA und Serum Induzierbarkeit nicht.

5.3 Die TPA- und Serum- Induzierbarkeit kann mit Hilfe des SRE's auf einen heterologen Promoter übertragen werden

In früheren Experimenten wurde gezeigt, daß eine Reihe von DNA-Elementen nicht nur den eigenen homologen Promoter, sondern auch fremde, heterologe Promotoren aktivieren können. Um zu prüfen, ob auch das SRE einen heterologen Promoter aktivieren kann, wurde die entsprechende DNA-Sequenz (-320/-299) in den Vektor pEMBL CAT8+ (33) vor den Thymidin-Kinase Promoter (Tk) des Herpes simplex Virus kloniert. In diesem Vektor ist der Tk-Promoter dem bakteriellen CAT-Gen vorangestellt. Das Konstrukt (SRE)-Tk-CAT, bzw. das Kontrollkonstrukt Tk-CAT wurden stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert und entsprechende Massenkulturen mit UV-Licht, TPA und Serum behandelt. Nach 60 Minuten wurde RNA präpariert und die Menge der

CAT mRNA durch S1 Analyse bestimmt.

Tk-CAT (SRE)-Tk-CAT

K U T S K U T S

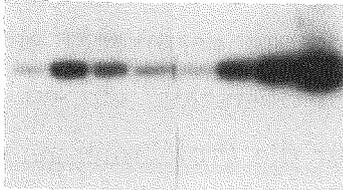


Abb.7 S1 Analyse von Transkripten eines stabil transfizierten Tk-CAT- Konstruktes (pEMBL CAT 8+), bzw. des (SRE)-Tk-CAT. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden in die Analyse eingesetzt. Als spezifische Probe wurde ein Eco RI Fragment verwendet. Das Fragment wurde an der Position +440 radioaktiv markiert und das indikative Fragment für korrekt initiierte Transkripte war 440nt lang. K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA, S=Serum.

Die Abb.7 zeigt, dass bereits die Expression des Kontrollkonstruktes Tk-CAT durch alle drei Agenzien stimuliert wurde (Induktionsfaktoren: siehe Tab.1, Seite 37). Dabei wirkte UV-Licht besonders stark, während Serum nur ein schwacher Induktor war. Durch Hinzufügen des SRE's wurde die TPA- und Serum- abhängige Expression des Konstruktes stark erhöht, während die UV-vermittelte Expression nur um einen Faktor 1.4 stieg. Dies bedeutet, daß mit Hilfe des SRE's, die TPA- und Serum- abhängige Induzierbarkeit auf einen heterologen Promoter übertragen werden kann. Es bleibt jedoch unklar, warum dies nicht auch für die Induktion durch UV-Licht zutrifft.

5.4 Die Bindung von Proteinen an das SRE wird durch UV-, TPA- und Serum-Behandlung stimuliert

Cis-wirkende DNA-Elemente üben ihren Einfluß auf die Transkriptionseffizienz aus, indem sie mit trans-wirkenden Faktoren, d.h. Proteinen, die an diese Elemente binden, interagieren. Für eine Reihe induzierbarer DNA-Elemente wurde gezeigt, daß eine Behandlung von Zellen mit dem entsprechenden Induktor die Bindung eines Kernproteins stimuliert. Um die Bindung von Kernproteinen an das SRE zu untersuchen, wurden "Bandshift"-Experimente durchgeführt. Dabei wird ein kurzes DNA-Stück, das die gewünschte Sequenz enthält, radioaktiv markiert und mit Proteinextrakten aus Zellkernen inkubiert. Unter geeigneten Bedingungen kommt es zu einer nicht-kovalenten Bindung eines oder mehrerer Proteine an das DNA-Stück.

Anschließend wird dieses Gemisch auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die radioaktiven Produkte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. DNA-Stücke, die kein Protein gebunden haben, besitzen eine höhere elektrophoretische Mobilität als solche, die einen Komplex mit einem Protein bilden; d.h., Proteinbindung verursacht einen "Shift" des Signals. Setzt man die radioaktive Probe im Überschuß ein, ist die Intensität des "geshifteten" Signals ein direktes Maß für die Proteinmenge, die an die Probe bindet. Da Kernextrakte jedoch nicht nur Proteine enthalten, die an spezifische DNA-Sequenzen binden, sondern auch unspezifische DNA-Bindungsproteine, muß der radioaktiven Probe eine nicht-markierte Kompetitor-DNA hinzugefügt werden. In der Regel wird eine synthetische DNA, das poly dI:dC benutzt. Die Spezifität der Bindung eines Proteins an eine definierte DNA-Sequenz kann weiterhin durch Kompetition mit homologen sowie nicht-homologen DNA-Fragmenten nachgewiesen werden (siehe unten). Um die Wechselwirkung zwischen dem SRE und Kernproteinen zu untersuchen, wurden Kernextrakte aus unbehandelten, UV-, TPA- und Serum-behandelten NIH 3T3 Zellen präpariert. Die Behandlung erfolgte für jeweils 30 Minuten. Diese Extrakte wurden mit dem radioaktiv markierten SRE (-320/-299) inkubiert und nach Gelelektrophorese autoradiographiert.

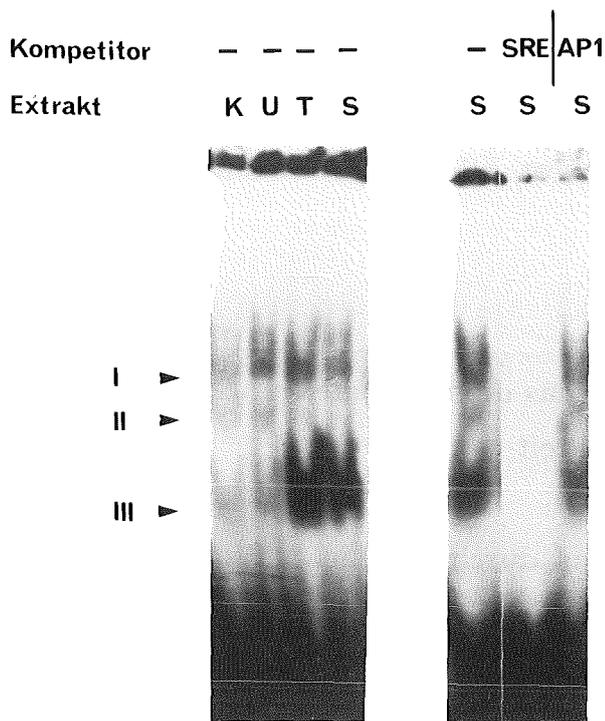


Abb.8 Analyse der Bindung spezifischer Kernproteine an das SRE (-320/-299). Ca. 50f Mol ^{32}P endmarkiertes SRE wurden mit je 4 μg Kernextrakt aus NIH 3T3 Zellen bei RT inkubiert und das Gemisch gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spezifität der Bindung wurde durch Zusatz von nicht-markierten Kompetitoren (SRE, AP1 Konsensus-Sequenz) in 60fach molarem Überschuß untersucht. K= Extrakt aus unbehandelten Zellen, U= Extrakt aus UV-behandelten Zellen, T= Extrakt aus TPA-behandelten Zellen, S= Extrakt aus Serum-behandelten Zellen.

Die Abb.8 zeigt ein typisches "Bandshift"-Experiment. Mit Kernextrakten aus unbehandelten Zellen wurden drei Komplexe mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität erhalten (in der Abb. mit I, II und III gekennzeichnet). Diese Signale wurden ebenfalls mit Kernextrakten aus UV-behandelten Zellen beobachtet, jedoch war der Komplex I verstärkt. Mit Kernextrakten aus TPA- bzw. Serum- behandelten Zellen wurde ebenfalls eine Zunahme des Komplexes I sowie eine starke Zunahme des Komplexes III erhalten. In mehreren, unabhängigen "Bandshift"-Experimenten, die alle mit den gleichen TPA- und Serum-Extrakten durchgeführt wurden, wurden Variationen im Mengenverhältnis zwischen Komplex I und III beobachtet. Die Ursache für diese Variation konnte jedoch experimentell nicht erfaßt werden. Die Spezifität der Komplexbildung wurde durch Konkurrenzexperimente nachgewiesen. Dazu wurden Extrakte aus Serum-behandelten Zellen benutzt (Abb.8). Bei Zugabe des nicht-markierten SRE's (homologer Kompetitor) in 60fach molarem Überschuß wurden keine radioaktiven Komplexe beobachtet, während ein nicht-homologer Kompetitor (AP1 Konsensus-Sequenz) keinen Einfluß auf die Komplexbildung hatte. Diese Ergebnisse zeigen, daß das SRE

spezifische Kernproteine bindet. Die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Agenzien, stimuliert die Bildung einiger Komplexe. Die Induktoren TPA und Serum führen zu gleichartigen Veränderungen, nämlich zur Verstärkung zweier Komplexe, während der Induktor UV-Licht nur einen Komplex verstärkt.

6. Identifizierung eines DNA-Elementes, das die residuale Induzierbarkeit des cfos Gens durch UV-Licht und TPA vermittelt

Die maximale Stimulation des cfos Gens durch UV-Licht, TPA und Serum erfordert die Anwesenheit des SRE's. Jedoch sind Deletionsmutanten, denen das SRE fehlt, noch immer schwach mit UV-Licht, TPA und Serum induzierbar. So ist z.B. die Deletionsmutante $pcfos^H -52$ noch 2-3fach induzierbar. Um das DNA-Element zu definieren, daß für diese residuale Induktion verantwortlich ist, wurden weitere Deletionsmutanten analysiert. Da durch "Footprint"-Experimente von B.Gloss gezeigt worden war, daß die DNA-Region von Position +18/+38 ein Kernprotein aus NIH 3T3 Zellen bindet (persönliche Mitteilung), war es naheliegend, den Einfluß dieser Sequenz auf die Induzierbarkeit zu prüfen. Daher wurde durch 3' Bal 31 Deletion das Konstrukt $pcfos^H_{\Delta} (+12/+45)$ hergestellt (siehe Methoden, Seite 15), stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert und entsprechende Massenkulturen mit UV-Licht, TPA und Serum behandelt. Nach 30 Minuten wurde RNA präpariert und die Menge der cfos mRNA durch S1 Analyse bestimmt.

