

KfK 5446 B  
Dezember 1994

# **Wachstumsfaktor-Rezeptoren als Vermittler UVC-induzierter Genexpression**

Ch. Sachsenmaier  
Institut für Genetik

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik

KfK 5446 B

# **Wachstumsfaktor-Rezeptoren als Vermittler UVC-induzierter Genexpression**

**Untersuchungen zu den Mechanismen der Signaltransduktion  
nach UVC-Bestrahlung von Zellen**

Christoph Sachsenmaier

Dissertation genehmigt von der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Innsbruck

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0303-4003

## Zusammenfassung

Bestrahlung von Säugetierzellen mit kurzweiliger ultravioletter Strahlung (UVC) hat komplexe Änderungen im Programm der Genexpression zur Folge. In der schnellen Phase der "UV-Antwort" werden die zellulären Protoonkogene *c-fos* und *c-jun*, unabhängig von Proteinneusynthese, verstärkt transkribiert. Man kann daher erwarten, daß Transkriptionsfaktoren, die die Expression dieser Gene regulieren, durch UVC-Bestrahlung in ihrer Aktivität verändert werden. *c-fos* und *c-jun* kodieren selbst für Transkriptionsfaktoren (*c-Fos*, *c-Jun*), die die Expression anderer Gene regulieren können. Daher werden in der zweiten Phase der UVC-induzierten Reaktionen Gene verstärkt transkribiert, deren effiziente Expression von der Neusynthese dieser Transkriptionsfaktoren abhängt (z. B. das Kollagenasegen). Die vorliegende Arbeit beginnt mit der Analyse der schnellen Expression von *c-fos* und *c-jun* mit dem Ziel, die Mechanismen der unmittelbaren, UV-induzierten Signaltransduktion zu erforschen.

Im ersten Teil der Arbeit wird gezeigt, daß die Transkriptionsfaktoren *c-Jun* und *Elk-1* innerhalb von Minuten nach UVC-Bestrahlung von Zellen verstärkt phosphoryliert und dadurch funktionell aktiviert werden. Beide Proteine sind bereits im unstimulierten Zustand in der Zelle vorhanden und die DNA-Erkennungssequenzen beider Faktoren sind notwendig für die UVC-induzierte Expression der Gene *c-jun* bzw. *c-fos*. Dies legt den Schluß nahe, daß Phosphorylierung von *c-Jun* und *Elk-1* zur schnellen Genexpression nach Bestrahlung von Zellen mit UVC beitragen. *c-Jun* ist also an der Regulation der Expression seines eigenen Gens beteiligt.

Im folgenden wurde versucht, Komponenten im Zytoplasma zu identifizieren, die zur UVC-abhängigen Genexpression beitragen. Es wird gezeigt, daß die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *c-Jun* und *Elk-1* durch UVC über eine Signaltransduktions-Kaskade vermittelt wird, die in ähnlicher Weise auch durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren in der Plasmamembran initiiert wird. Die UVC-induzierte Phosphorylierung des *c-Jun* Proteins ist identisch mit jener nach Behandlung von Zellen mit Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) oder epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) bzw. nach Überexpression einer aktivierten Form des GTP-bindenden Proteins Ras. Eine dominant-negativen Mutante des

Ras-Proteins hemmt die UVC-induzierte Genexpression. Aufgrund dieser Tatsachen und aufgrund der Aktivierbarkeit Ras-regulierter Proteinkinasen durch UVC wird gefolgert, daß das Ras-Protein eine notwendige Komponente UVC-induzierter Signaltransduktion ist.

Das Ras-Protein lokalisiert an der Innenseite der Plasmamembran und spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung wachstumsfaktor-induzierter Signaltransduktion. Der Aktivierung von Ras durch UVC sollte deshalb ein Schritt in oder an der Plasmamembran vorgeschaltet sein. Durch mehrere Methoden der Hemmung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wird gezeigt, daß UVC solche Rezeptoren aktiviert. Dieser Prozeß ist für die nachfolgende genetische Antwort notwendig. Wird rezeptor-abhängige Signaltransduktion durch Vorbehandlung mit Liganden gehemmt, reagieren die Zellen nicht mehr auf eine nachfolgende Stimulierung durch UVC. Ein Hemmstoff, der die Aktivierung von Rezeptoren durch ihre Liganden verhindert, Suramin, blockiert ebenfalls UVC-induzierte Signaltransduktion. Darüber hinaus reduziert die Expression einer dominant-negativen Mutante des EGF-Rezeptors eine nachfolgende UVC-induzierte Genexpression.