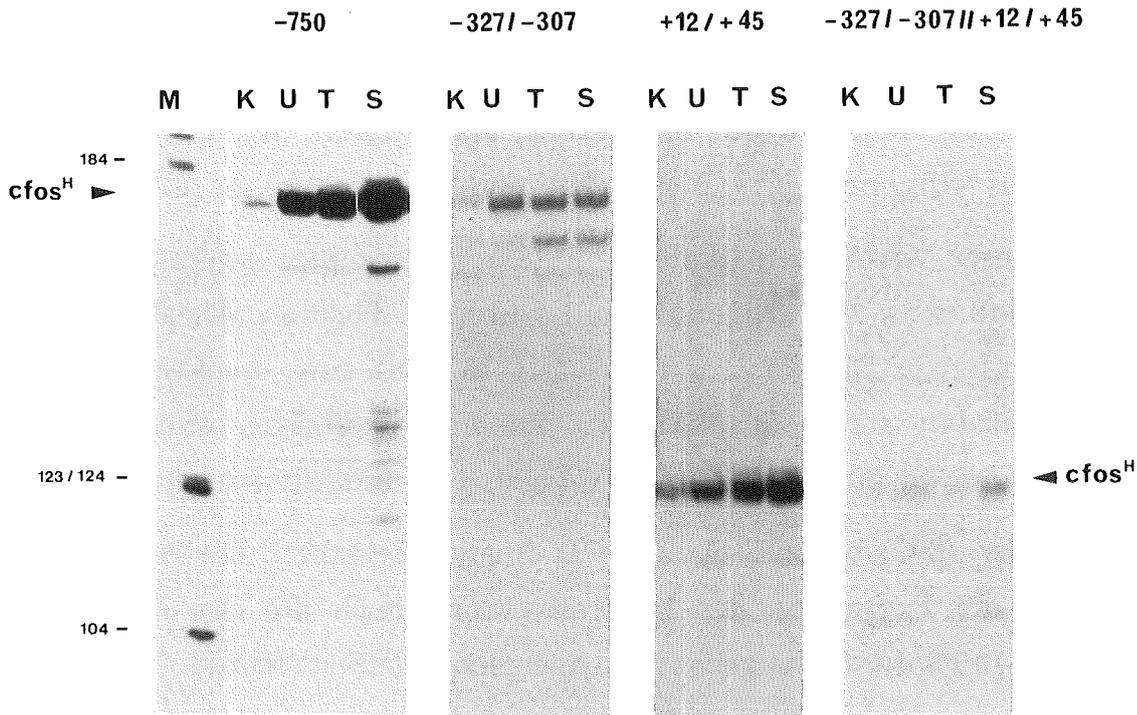


Abb.9 S1 Analyse von Transkripten stabil transfizierter Deletionsmutanten des menschlichen *cfos* Gens. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden in die Analyse eingesetzt. Spezifische Probe: Ava I. Die von den Konstrukten $pcfos^{H\Delta} +12/+45$ und $pcfos^{H\Delta} -327/-307 // +12/+45$ transkribierte RNA ist in ihrer Struktur so verändert, daß nur die Region von +45 bis +168 kolinear zur Ava I Probe ist. Das indikative Fragment ist daher nur 123 nt lang und zeigt nicht die Initiationsstelle der Transkription. K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA, S=Serum. Längenmarker: pBR 322 x Hae III.

In der Abb.9 ist das Ergebnis einer typischen S1 Analyse dargestellt und die Induktionsfaktoren für die Mutanten $pcfos^{H\Delta} -750$ und $pcfos^{H\Delta} (+12/+45)$ sind in Tab.1, Seite angegeben. Die Deletion der Sequenzen zwischen Position +12 und +45 führte zu einer leicht verminderten UV-, TPA- und Serum -Stimulation. Eine starke Abnahme der Induzierbarkeit wurde jedoch auch nicht erwartet, da dieses Konstrukt noch das SRE enthielt. Es wurde daher eine Doppelmutante konstruiert, in der sowohl das SRE, als auch die Sequenz +12/+45 deletiert waren: $pcfos^{H\Delta} -327/-307 // +12/+45$. Diese Mutante war mit UV-Licht und TPA nicht mehr induzierbar, während die Induzierbarkeit durch Serum der der Mutante $pcfos^{H\Delta} -327/-307$ entsprach. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Sequenz zwischen Position +12 und +45 zur Stimulation des *cfos* Gens durch UV-Licht und TPA beiträgt. Die residuale Induzierbarkeit durch Serum scheint jedoch

nicht (ausschließlich) von dieser Sequenz abzuhängen.

Um zu prüfen, ob die Sequenz von Position +18/+38 ähnlich wie das SRE die Aktivität eines heterologen Promoters beeinflussen kann, wurde ein synthetisches Oligonukleotid hergestellt und in den Vektor OVEC-1 (34) kloniert. Dieser Vektor enthält den β -Globin-Promoter sowie Teile des Globin-Strukturgens. Das Oligonukleotid wurde an Position -41, also vor die TATA-Box inseriert. Das Konstrukt OVEC-1(+18/+38), bzw. der Kontrollvektor OVEC-1 wurden stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert, entsprechende Massenkulturen für 30 Minuten mit UV-Licht, TPA und Serum behandelt und die Menge der β -Globin mRNA durch S1 Analyse bestimmt. Die Abb.10 zeigt, daß weder die Expression des Kontrollvektors, noch die des Konstruktes OVEC-1(+18/+38) durch die genannten Agenzien stimuliert wurde.

OVEC-1 OVEC-1 (+18/+38)

K U T S K U T S

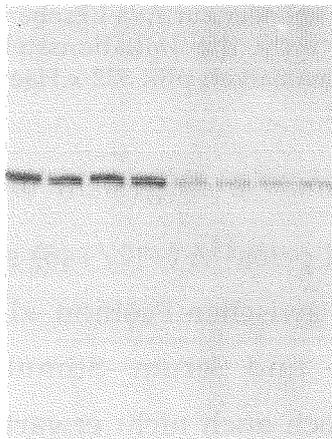


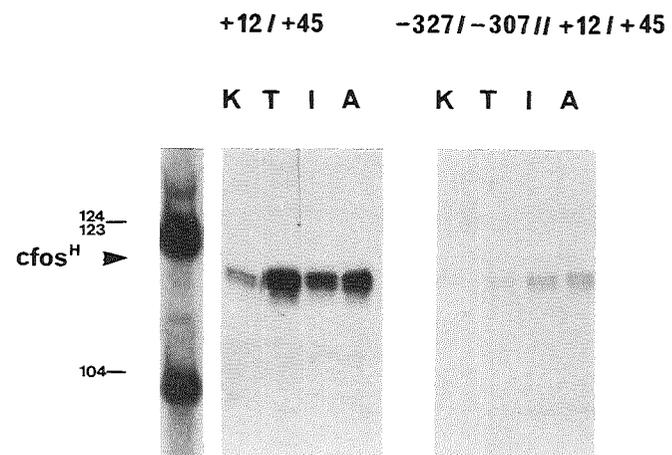
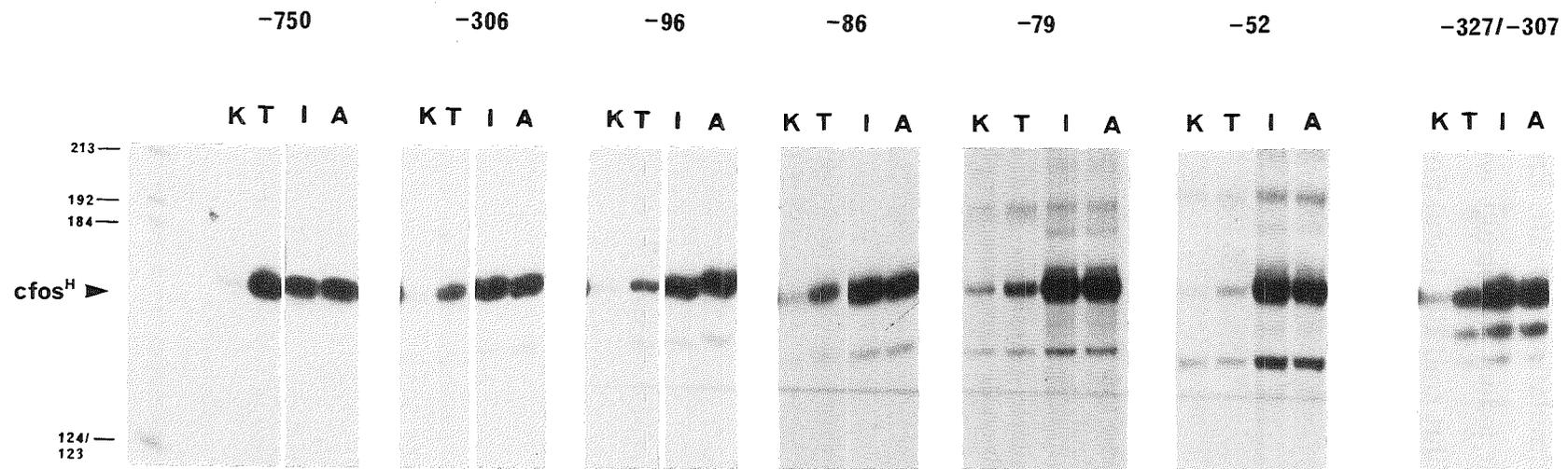
Abb.10 S1 Analyse von Transkripten der stabil transfizierten Konstrukte OVEC-1 (Kontrolle) und OVEC-1 (+18/+38). Je 20 μ g Gesamt-RNA wurden in die Analyse eingesetzt. Als spezifische Probe wurde ein 1727bp langes HindIII/Eco RI Fragment, das an Position +477 32 P endmarkiert war, verwendet. Das indikative Fragment für korrekt initiierte Transkripte war 477nt lang. K=Kontrolle, U=UV-Licht, T=TPA, S=Serum.

7. Die Stimulation des cfos Gens durch 8-Br-cAMP und IMX

Sowohl die Expression des endogenen Maus- cfos Gens, als auch die des transfizierten Konstruktes pcfos^H -750 ist durch 8-Br-cAMP und den Phosphodiesterase Inhibitor IMX 4-7fach induzierbar. Um herauszufinden, ob diese Agenzien ebenfalls über das SRE und /oder die Sequenz +12/+45 wirken,

wurde eine Auswahl der oben beschriebenen Mutanten analysiert. Als Kontrolle wurde gleichzeitig die TPA-vermittelte Stimulation geprüft. Entsprechende S1 Analysen sind in Abb. 11 dargestellt. Mit jedem Konstrukt wurden mehrere, unabhängige Einzelexperimente durchgeführt und die Induktionsfaktoren sind in Tab.2 zusammengefaßt.