Um zu klären, ob die UVC-vermittelte Wirkung auf Rezeptoren über die Bindung von Liganden erfolgt, wurden Experimente mit neutralisierenden Antikörpern durchgeführt, die spezifisch die Bindung bekannter Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren verhindern. Diese Experimente zeigen, daß sezernierte Liganden offensichtlich bei der späten (Kollagenase), jedoch nicht bei der frühen (c-fos, c-jun) Genexpression eine Rolle spielen.

In der Folge durchgeführte Analysen des EGF-Rezeptors lassen die Hypothese zu, daß UVC-Strahlung diesen Rezeptor in einer liganden-unabhängigen Weise funktionell aktivieren kann. Der EGF-Rezeptor besitzt Tyrosinkinaseaktivität und wird innerhalb von Sekunden nach UVC-Bestrahlung an Tyrosinresten phosphoryliert - ein guter Hinweis auf Autophosphorylierung und daher auf die funktionelle Aktivierung des Rezeptors. Diese Phosphorylierung ist durch Suramin hemmbar, was die hemmende Wirkung von Suramin auf UVC-induzierte Genexpression erklärt. Darüber hinaus ist die Tyrosinphosphorylierung von anderen Proteinen im Zellextrakt nach Bestrahlung von Zellen mit UVC identisch mit der nach Behandlung mit EGF- oder dem "Platelet Derived Growth Factor" (PDGF), jedoch nicht nach Insulin-Behandlung. Dies unterstützt die

Hypothese, daß UVC und EGF (bzw. PDGF) identische Signaltransduktionsmechanismen in der Zelle hervorrufen, die zur Phosphorylierung der selben Proteine in der Zelle führen.

Diese Experimente legen eine direkte, liganden-unabhängige Aktivierung unterschiedlicher Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch UVC nahe. Auf Grund der Vielfalt der biologischen Auswirkungen verschiedener Wachstumsfaktoren, könnte so das breite Wirkungsspektrum von UV-Strahlung auf Säugerzellen erklärt werden.

## **Involvement of growth factor receptors in UVC-induced gene expression**

### **Summary**

Irradiation of mammalian cells with short-wavelength UV (UVC) elicits a complex transcriptional response. Among the first genes to be actively transcribed after irradiation are the proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun*. This expression is independent of ongoing proteinsynthesis, therefore it is reasonable to assume that preexisting transcription factors become activated by UVC-irradiation. The products of *c-fos* and *c-jun* (*c-Fos/c-Jun*) themselves act as regulatory transcription factors. As a consequence, genes which are activated by *Fos/Jun* are transcribed in a proteinsynthesis-dependent manner after UVC-irradiation (e.g. collagenase). This work concentrates on the analysis of rapid *c-fos/c-jun* expression in order to identify UVC-induced signal transduction mechanisms.

Two transcription factors which are involved in regulating *c-fos* and *c-jun* gene expression were examined. *Elk-1* which acts at the *c-fos* promoter and *c-Jun* which autoregulates its own gene. Low levels of *c-Jun* protein are present in the non-stimulated cell. Both transcription factors become rapidly phosphorylated in response to UVC-irradiation of cells and thereby gain increased transactivation potential. Since their DNA-recognition sequences within the promoters of *c-fos* and *c-jun* are necessary for UVC-induced expression of these genes, this suggests that these phosphorylation events are causally involved in the transcriptional response to UVC. This hypothesis is corroborated by using a dominant-negative mutant of *Elk-1* which inhibits UVC-induced transcription from the *c-fos* promoter.

In an attempt to identify the protein kinases which phosphorylate the transcription factors *Elk-1* and *c-Jun*, evidences for UVC-induced activation of the cytoplasmically located protein kinases of the MAP family are described. Additionally, the upstream regulators of MAP kinase activity, namely the *c-Raf* kinase and the GTP-binding protein *Ras* are shown to be obligatory components of UVC-induced signal transduction. Both proteins reside at the inner surface of the plasma membrane. These findings suggest that UVC-induced *c-fos* and *c-jun* expression is mediated by a signaling cascade which originates in or at the plasma membrane.

Since the Ras protein is a key molecule in relaying signals from activated growth factor receptors into cytoplasmic signal transduction, I investigated the possible involvement of receptors in UVC-dependent gene expression. The activity of receptor molecules was inhibited by several means and the influence on subsequent UVC-induced gene expression was monitored. Downregulation of receptors by pretreatment with their respective ligands as well as the general receptor blocker suramin severely inhibit c-fos and c-jun gene expression in response to UVC. Also a dominant-negative mutant of the epidermal growth factor receptor interferes with UVC-induced gene expression. The immediate activation of receptor-dependent signal transduction by UVC seems, however, not to involve binding of soluble ligands to the receptors at the outer cell surface. Under conditions where ligand-induced processes are inhibited, no effects on UVC-induced c-fos or c-jun expression are observed.

Subsequent studies show that the epidermal growth factor receptor becomes tyrosine-phosphorylated almost immediately after UVC-irradiation. The receptor has protein tyrosine kinase activity and autophosphorylates when bound by its ligand. This is a strong hint for functional activation of the receptor after irradiation with UVC. This immediate effect of UVC on the epidermal growth factor receptor is inhibited by suramin, supporting the view that suramin interferes with UVC-induced signal transduction by inhibiting receptor molecules at the cell surface.

Similar to the epidermal growth factor receptor also the receptor for platelet derived growth factor (also a tyrosin kinase) becomes tyrosine phosphorylated after UVC-irradiation. Moreover, identical proteins in a cell extract are tyrosine phosphorylated upon treatment of cells with epidermal growth factor, platelet growth factor or UVC. This further indicates that signal transduction elicited by UVC is identical to that induced by (different) receptor tyrosine kinases.

Theses experiments suggest that UVC activates several growth factor receptor molecules in a ligand-independent manner. Due to the diversity of cellular reactions in response to activation of different receptors this finding contributes to our understanding of the biological effects of ultraviolet radiation.

## Abkürzungen

A	Adenin
AA-Bis	Acrylamid-Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
ASV	"Avian Sarcoma Virus"
ATF	"Activating Transcription Factor"
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BES	N,N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethan-Sulfonsäure
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Rinder Serumalbumin
Bq	Becquerel (Zerfälle pro Sekunde)
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
cDNA	"copy"-Desoxyribonukleinsäure
c-fos	zelluläres Fos-Gen
c-Fos	zelluläres Fos-Protein
c-jun	zelluläres Jun-Gen
c-Jun	zelluläres Jun-Protein
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zerfälle pro Minute
c-Src	zelluläre Src-Tyrosinkinase
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dT	Desoxy-Thymidin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	"Enhanced Chemoluminescence"
ED <sub>50</sub>	Dosis für halbmaximale Aktivität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor

EGTA	Ethylenglykol-Bis (2-Aminoethylether)-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
ELISA	"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"
ERK	"Extracellular Signal Regulated Protein Kinase"
Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Gapdh	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBq	Gigabecquerel
GHF-1	"Growth Hormone Factor-1"
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 $\alpha$
Leu	Leuzin
LTR	"Long Terminal Repeat"
m	Meter
M	molar
m A	Milliampere
MAP	"Mitogen Activated Protein -"
MBq	Megabecquerel
MEM	"Minimal Essential Medium"
MES	2-Morpholino-Ethansulfonsäure
min	Minute(n)
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
m m	Millimeter
mM	millimolar
Mr	Molekulargewicht
m-RNA	Boten-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
NZ	Nitrozellulose
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x (in nm)
Ø	Durchmesser
p	para
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	"Platelet Derived Growth Factor"
PDGFR	Rezeptor für den "Platelet Derived Growth Factor"
PIS	Präimmunserum
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Ca <sup>2+</sup> -und Phospholipid-abhängige Proteinkinase