Abb.11 S1 Analyse von Transkripten stabil transfizierter Deletionsmutanten des menschlichen *cfos* Gens. Je 20-30 µg Gesamt-RNA wurden in die Analyse eingesetzt. Spezifische Probe: AvaI. Unterschiedlich lang exponierte Autoradiogramme wurden so zusammengestellt, daß die Intensität der Kontrollwerte vergleichbar ist. Korrekt initiierte Transkripte sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. K=Kontrolle, T=TPA, I=IMX, A= 8-Br-cAMP. Längenmarker: pBR 322 x Hae III.



<u>Mutante</u>		<u>8-Br-cAMP</u>	<u>IMX</u>
pcfos ^H	-750	5 (4-6)	6 (5-7)
	-306	5	5
	- 96	7	7
	- 86	6	6
	- 79	6	6
	- 52	8	8
	Δ -327/-307	7	5
	(SRE) - 96	5	5
	Δ +12/+45	4 (3-5)	4(3-4)
	Δ -327/-307//		
	+12/+45	2	2

Tab.2 Expression stabil transfizierter Mutanten des menschlichen cfos Gens

Die Induzierbarkeit der Mutanten wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Angegeben sind die durchschnittlichen Induktionsfaktoren, in Klammern die Variation.

Die partielle Deletion des SRE's (Mutanten pcfos^H -306 und pcfos^HΔ-327/-307) hatte keine Abnahme der Induzierbarkeit zur Folge. Die Entfernung der Sequenz von +12 bis +45 dagegen führte zu einer leicht verringerten Induzierbarkeit von 4-7fach auf 3-5fach. Überraschenderweise führte jedoch die gleichzeitige Entfernung des SRE's sowie der Sequenz +12/+45 (Mutante pcfos^H Δ-327/-307//+12/+45) zu einer stärkeren Abnahme der Induzierbarkeit: diese Mutante war mit 8-Br-cAMP und IMX nur noch 2fach induzierbar.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß sowohl das SRE, als auch die Region +12/+45 in die cAMP, bzw. IMX stimulierte Expression involviert sind.

8. Kinetik der induzierten cfos Expression

Die Kinetik der Serum-, bzw. TPA- stimulierten cfos Expression ist bereits in früheren Experimenten untersucht worden (6, 9). Dabei ergab sich, daß die Transkriptionsrate bereits 10 Minuten nach Induktorgabe ansteigt, nach 15-20 Minuten ihr Maximum erreicht und nach 30-60 Minuten auf den ursprünglichen Wert abfällt. Da außerdem die Halbwertszeit der mRNA sehr kurz ist, 10-15 Minuten (13), führt die Induktion des cfos Gens nur zu einer transienten Zunahme der cfos mRNA. Dies ist in der Abb.12 für die TPA- und UV- stimulierte Expression des Maus- cfos Gens gezeigt.

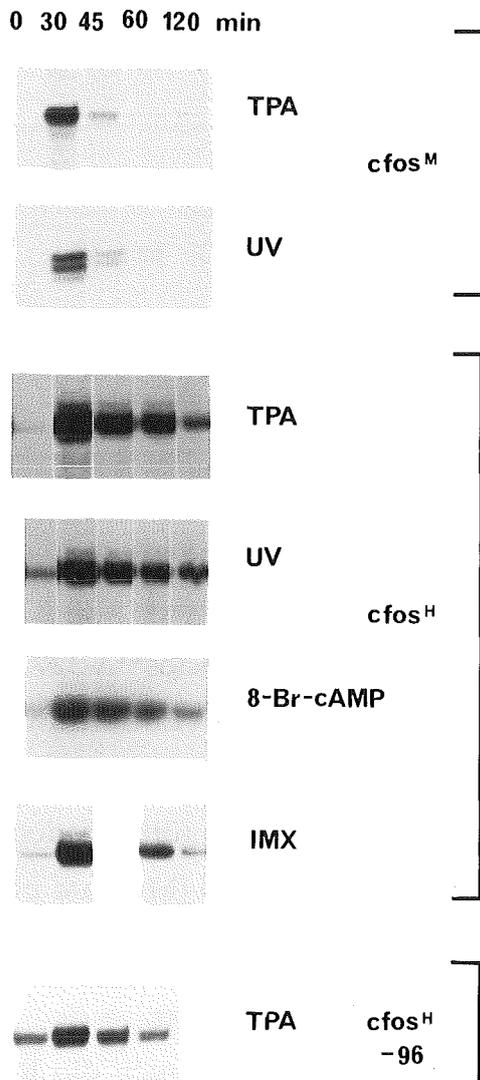


Abb.12 S1 Analyse von Transkripten des endogenen Maus cfos Gens (cfo^M), bzw. des transfizierten, menschlichen cfos Gens (pcfo^H-750 und pcfo^H-96). NIH 3T3 Zellen wurden mit verschiedenen Agentien behandelt und die Gesamt-RNA zu den angegebenen Zeiten präpariert. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden für die Analyse verwendet. Maus-spezifische Probe: TaqI Fragment; Mensch-spezifische Probe: Aval Fragment.

Nach 30 minütiger TPA-, bzw. UV-Behandlung von NIH 3T3 Zellen wurde die höchste cfos mRNA Menge gemessen. Bereits nach 45 Minuten wurde eine Abnahme beobachtet und nach 60, bzw. 120 Minuten waren nur noch geringe cfos mRNA Mengen vorhanden.

Um zu prüfen, ob auch das transfizierte, menschliche cfos Gen die gleiche Kinetik der Expression zeigt, wurde die das Konstrukt pcfos^H-750 enthaltende Massenkultur mit TPA behandelt und die cfos mRNA Menge zu den oben angegebenen Zeiten bestimmt (Abb.12). Die Kinetik der Expression des transfizierten Konstruktes war identisch mit der des endogenen Maus-cfos Gens. Dies bedeutet, daß das Konstrukt pcfos^H-750 nicht nur die zur Induktion, sondern auch die zur Abschaltung der Transkription (siehe unten) notwendigen Sequenzen enthält. Anhand der Mutante pcfos^H-750 wurde auch der zeitliche Verlauf der Expression nach UV-Bestrahlung, 8-Br-cAMP- sowie IMX-Behandlung analysiert. Die Behandlung mit diesen Induktoren hatte eine ähnliche, transiente Expression zur Folge.

Um zu prüfen, ob die durch die Sequenz +12/+45 vermittelte Stimulation ebenfalls transient ist, wurde die TPA- stimulierte Expression der Mutante pcfos^H-96 analysiert: In der Abb.12 ist dargestellt, daß auch diese Mutante mit ähnlicher Kinetik induzierbar war.

9. Mindestens zwei DNA-Elemente sind in die Abschaltung der Transkription involviert

Die Transkription des cfos Gens nach Gabe eines Induktors wird nur kurzfristig verstärkt. Damit stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, der zum Stop der Transkription führt. Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar: 1) die An- und Abschaltung der Transkription wird nur durch die Induzierbarkeit vermittelnde DNA-Element und die daran bindenden Proteine reguliert. D.h., An- oder Abschaltung der Transkription wird durch Bindung, bzw. Nicht-Bindung eines positiv-wirkenden Faktors an das DNA-Element bewirkt (alternativ: Bindung eines Faktors in seiner aktiven, bzw. inaktiven Form). 2) Es

könnte einen zweiten, von der Induktion mehr oder weniger unabhängigen, negativ-wirkenden Mechanismus geben, der dominant über den positiven ist. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde geprüft, ob das SRE, das allein TPA- und Serum- Induzierbarkeit vermitteln kann, ausreichend für die typische Kinetik der cfos Expression ist. Dazu wurde der zeitliche Verlauf der Serum-stimulierten Expression der Mutante pcfos^H (-320/-299)-96 analysiert und mit dem der Mutante pcfos^H -750 verglichen. In Abb.13 ist das Ergebnis einer entsprechenden S1 Analyse gezeigt und in Abb. 14 graphisch dargestellt.

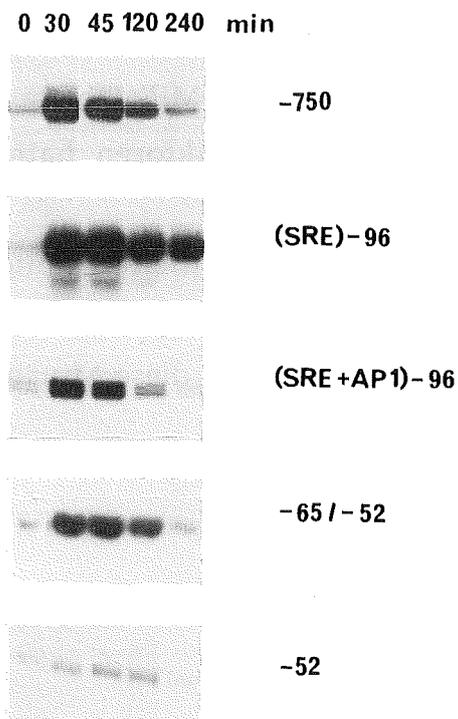


Abb.13 S1 Analyse von Transkripten stabil transfizierter Mutanten des menschlichen cfos Gens. Massenkulturen, die mit den angegebenen Mutanten transfiziert waren, wurden mit Serum behandelt und Gesamt-RNA zu den angegebenen Zeiten präpariert (0= RNA aus unbehandelten Zellen). Je 20 µg Gesamt-RNA wurde in die Analyse eingesetzt. Spezifische Probe: Aval.

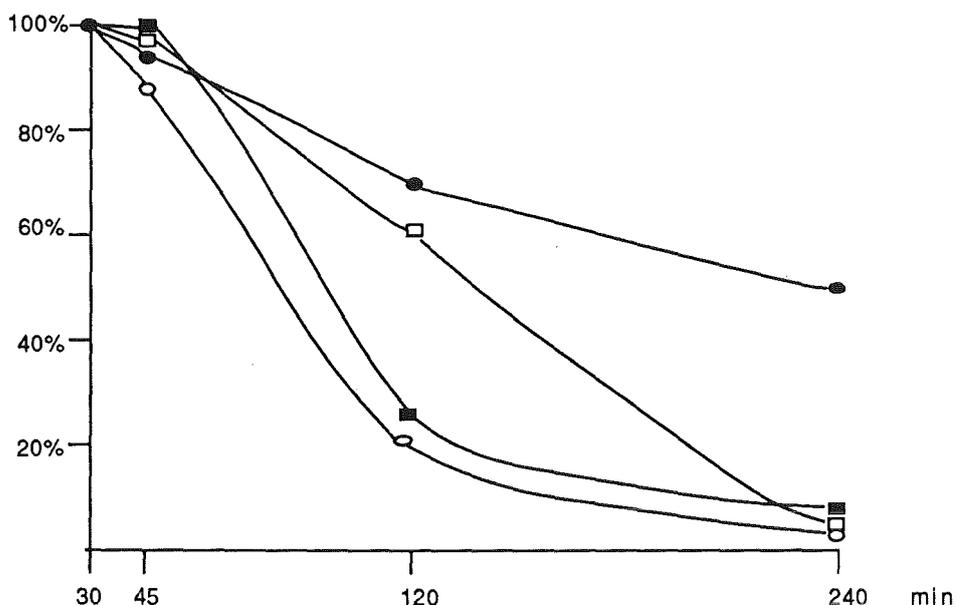


Abb.14 Kinetik der Serum-induzierten cfos mRNA Akkumulation
 offene Kreise: pcfos^H-750; geschlossene Kreise: pcfos^H(SRE)-96;
 geschlossene Rechtecke: pcfos^H(SRE+AP1)-96; offene Rechtecke:
 pcfos^HΔ-65/-52. Die mRNA Menge nach 30min Induktion wurde gleich
 100% gesetzt. Die mRNA Mengen zu späteren Zeitpunkten wurden
 als Teil von 100% ausgedrückt.

Die Effizienz der Serum-Induktion war für beide Mutanten nach 30 Minuten etwa gleich. Während jedoch die vom Konstrukt pcfos^H-750 transkribierte RNA mit zunehmender Zeit rasch abnahm, wurde für die vom Konstrukt pcfos^H(-320/-299)-96 transkribierte RNA eine wesentlich langsamere Abnahme beobachtet. Da die Halbwertszeit der von diesen Konstrukten transkribierten RNAs gleich sein sollte, kann die unterschiedliche Akkumulation der RNAs auf verschieden lange Transkriptionsdauer zurückgeführt werden. Dies war ein erster Hinweis darauf, daß die Abschaltung der Transkription nicht ausschließlich über das SRE erfolgt, sondern mindestens ein weiteres DNA-Element erfordert. Bei der Suche nach diesem DNA-Element kam eine Beobachtung von M. Yaniv zu Hilfe (35). Yaniv konnte zeigen, daß die AP1 Konsensus-Sequenz, die mit dem SRE überlappt, ein Protein aus Balb c 3T3 Extrakten (das sind Mausfibroblasten) bindet, und daß diese Bindung durch TPA-, Serum- und cAMP- Behandlung der Zellen verstärkt wird. Da die AP1 Konsensus-Sequenz nicht zur Induktion durch diese Agentien beiträgt, war es naheliegend, zu untersuchen, ob sie an der Abschaltung der Transkription beteiligt ist. Dazu wurde die Mutante pcfos^H(-320/289)-96 benutzt, die neben

dem SRE auch die AP1 Konsensus-Sequenz enthält. Eine Analyse des zeitlichen Verlaufs der Serum-Induktion ergab, daß dieser der der Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -750$ ähnelte (Abb. 13 und 14). Dies bedeutet, daß die AP1 Konsensus-Sequenz zur Abschaltung der Transkription beiträgt.

Eine Reihe anderer Beobachtungen ließen jedoch vermuten, daß weitere DNA-Elemente an der Abschaltung partizipieren: 1) die Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -96$ war durch TPA zwar nur schwach induzierbar, der zeitliche Verlauf der Expression ähnelte jedoch dem der Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -750$. 2) Die Expression der Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} (-320/-299) -96$ nahm zwar langsamer ab, als die der Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -750$, sie behielt jedoch ihren transienten Charakter.

Bei der Suche nach einem weiteren DNA-Element, das an der Abschaltung beteiligt sein könnte, kamen wiederum "Footprint"-Daten von B.Gloss (persönliche Mitteilung) zu Hilfe. Er konnte zeigen, daß die DNA-Region von Position -73 bis -54 (-60 Element) ein Protein aus NIH 3T3 Zellen bindet. Um die Funktion dieser Sequenz zu ermitteln, wurde durch Kombination von 5' und 3' Bal 31 Klonen die Deletionsmutante $\text{pcfos}^{\text{H}} \Delta -65/-52$ konstruiert, stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert und der zeitliche Verlauf einer serum-stimulierten Expression ermittelt (Abb.13 und 14). Die Effizienz der Serum-Induktion nach 30 Minuten war etwas niedriger als die der Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -750$. Die Abnahme der mRNA Menge erfolgte wiederum etwas langsamer als bei der Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -750$.

D.h., die DNA-Sequenz von Position -65/-52 beeinflusst ebenfalls den zeitlichen Verlauf der Expression.

Die Mutante $\text{pcfos}^{\text{H}} -52$, die noch schwach serum-induzierbar ist, enthält weder die AP1 Konsensus-Sequenz, noch das -60 Element. Die von dieser Mutante transkribierte mRNA nahm erst nach 120 Minuten ab (Abb.13).

Diese Daten zeigen, daß die charakteristische Kinetik der cfos Expression nach Stimulation nicht nur durch das positiv-wirkende SRE, sondern auch durch mindestens zwei negativ-wirkende Elemente beeinflusst wird.

10. Die Bedeutung der AP1 Konsensus-Sequenz und des -60 Elementes für die basale Expression des cfos Gens

Experimente von Sassone-Corsi haben ergeben, daß die Expression des cfos Gens in ruhenden 3T3 Zellen reprimiert ist: er konnte zeigen, daß die Wirkung negativer Faktoren auf den cfos Promoter durch Ko-Transfektion der cfos "upstream" Region (-711/-100) aufgehoben werden kann (21). Daraus konnte der Schluß gezogen werden, daß die cfos "upstream" Region einen oder mehrere Repressoren bindet, die in vivo, durch Transfektion geeigneter DNA-Sequenzen vom cfos Gen abgezogen werden können. Es war daher naheliegend zu prüfen, ob die AP1 Konsensus-Sequenz sowie das -60 Element mit Faktoren interagieren, die einen negativen Einfluß auf die Expression haben. Dazu wurde ein chimäres Gen konstruiert, das cfos Sequenzen von Position -711 bis +45 sowie das bakterielle Chloramphenicol- Acetyltransferase Gen (CAT) als Indikatorgen enthielt. Diese Konstrukt wurde entweder allein oder mit steigenden Mengen AP1 Konsensus-Sequenz, bzw. -60 Element transient in wachsende NIH 3T3 Zellen transfiziert. Die Aktivität des cfos Promoters wurde indirekt, durch Bestimmung der CAT-Aktivität gemessen: dieses Enzym überträgt Acetylgruppen von dem Donormolekül Acetyl-CoA auf das Akzeptormolekül Chloramphenicol. Die acetylierten, bzw. nicht-acetylierten Formen des Chloramphenicols können chromatographisch voneinander getrennt werden. Verwendet man radioaktiv markiertes Chloramphenicol, so können die Reaktionsprodukte leicht durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Inkubiert man Zellextrakte mit einem Überschuß an Acetyl-CoA und Chloramphenicol, so ist die Menge des acetylierten Chloramphenicols ein direktes Maß für die Menge des CAT-Proteins, bzw. der entsprechenden mRNA.

	AP1			-60			IRE
	50x	100x	200x	50x	100x	200x	100x
pmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	55	88	121	61	129	149	44

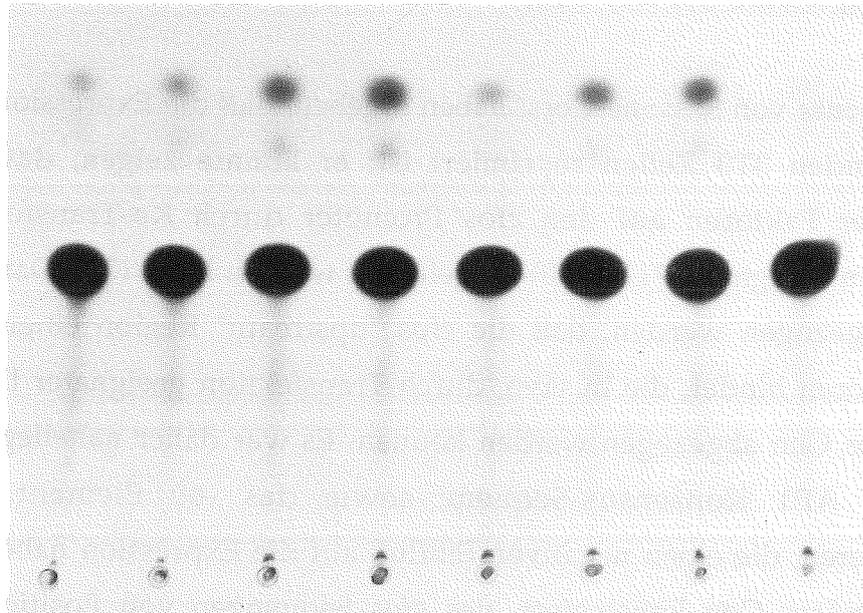


Abb. 14 Aktivität des (-711/+45) fos/CAT Plasmids in NIH 3T3 Zellen in An- oder Abwesenheit von Kompetitor-Oligonukleotiden; AP1 (-300/-289), -60 Element (-73/-54), IRE ("interferon responsive element" des menschlichen invariante Kette Gens. Dieses Oligonukleotid hat keine Homologie zum cfos Gen). Für den CAT-Assay wurden je 300 µg Proteinextrakt verwendet.

Die Abb.15 zeigt das Ergebnis der Ko-Transfektion des fos/Cat Plasmids mit der AP1 Konsensus-Sequenz, bzw. des -60 Elementes. Bei alleiniger Transfektion des fos/CAT Plasmids wurde nur eine geringe CAT-Aktivität erhalten. Ko-Transfektionen der DNA-Elemente in 50fach molarem Überschuß führte zu einer geringfügigen Zunahme der CAT-Aktivität, die durch einen 100fach, bzw. 200fach molaren Überschuß weiter gesteigert wurde. Ein unspezifisches DNA-Element (IRE = "interferon responsive element" des invarianten Kette Gens), das in 100fach molarem Überschuß transfiziert wurde, hatte keinen Einfluß.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl die AP1 Konsensus-Sequenz, als auch das -60 Element in vivo negativ-wirkende Faktoren von der cfos "upstream" Region abziehen und damit die fos/CAT Expression steigern können. Die Effizienz beider DNA-Elemente war in diesem Test etwa gleich.

11. Bindung spezifischer Kernproteine an die AP1 Konsensus-Sequenz und das -60 Element

Daß die Regulation des *cfos* Gens einer negativen Kontrolle unterliegt, wurde auch durch Experimente von Axel Schönthal gezeigt (36). Er fand heraus, daß in NIH 3T3 Zellen, die ein *cfos* überexprimierendes Plasmid enthielten (SV40/*fos*), die Expression eines ko-transfizierten *fos*/CAT-Konstruktes reduziert war. Dies war ein starker Hinweis darauf, daß das *cfos* Protein, direkt oder indirekt eine negative Wirkung auf seine eigene Expression ausübt. Es war daher von großem Interesse zu prüfen, ob die AP1 Konsensus-Sequenz und das -60 Element mit dem *cfos* Protein interagieren.

Um die Wechselwirkung der beiden DNA-Elemente mit Proteinen zu analysieren, wurden "Bandshift"-Experimente mit Kernextrakten aus NIH 3T3 Zellen, die entweder nur geringe, oder aber große Mengen *cfos* Protein enthalten sollten, durchgeführt. Um die Menge des *cfos* Proteins in den Zellen beeinflussen zu können, wurden sie stabil mit Plasmiden transfiziert, die entweder das *cfos* Gen unter der Kontrolle des Dexamethason-induzierbaren MMTV-Promoters (MMTV/*fos*) oder eine Umkehrung des Gens ebenfalls unter der Kontrolle des MMTV-Promoters enthielten (MMTV/*sof*), (37). Durch Behandlung der Zellen mit Dexamethason sollte im Fall des MMTV/*fos* Konstruktes eine mRNA gebildet werden, deren Translation ein funktionsfähiges *fos* Protein liefert. Von dem MMTV/*sof* Konstrukt sollte eine mRNA transkribiert werden, die komplementär zur *cfos* mRNA ist, und durch Hybridisierung an diese die Translation verhindern sollte. Kernextrakte aus Zellen, die für 9 Stunden mit Dexamethason behandelt worden waren, wurden von Axel Schönthal zur Verfügung gestellt. Als DNA-Proben, bzw. homologe und nicht-homologe Kompetitoren wurden synthetische, doppelsträngige Oligonukleotide benutzt. Die AP1 Konsensus-Sequenz sowie das -60 Element wurden radioaktiv markiert und mit *sof*-, bzw. *fos*- Extrakten in An- und Abwesenheit von Kompetitoren inkubiert.

AGCTTGCTGCGTCAGCCG (AP1 fos)

AGCTTGATGAGTCAGCCG (AP1 Koll.)

CGGGATGTCCATATTAGGACATCT (SRE)

GATCTTGAGCCCGTGACGTTTACA (-60 Element)

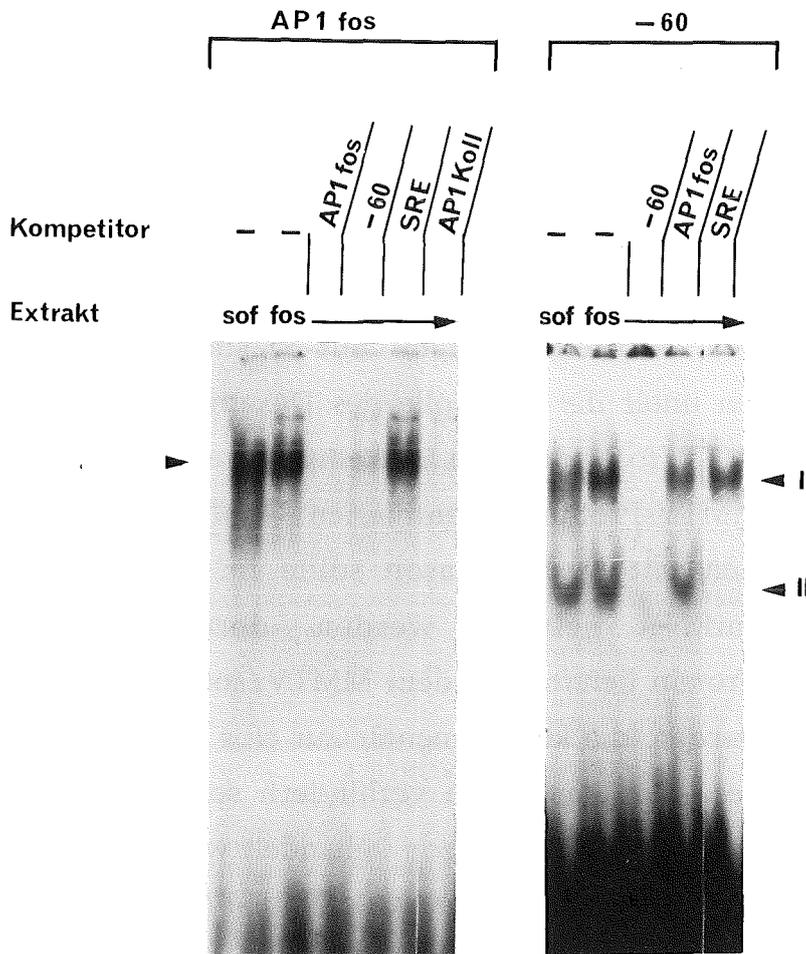


Abb.16 Analyse der Bindung spezifischer Kernproteine an die AP1 Konsensus-Sequenz (-300/-292), bzw. das -60 Element (-73/-54). Je 10 µg Kernextrakt (AP1 Konsensus-Sequenz), bzw. 4 µg Kernextrakt (-60 Element) aus "sof"- und "fos"- Extrakten wurden mit je 50f Mol ³²P endmarkierter Probe bei RT inkubiert und das Gemisch gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spezifität der Bindung wurde durch Zusatz von Kompetitoren in je 50fach molarem Überschuß untersucht. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind angegeben; fett gedruckt sind die Sequenzen, die im cfos Gen vorkommen; normal gedruckt sind die entsprechenden Linkersequenzen.

In der Abb.16 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Die AP1 Konsensus-Sequenz bildete sowohl mit sof-, als auch mit fos- Extrakten einen Hauptkomplex; daneben wurden einige schwächere Signale beobachtet. Mit beiden Extrakten wurde etwa gleich viel Hauptkomplex erhalten. Die Spezifität dieses Komplexes wurde durch Zugabe nicht-markierter Kompetitoren geprüft. Ein 50fach molarer Überschuß des homologen Oligonukleotids verhinderte die Komplexbildung völlig, während ein Oligonukleotid mit nicht-homologer Sequenz (SRE) keinen Einfluß auf die Komplexbildung hatte. Ein Oligonukleotid mit sehr ähnliche Sequenz, die AP1 Bindungsstelle des Kollagenasegens, verringerte die Komplexbildung deutlich, wirkte jedoch nicht so effizient wie das homologe Oligonukleotid. Auch das -60 Element, das nur geringe Homologie zur AP1 Konsensus Sequenz hat, kompetierte um die Bildung des Komplexes.

Bei Verwendung des -60 Elementes als radioaktive Probe wurden mit sof- und fos- Extrakten zwei Komplexe mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität erhalten (I und II; I = zwei dicht nebeneinander liegende Signale). Keiner der beiden Komplexe komigrierte mit dem AP1 Konsensus-Sequenz /Proteinkomplex. Der Komplex I war in fos-Extrakten leicht verstärkt. Ein 50fach molarer Überschuß des homologen Oligonukleotids verhinderte die Bildung beider Komplexe, während ein nicht-homologes Oligonukleotid (SRE) zwar die Bildung des Komplexes II, aber nicht die des Komplexes I verhinderte. Der Komplex II ist daher als unspezifisch anzusehen. Die AP1 Konsensus-Sequenz des fos Gens verminderte die Komplexbildung um ca. 50%. Die Tatsache, daß die AP1 Konsensus-Sequenz ein schlechterer Kompetitor für das -60 Element ist als umgekehrt, mag zum Teil dadurch erklärt werden, daß die AP1 Konsensus-Sequenz generell weniger effizient Proteine bindet (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die AP1 Konsensus-Sequenz sowie das -60 Element mindestens ein Kernprotein (bzw. einen Proteinkomplex) spezifisch binden können.

Um zu prüfen, ob die Proteine, die an beide DNA-Elemente binden, das cfos Protein selbst (oder ein fos-verwandtes Protein, (37)) sind, wurden Antikörper in die "Bandshift"-Experimente eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene

Antikörper verwendet: ein polyklonales Kaninchen-Antiserum, für dessen Herstellung das ganze fos-Protein benutzt worden war (455) sowie ein monoklonaler Antikörper (411), der gegen den N-Terminus des cfos Proteins gerichtet war (dieser Antikörper: reagiert nicht mit gereinigtem AP1 Protein; B.Stein, persönliche Mitteilung). Fos-Extrakte wurden über Nacht mit diesen Antikörpern inkubiert; dann wurden die radioaktiven DNA-Proben zugegeben und nach Gelelektrophorese die Produkte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Das Ergebnis ist in Abb.17 gezeigt.

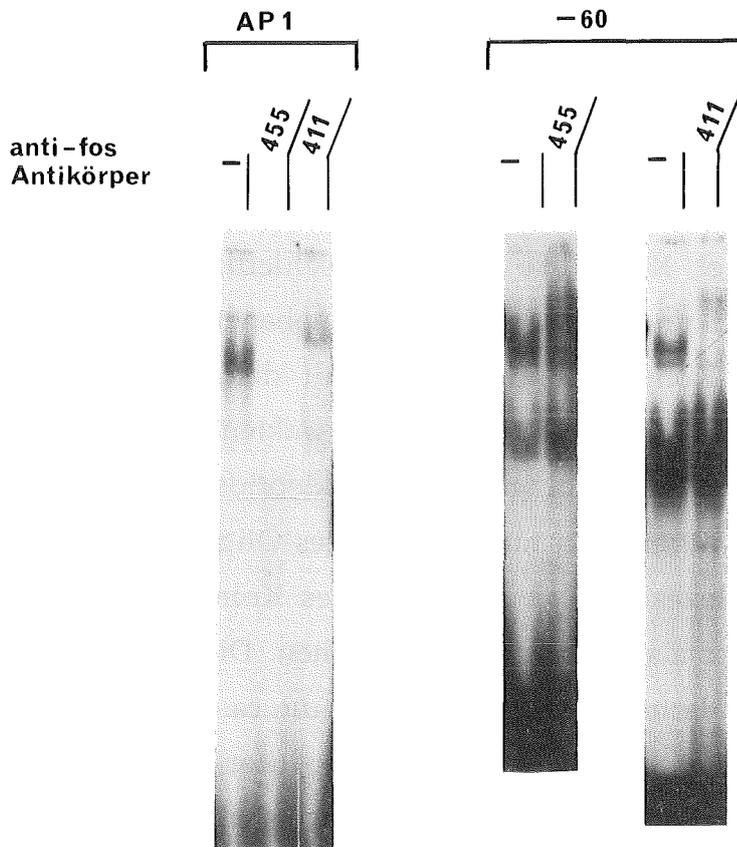


Abb.17 Analyse des Einflusses von anti-fos Antikörpern auf die Bindung spezifischer Kernproteine an die AP1 Konsensus-Sequenz, bzw. das -60 Element. Je 4 µl des Antiserums 455, bzw. 4 µl des monoklonalen Antikörpers 411 wurden mit je 14 µg Kernextrakt aus "fos"-Zellenen ÜN bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde eine je 10, bzw. 4 µg Kernextrakt entsprechende Menge mit je 50f Mol ³²P endmarkierter Probe gemischt und nach weiterer Inkubation bei 0°C die Reaktionsprodukte gel-elektrophoretisch aufgetrennt.

Sowohl das polyklonale Antiserum, als auch der monoklonale Antikörper

beeinflussten die Komplexbildung beider DNA-Proben mit Kernproteinen. Das polyklonale Antiserum (455) verhinderte die Komplexbildung mit der AP1 Konsensus-Sequenz vollständig, während der monoklonale Antikörper (411) zum Auftreten eines neuen, schwächeren Signals mit geringerer elektrophoretischer Mobilität führte. Der Einfluß der Antikörper auf die Komplexbildung mit dem -60 Element war damit nicht identisch: das polyklonale Antiserum verhinderte nicht die Komplexbildung, sondern induzierte eine Reihe neuer Signale mit geringer elektrophoretischer Mobilität. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Antiserum mehrere Antikörper enthält, die an verschiedene Epitope binden ohne damit die Interaktion mit der DNA zu stören. Der monoklonale Antikörper verhinderte die Komplexbildung vollständig. Der Komplex II wurde durch die Antikörper nicht beeinflusst.

Diese Daten sprechen dafür, daß die AP1 Konsensus-Sequenz und das -60 Element ähnliche, aber nicht identische Proteine oder Proteinkomplexe binden. Es ist denkbar, daß beide DNA-Proben unterschiedlich modifizierte Formen des fos Proteins, oder aber heterologe Komplexe aus fos Protein und anderen Proteinen binden können.

Diskussion

Die Expression des Proto-Onkogens *cfos* wird durch zahlreiche Agenzien stimuliert. Neben den bereits beschriebenen Induktoren UV-Licht (11), TPA (9), Serum (5) und PDGF (6) wurden zwei weitere Agenzien gefunden, die die Expression des *cfos* Gens in NIH 3T3 Zellen induzieren: 8-Br-cAMP und der Phosphodieserese Inhibitor IMX. Alle Agenzien induzieren die *cfos* Expression mit ähnlicher Kinetik.

Durch Analysen von Deletionsmutanten des menschlichen *cfos* Gens konnten zwei DNA-Elemente identifiziert werden, die die Induktion durch die oben genannten Agenzien vermitteln (SRE; (+18/+38) Element). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von Zellen mit UV-Licht, TPA und Serum zu einer verstärkten Bindung mindestens eines Kernproteins an das SRE führt.

In nicht-stimulierten Zellen ist die Expression des *cfos* Gens negativ reguliert. Durch Ko-Transfektionsexperimente konnten zwei negativ wirkende DNA-Elemente (-300/-289; -73/-54) charakterisiert werden. Beide DNA-Elemente binden Kernproteine, die mit Antikörpern, die gegen das *cfos* Protein gerichtet sind, reagieren.

1. Signale, die auf unterschiedlichen Wegen in der Zelle übertragen werden, aktivieren die *cfos* Expression über das gleiche DNA-Element

Die Induktion des *cfos* Gens durch UV-Licht, TPA und PDGF wird hauptsächlich durch die -320/-319 Region vermittelt. Diese Sequenz wurde schon zuvor von R. Treisman als "serum responsive element" charakterisiert (19). Das SRE überlappt mit der Konsensus-Sequenz eines anderen cis-wirkenden DNA-Elementes: einer AP1 Konsensus-Sequenz. Während diese Sequenz für die Induzierbarkeit des *cfos* Gens keine Rolle spielt, wurde für eine Reihe anderer Gene, z.B. das menschliche Kollagenasegen (20b) gezeigt, daß die TPA-Induktion durch eine solche AP1 Sequenz vermittelt wird. D.h.,

verschiedene TPA-induzierbare Gene werden über unterschiedliche Sequenzmotive aktiviert. Erst kürzlich gewonnene Ergebnisse zeigen, daß es eine Hierarchie unter den TPA-induzierten Genen gibt: die TPA-vermittelte Induktion des Kollagenasegens, die zeitlich später als die cfos Induktion erfolgt, erfordert die Synthese von cfos Protein (36). Mehr noch, das DNA-Element, das die TPA-Induktion der Kollagenase vermittelt, interagiert mit fos-Protein. Diese Hierarchie unter den TPA-induzierten Genen mag zum Teil erklären, warum TPA-Induzierbarkeit durch verschiedene Sequenzmotive vermittelt werden kann. Daneben spielt auch die Zellspezifität von TPA-Induktion vermittelnden Elementen eine Rolle (38).

TPA, PDGF und Serum sind Signale, die mit Rezeptormolekülen der Zelle interagieren und zu physiologischen Veränderungen führen. Der Wachstumsfaktor PDGF bindet an ein Protein, das in der Zellmembran verankert ist, den PDGF Rezeptor. Diese Reaktion an der äußeren Zellmembran führt zur Bildung eines sekundären Botenstoffes, des Diacylglycerols, der das Signal ins Zellinnere leitet. Das Diacylglycerol bindet an ein cytoplasmatisches Enzym, die Proteinkinase C (Übersichtsartikel, 39), die durch diese Bindung aktiviert und an die Zellmembran transloziert wird. Die aktive Form des Enzyms überträgt Phosphatgruppen auf noch unbekannte Substrate, die schließlich das Signal -über Zwischenstufen? - in den Zellkern weiterleiten und dort zu einer Veränderung der Genexpression führen. Der Tumorpromoter TPA verkürzt diesen Signalübertragungsweg, indem er direkt an die Proteinkinase C bindet und auf ähnliche Weise wie das Diacylglycerol die Proteinkinase C in ihre aktive Form überführt. Im Gegensatz zum PDGF und TPA stellt Serum kein einfaches Signal dar, sondern ist ein Gemisch aus zahlreichen biologisch aktiven Substanzen, darunter auch solchen, die zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führen. Diesen drei Induktoren des cfos Gens, PDGF, TPA und Serum ist also eine Aktivierung der Proteinkinase C gemeinsam. Es ist daher nicht überraschend, daß diese Substanzen zur Aktivierung des gleichen Gens führen und dabei das gleiche DNA-Element benutzen.

Der vierte Induktor, der ebenfalls hauptsächlich über das SRE wirkt, ist UV-Licht. Im Gegensatz zu den anderen Induktoren, induziert er jedoch keine

Translokation der Proteinkinase C an die Zellmembran (40). Das primäre Zielmolekül für UV-Licht ist die DNA, deren Struktur durch Bestrahlung geschädigt wird. Daß die DNA-Schädigung in Zusammenhang mit der cfos Induktion steht, geht aus folgender Beobachtung hervor: das UV-Absorptionsspektrum der DNA fällt mit dem Aktionsspektrum in Bezug auf die cfos Aktivierung zusammen (40). Damit stellt sich die Frage, wie ein Induktor, dessen primäre Wirkung so verschieden von der des PDGF's und des TPA's ist, über das gleiche DNA-Element wirken kann. An welcher Stelle laufen die Signalübertragungswege, die von der Proteinkinase C, bzw. einer geschädigten DNA ausgehen, zusammen?

In diesem Zusammenhang ist die Frage, ob identische trans-aktivierende Proteine durch UV-Bestrahlung, bzw. TPA- und Serum- Behandlung aktiviert werden, von großer Bedeutung. Die Bandshift-Analysen haben ergeben, daß spezifische Kernproteine nach UV-Bestrahlung, bzw. TPA- und Serum-Behandlung verstärkt an das SRE binden. Da die Induktion des cfos Gens durch diese Agenzien auch in Gegenwart von Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinsynthese stattfindet, kann diese verstärkte Bindung nicht auf die Neusynthese eines Proteins zurückgeführt werden. Vermutlich wird ein bereits vorhandenes Protein so modifiziert, daß seine Affinität zum SRE vergrößert wird. Während mit UV-Extrakten nur die verstärkte Bindung eines Proteins (oder Proteinkomplexes; Komplex I) beobachtet wurde, war in TPA- und Serum-Extrakten die Bindung zweier Proteine verstärkt (Komplex I und III). Das durch UV-Bestrahlung induzierte Protein komigrierte mit einem der Proteine, die in TPA- und Serum- Extrakten induziert sind. UV-Licht, TPA und Serum stimulieren daher vermutlich die Bindung des gleichen trans-aktivierenden Proteins an das SRE. Die Identität des zweiten, nur in TPA- und Serum-Extrakten induzierten Proteins (Komplex III), ist unklar. In verschiedenen Experimenten variierte die Intensität dieses Signals stark. Es ist daher nicht auszuschließen, daß der Komplex III aus dem Komplex I durch die Einwirkung von Proteasen entsteht. Es ist ebenfalls möglich, daß der Komplex I aus mehreren nicht-kovalent verknüpften Proteinen besteht, die während des Experimentes dissoziieren.

Die Bindung spezifischer Kernproteine an das SRE wurde bereits von R. Treisman (23), R. Roeder (41) und A. Nordheim untersucht (42). Mit den von R. Treisman verwendeten HeLa-Extrakten, die aus unbehandelten, bzw. Serum-behandelten Zellen präpariert worden waren, konnte keine induzierbare Bindung an das SRE festgestellt werden: Kontroll- bzw. Serum- Extrakte enthielten etwa gleich viel Bindungsaktivität. R. Treisman und A. Nordheim gelang es, das an das SRE-bindende Protein SRF = serum responsive factor) zu charakterisieren. Es handelt sich um ein ca. 62-67kd großes Protein.

R. Roeder analysierte die Bindung spezifischer Kernproteine an das SRE mit Hilfe von Extrakten aus unbehandelten, bzw. EGF- behandelten A431 Zellen. Er fand eine ca. 5fach verstärkte Bindung in EGF-behandelten Zellen gegenüber Kontroll-Zellen.

Geht man davon aus, daß die in vitro Bindungsstudien die Situation im Zellkern widerspiegeln, so muß angenommen werden, daß die Bindung eines trans-aktivierenden Proteins an das SRE in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich reguliert wird. Es bleibt zu prüfen, ob das SRE-bindende Protein in verschiedenen Zelllinien identisch ist.

2. Das (+18/+38) Element

Die maximale Stimulation des cfos Gens durch UV-Licht, TPA und Serum erfordert die Anwesenheit des SRE's. Jedoch sind Deletionsmutanten, denen das SRE fehlt, noch immer schwach mit UV-Licht, TPA und Serum induzierbar. Es gelang ein DNA-Element zu definieren, das für die residuale Induktion durch UV-Licht und TPA, nicht aber Serum, verantwortlich ist. Mit Hilfe von Deletionsmutanten wurde das DNA-Element in der Region von +12/+45 lokalisiert. In "Footprint"-Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Region von Position +18/+38 ein Kernprotein aus NIH 3T3 Zellen bindet. Diese Bindung wurde durch UV-Behandlung der Zellen nicht verstärkt (B.Gloss, persönliche Mitteilung). Da dieses Element 3' von der Initiationsstelle der Transkription befindet, ist es auch in der mRNA vorhanden. Damit ist die

Möglichkeit gegeben, daß diese Sequenz nicht durch eine Stimulation der Transkription wirkt, sondern einen Einfluß auf die Halbwertszeit der mRNA hat. Ein synthetisches Oligonukleotid (+18/+38), das vor den β -Globin Promoter inseriert wurde, konnte keine UV- und TPA- Induzierbarkeit vermitteln. Dies schließt jedoch nicht aus, daß das Element im cfos Gen auf die Transkription wirkt. Es mag sein, daß zu seiner Funktion noch weitere Sequenzen notwendig sind. Ebenfalls denkbar ist, daß dieses Element strikt positionsabhängig wirkt. Die Region von Position +12/+45 hat keine Homologie zu bereits bekannten DNA-Elementen.

3. Die cfos Induktion durch 8-Br-cAMP und IMX

Die Expression des cfos Gens wurde in NIH 3T3 Zellen durch 8-Br-cAMP, ein synthetisches Analogon des cAMP's sowie IMX, einen Phosphodiesterase Inhibitor schwach stimuliert (4-7fach). Der Phosphodiesterase Inhibitor verhindert die Hydrolyse von cAMP in AMP und führt so zu einer Erhöhung der cAMP Konzentration in der Zelle. cAMP ist ein sekundärer Botenstoff, mit dessen Hilfe verschiedene, externe Signale, wie z.B. die Bindung von Adrenalin an Beta-Rezeptoren, in die Zelle übertragen werden. Auch bei dieser Signalübertragung spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine große Rolle. Das die Phosphatgruppen übertragende Enzym ist die A-Kinase, die durch Bindung von cAMP aktiviert wird.

Um zu prüfen, ob Signale die von der A-Kinase, bzw. der Proteinkinase C übertragen werden, über die gleichen DNA-Elemente im cfos Gen wirken, wurde die Induzierbarkeit von Deletionmutanten des menschlichen cfos untersucht. Während die Deletion des SRE's keinen Einfluß auf die Induzierbarkeit hatte, führte die Deletion der Sequenzen von +12 bis +45 zu einer schwachen Abnahme der Induzierbarkeit (3-5fache Induktion). Überraschenderweise verminderte sich die Induzierbarkeit bei gleichzeitiger Deletion des SRE's und der +12/+45 Region auf einen Faktor 2.

Diese Beobachtung ist mit herkömmlichen Modellen über die Wirkungsweise

cis-aktivierender Elemente nur schwer in Einklang zu bringen. Möglicherweise wird durch cAMP-Behandlung von NIH 3T3 Zellen ein trans-aktivierendes Protein aktiviert, das sowohl mit dem SRE, als auch mit der +12/+45 Region interagieren kann. Es scheint keine positive Kooperation zwischen den beiden DNA-Elementen stattzufinden, da Deletionsmutanten, denen das SRE fehlt, ähnlich gut induzierbar sind wie solche, die beide DNA-Elemente besitzen. Jedoch sind weder das SRE, noch die Region +18/+38 allein ausreichend, um cAMP Induzierbarkeit auf einen heterologen Promoter zu übertragen (Daten nicht gezeigt). Es bleibt zu prüfen, ob noch weitere DNA-Elemente im cfos Gen an der cAMP Induktion partizipieren.

Die Sequenz des cfos Gens von Position -64 bis -59 (TGACGT) kommt in einem DNA-Element, das die cAMP- Induzierbarkeit des Ratten-Somatostatin Gens in PC12-Zellen vermittelt, vor (43). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß diese Region des cfos Gens das trans-aktivierende Protein binden kann, das auch an das cAMP Element des Somatostatin Gens bindet (Montminy, persönliche Mitteilung). Diese Region scheint jedoch in NIH 3T3 Zellen keine Rolle für die cAMP Induzierbarkeit des cfos Gens zu spielen: Deletionsmutanten, denen diese Region fehlt (pcfos^H -52 und pfos^H Δ -65/-52) werden durch 8-Br-cAMP und IMX ähnlich gut stimuliert wie die Mutante pcfos^H -750). Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, daß in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche trans- und cis-wirkende Faktoren die cAMP Induzierbarkeit vermitteln. Eine Analyse der cfos Induktion in PC 12 Zellen sollte darüber Aufschluß geben.

4. Die negative Regulation der cfos Expression

Die Expression des cfos Gens wird nicht nur durch stimulierende, sondern auch durch reprimierende Faktoren kontrolliert. Von Sassone-Corsi wurde gezeigt, daß in ruhenden NIH 3T3 Zellen negativ wirkende Faktoren an die 5'flankierende Region des cfos Gens binden und dadurch die Aktivität des cfos Promoters herabgesetzt wird (21). Durch Ko-Transfektion eines Überschusses der 5'flankierenden Sequenzen (-711/-100) konnte die Promoteraktivität erhöht

werden. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei DNA-Elemente identifiziert werden, die bei Kotransfektion mit einem fos/CAT Plasmid (-711/+45 fos/CAT) zu einer Erhöhung der Promoteraktivität führten: die AP1 Konsensus-Sequenz (-300/-289) und das -60 Element (-73/-54). Die Zunahme der Promoteraktivität war dosisabhängig. Aus diesen Beobachtungen kann der Schluß gezogen werden, daß die cfos Regionen (-300/-289) und (-73/-54) Repressoren binden, die bei Ko-Transfektion mit einem Überschuß an DNA vom cfos Gen abgezogen werden, so daß die Promoteraktivität steigt.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die cfos "upstream" Region noch weitere DNA-Elemente besitzt, die negativ wirkende Faktoren binden können. In der Region von -212/-204 (CTGACACAG) befindet sich eine weitere AP1 Konsensus-Sequenz. Es bleibt zu prüfen, ob diese Sequenz ebenfalls Repressormoleküle binden kann.

Das -60 Element scheint nicht in allen Zelltypen mit negativ wirkenden Faktoren zu interagieren. Von R. Roeder wurde gezeigt, daß die Deletion dieses Elementes die Expression eines fos/CAT Konstruktes in A431 (epidermale Karzinom-Zellen) Zellen stark vermindert (44). Die Funktion dieses Elementes scheint daher entweder zellspezifisch oder abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle zu sein.

Die AP1 Konsensus-Sequenz und das -60 Element sind nicht nur für die basale Expression des cfos Gens von Bedeutung, sondern auch an der Abschaltung der Transkription nach vorheriger Induktion beteiligt. Deletionsmutanten, denen eines der Elemente fehlt, zeigten nach Induktion eine veränderte Kinetik der Expression: die von diesen Konstrukten transkribierte RNA akkumulierte länger als die des "Wildtyps". Da die von allen Konstrukten transkribierten RNAs die gleiche Struktur haben, kann die verlängerte Akkumulation nicht durch eine veränderte Halbwertszeit erklärt werden und muß daher auf eine längere Transkriptionsdauer zurückgeführt werden.

Durch welchen Mechanismus könnte die Abschaltung der Transkription bewirkt werden?

Im Hinblick auf diese Frage könnte die Lage des -300/-292 Elementes von großer Bedeutung sein. Dieses Element überlappt mit dem SRE, d.h., dem

DNA-Element, das (mindestens) einen Faktor bindet, der einen positiven Einfluß auf die Transkription hat. Aus sterischen Gründen ist es sehr unwahrscheinlich, daß beide Elemente gleichzeitig ein Protein binden können, so daß in einer Situation, in der beide Proteine vorhanden sind, eine Konkurrenz um Bindung stattfindet.

Die Bandshift Experimente zeigten, daß das -300/-292 (bzw.289) Element mindestens ein Kernprotein spezifisch bindet. Dieses Protein (es könnte auch ein Proteinkomplex sein) reagiert mit Antikörpern, die gegen das cfos Protein gerichtet sind. Überraschenderweise gab es jedoch keine Unterschiede in der Bindungsaktivität in sof-, bzw. fos- Extrakten. Dies könnte bedeuten, daß die Bindung an die AP1 Konsensus-Sequenz nicht ausschließlich von der fos Proteinmenge abhängt. Es ist denkbar, daß nur bestimmte modifizierte Formen des fos Proteins diese Sequenz binden können und diese modifizierten Formen auch in fos-Extrakten limitiert sind. Eine andere Möglichkeit ist, daß das fos Protein nicht allein, sondern im Komplex mit anderen Proteinen an DNA bindet und diese Proteine in sof- und fos- Extrakten limitiert sind.

Das cfos Protein schaltet vermutlich seine eigene Synthese ab. Damit werden Experimente von A. Schönthal bestätigt, der zeigen konnte, daß in NIH 3T3 Zellen, die ein fos überexprimierendes Protein enthielten, die Expression eines ko-transfizierten fos/CAT Konstruktes reduziert war (36).

Aus diesen Beobachtungen kann folgendes Modell der An- und Abschaltung der Transkription abgeleitet werden: nach Gabe eines Induktors kommt es zur Modifikation eines bereits vorhandenen Kernproteins, das so eine höhere Affinität zum SRE erhält. Das an das SRE gebundene Protein interagiert mit der RNA-Polymerase II, so daß es zu einer Steigerung der Transkriptionseffizienz kommt. Dies führt zu einer starken Zunahme an cfos mRNA und schließlich auch cfos Protein. Das cfos Protein gelangt in den Zellkern und konkurriert nun mit dem SRE-bindenden Protein um Bindung in der Region -320/-289. Mit zunehmender Zeit gelangt immer mehr cfos Protein in den Kern, so daß das SRE-bindende Protein schließlich vollständig verdrängt wird.

Dieses Modell steht mit zwei anderen Beobachtungen im Einklang: 1) M. Yaniv konnte zeigen, daß das -300/-292 Element ein Protein bindet und diese Bindung

durch Serum-, TPA- und cAMP- Behandlung von Zellen verstärkt wird (35). 2) Die Abschaltung der Transkription erfordert die Neusynthese eines Proteins (45).

Das -60 Element ist ebenfalls an der Abschaltung der Transkription beteiligt. Es gibt jedoch keine Hinweise, daß es mit einem positiv wirkenden Element überlappt. Auch das -60 Element bindet ein Protein (oder einen Proteinkomplex), das mit cfos Antikörpern reagiert. Dieses Protein (bzw. dieser Proteinkomplex) scheint jedoch nicht identisch mit dem zu sein, das an die AP1 Konsensus-Sequenz bindet.

Ausblick

Die Expression des Proto-Onkogens *cfos* wird durch zahlreiche Signale stimuliert. Die Aktivierung des *fos* Gens ist jedoch nicht der Endpunkt verschiedener Signalübertragungsketten, sondern scheint selbst nur eine Zwischenstufe zu sein, denn das Gen kodiert für ein trans-wirkendes Protein und leitet dadurch Signale weiter zu anderen Genen (36, 46). Das *cfos* ist damit das zweite Beispiel für ein Proto-Onkogen, das für ein trans-wirkendes Protein kodiert; das andere ist das Proto-Onkogen *cjun*, das für das AP1 Protein kodiert (47). Es sind eine Reihe cis-wirkender DNA-Elemente beschrieben worden, die mit dem AP1 Protein interagieren (22). Durch Sequenzvergleiche wurde folgende AP1 Konsensus-Sequenz für AP1 Bindung definiert: TGAGTCA. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine sehr ähnliche Sequenz (TGCGTCA) auch mit *fos* Protein interagieren kann. Kürzlich wurde veröffentlicht, daß ein DNA-Element des Adipocyten P2 Gens sowohl mit AP1 Protein als auch mit *fos* Protein in Wechselwirkung treten kann (47). Damit stellt sich die Frage, warum es eigentlich zwei verschiedene Kernproteine gibt, die mit ähnlichen, oder dem gleichen DNA-Element interagieren. Binden sowohl *fos*- als auch AP1 Protein allein an diese Motive oder gibt es gemischte Komplexe aus beiden Proteinen? Interagieren *fos*- und AP1 Protein auf unterschiedliche Weise mit dem RNA Polymerase II Komplex? Eine genaue Analyse der Protein-/DNA-Wechselwirkungen sollte Aufschluß über diese Frage geben. Ein anderer Ansatzpunkt ist die Untersuchung der Regulation des *cjun* Gens. Wird es koexprimiert mit dem *cfos* Gen, beeinflussen die Proteine beider Gene ihre Expression wechselseitig?

Literaturverzeichnis

- 1) Finkel, M.P., Biskis, B.O., Jinkins, P.B. (1966)
Science 151, 698-701
Virus induction of osteosarcomas in mice.
- 2) Curran, T., Mac Connell, W.P., Van Straaten, F., Verma, I.M. (1983)
Molec. Cell. Biol. 3, 914-921
Structure of the FBJ Murine Osteosarcoma Virus genome: Molecular cloning
its associated helper virus and the cellular homolog of the vfos gene from
mouse and human cells.
- 3) Curran, T., Van Beveren, C., Ling, N., Verma, I.M. (1984)
Cell 36, 259-268
Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis.
- 4) Müller, R., Slamon, J.D., Tremblay, J.M., Cline, M.J., Verma, I.M. (1982)
Nature 299, 640-644
Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal
development of the mouse.
- 5) Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. (1984)
Nature 312, 716-720
Induction of cfos gene and protein by growth factor precedes activation of
myc.
- 6) Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T., Verma, I.M. (1984)
Nature 312, 711-715
Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the
cfos gene and protein.
- 7) Curran, T., Morgan, J.I. (1984)
Science 229, 1265-1268
Superinduction of cfos by nerve growth factor in the presence of peri-
pherally active benzodiazepines.

- 8) Müller, R., Curran, T., Müller, D., Guilbert, C. (1985)
Nature 314, 546-549
Induction of cfos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation.
- 9) Greenberg, M.E., Ziff, E.B. (1984)
Nature 311, 433-437
Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the cfos proto-oncogene.
- 10) Ran, W., Dean, M., Levine, R.A., Henkel, C., Campisi, J. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8216-8220
Induction of cfos and cmyc mRNA by epidermal growth factor or calcium-ionophore is cAMP dependent.
- 11) Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Pöting, A., Herrlich, P. (1985)
Cancer Cells 3: Growth factors and Transformation; Cold Spring Harbor Laboratory
cfos mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle.
- 12) Bravo, R., Neubergh, M., Burckhardt, J., Almendral, J., Wallich, R., Müller, R. (1987)
Cell, 48, 251-260
Involvement of common and cell type specific pathways in fos gene control: stable induction by cAMP in macrophages.
- 13) Rahmsdorf, H.J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütther, U., Herrlich, P. (1987)
Nucl. Acids Res. 15, 1643-1659
Posttranscriptional regulation of cfos mRNA
- 14) Serfling, E., Jasin, M., Schaffner, W. (1985)
TIG 1, 224-230
Enhancers and eucaryotic gene transcription.
- 15) Jones, N.C., Rigby, P.W.J., Ziff, E.B. (1988)
Genes and Development 2, 267-281
Trans-acting protein factors and the regulation of eucaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses.

- 16) Efstratiatis, A., Poskony, J., Maniatis, T., Lawn, R., O'Connel, C., Spritz, R., De Riel, J., Forget, B., Weissman, S., Slightom, J., Blechl, A., Smithies, O., Barelle, F., Shoulders, C., Proudfoot, N. (1980)
Cell 21, 653-668

The structure and evolution of the human β -globin gene family.
- 17) Benoist, C., Chambon, P. (1981)
Nature 290, 304-310

In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region
- 18) Treisman, R. (1985)
Cell 42, 889-902

Transient accumulation of cfos following serum stimulation requires a conserved 5' element and cfos 3' sequences.
- 19) Treisman, R. (1986)
Cell 46, 567-574

Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the cfos gene to serum factors.
- 20) Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987), (a)
Cell 49, 729-739

Phorbol ester inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.
- 20) Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. (1987), (b)
Mol. Cell. Biol. 7, 2256-2266

12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5' flanking region.
- 21) Sassone-Corsi, P., Verma, I.M. (1987)
Nature 326, 507-510

Modulation of cfos gene transcription by negative and positive cellular factors.

- 22) Lee, W., Mitchell, P., Tijan, R. (1987)
Cell 49, 741-752
Purified transcription factor AP1 interacts with TPA-inducible enhancer elements.
- 23) Treisman, R. (1987)
EMBO J. 6, 2711-2717
Identification and purification of a polypeptide that binds to the cfos serum response element.
- 24) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982)
Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
Molecular cloning. A laboratory manual.
- 25) Graham, F.L., Van der Eb, A.J. (1973)
Virology 52, 456-467
A new technique for the assay of infectivity of the human adenovirus 5 DNA.
- 26) Aufray, C., Rougeon, F. (1980)
Eur. J. Biochem. 107, 303-314
Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA.
- 27) Dignam, J.D., Lebowitz, R.M., Roeder, R.G. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 1475-1489
Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.
- 28) Gorman, C., Moffat, L., Howard, B. (1982)
Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051
Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.
- 29) Chen, E.Y., Seeburg, P. (1985)
DNA 4, 165-170
Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA.

- 30) Van Straaten, F., Müller, R., Curran, T., Van Beveren, C., Verma, I.M. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3183-3187
Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human cfos gene protein.
- 31) Vieira, J., Messing, J. (1982)
Gene 19, 259-268
The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
- 32) Southern, P.J., Berg, P. (1982)
J. Molec. Appl. Genetics 1, 327-341
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early promoter.
- 33) Dente, L., Cesareni, G., Cortese, R. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 1645-1655
pEMBL: a new family of single stranded plasmids.
- 34) Westin, G., Gerster, T., Müller, M.M., Schaffner, G., Schaffner, W. (1987)
Nucl. Acids Res. 15, 6787-6798
OVEC, a versatile system to study transcription in mammalian cells and cell-free extracts.
- 35) Yaniv, M., persönliche Mitteilung
- 36) Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H. (1988)
Cell, in press
Requirements for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol ester.
- 37) Franza, B.R., Sambucetti, L.C., Cohen, D.R., Curran, T. (1987)
Oncogene 1, 213
- 38) Imbra, R.J., Karin, K. (1986)
Nature 323, 555-558
Phorbol ester induce the transcription stimulatory activity of the SV40 enhancer.

- 39) Nishizuka, Y. (1984)
Nature 308, 693-698
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion.
- 40) Büscher, M., Rahmsdorf, H.J., Litfin, M., Karin, M., Herrlich, P.
Oncogene, in Druck
Activation of the cfos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element.
- 41) Prywes, R., Roeder, R.G. (1986)
Cell 47, 777-784
Inducible binding of a factor to the cfos enhancer.
- 42) Schröter, H., Shaw, P.E., Nordheim, A. (1987)
Nucl. Acids Res. 15, 10145-10158
Purification of intercalator-released p67, a polypeptide that interacts specifically with the cfos serum response element.
- 43) Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., Goodman, R.H. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6682-6686
Identification of a cyclic AMP responsive element within the rat somatostatin gene.
- 44) Fish, T.M., Prywes, R., Roeder, R.G. (1987)
Molec. Cell. Biol. 7, 3490-3502
cfos sequences necessary for basal expression and induction by epidermal growth factor, 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and the calcium ionophore.
- 45) Lau, L.F., Nathans, D. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1187-1186
Expression of a set of growth regulated immediate early genes in Balb c 3T3 cells: coordinate regulation with cfos or cmyc.
- 46) Setoyama, C., Frunzio, L., Lian, G., Murdy, J.M., De Crombrughe, B. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3213-3217
Transcriptional activation encoded by the vfos gene.

- 47) Bohman, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K., Tijan, R. (1987)
Science 238, 1386-1392
Human proto-oncogene cjun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of the transcription factor AP1.
- 48) Rauscher III, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J., Spiegelman, B.M. (1988)
Cell 52, 471-480
Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP1.