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	2, 5-Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVDF	Polyvinylidifluoriden
RIPA	"Radioimmunoprecipitation Assay"
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarcom Virus
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodezylsulfat
Ser	Serin
sec	Sekunde(n)
SH	"Src Homolgy"
spez.	spezifisch
SRE	"Serum Response Element"
SRF	"Serum Response Factor"
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBq	Terabecquerel
TCF	"Ternary Complex Factor"
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tk	Thymidinkinase
tk <sup>-</sup>	Tymidinkinase-defizient
TM	Trockenmilch
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat
TRE	"TPA Responsive Element"
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ts	temperatur-sensitiv
Tyr	Tyrosin
U	"Unit(s)"
UV	ultraviolett
UVC	kurzwellige ultraviolette Strahlung (≤ 280 nm)
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v-fos	virales Fos-Gen
v-Fos	virales Fos-Protein
v-jun	virales Jun-Gen
v-Jun	virales Jun-Protein
v- <i>Src</i>	virale <i>Src</i> -Tyrosinkinase
Vol	Volumen
wt	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
z. B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung

## Summary

## Abkürzungen

<b>Einleitung</b> .....	1
Wirkung von UV-Strahlung auf höhere Zellen.....	1
UV-induzierte Genexpression.....	2
c-fos.....	3
c-jun.....	5
Kollagenase Typ I.....	6
Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	7
Welche Funktionen haben UV-induzierbare Genprodukte in Säugierzellen?.....	7
Transkriptionsfaktoren als Vermittler induzierter Genexpression.....	8
Signaltransduktionsmechanismen von der Zellmembran zu Transkriptionsfaktoren.....	10
Was war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit über UV- induzierte Signaltransduktion bekannt?.....	14
<b>Zielsetzung</b> .....	17
<b>Material</b> .....	21
Chemikalien.....	21
Laborartikel.....	23
Radiochemikalien.....	24
Wachstumsfaktoren.....	25
Antikörper.....	25
Puffer + Lösungen.....	26
Enzyme.....	26
Medien.....	27

Plasmide.....	27
Expressionsplasmide .....	27
Reporterplasmide.....	28
c-DNA Fragmente zur Hybridisierung von m-RNA.....	29
Zelllinien.....	29
Bakterien.....	30
<b>Methoden.....</b>	<b>31</b>
Zellkultur .....	31
Passagieren von Zellen.....	31
Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
Sterilisation.....	32
Markierung von Proteinen mit <sup>35</sup> S bzw. <sup>32</sup> P in Kultur.....	32
Sicherheitsvorkehrungen bei Markierung von Zellen mit radioaktiven Isotopen.....	33
Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors.....	33
Herstellung von Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .....	34
Immunpräzipitation des c-Jun Proteins.....	34
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
Sichtbarmachung von <sup>35</sup> S- bzw. <sup>14</sup> C-markierten Proteinen im Polyacrylamidgel durch Fluorographie .....	35
Identifizierung von immobilisierten Proteinen durch Antikörper (Western Blot Analyse) .....	36
2-dimensionale tryptische Peptidkartierung .....	37
Autoradiographie .....	39
Densitometrische Auswertung von Signalen am Röntgenfilm.....	40
Transiente Transfektion von Zellen.....	40
DEAE-Dextran Methode .....	40
Kalziumphosphat Methode .....	41
Modifizierte Kalziumphosphat Methode.....	41
Behandlung von Zellen zur Stimulierung der Genexpression.....	42
Bestimmung der m-RNA Menge zellulärer Gene (Northern Blot Analyse) .....	43
Isolierung von m-RNA.....	43
Auftrennung von m-RNA im Agarosegel.....	44
Deionisieren von Glyoxal.....	44

Transfer von m-RNA auf eine Membran .....	44
Hybridisierung immobilisierter m-RNA mit <sup>32</sup> P-markierten c-DNA Proben .....	45
Markierung von cDNA-Fragmenten mit <sup>32</sup> P- $\alpha$ -dCTP .....	45
Ausschlußchromatographie über "gesponnene Säulen" .....	46
Analyse der Expression des Chloramphenicolazetyltransferase- (CAT) Gens .....	47
Gewinnung von Plasmid-DNA aus E. coli .....	48
Transformation von E. coli .....	48
Plasmidpräparation .....	49
Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	50
Agarosegelelektrophorese von DNA .....	50
Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	51
Präparation von Zellkernextrakten .....	51
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
Wie werden die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1 aktiviert? .....	53
UVC-Bestrahlung induziert die schnelle Phosphorylierung von c-Jun .....	54
Mutationen von Ser 63 und Ser 73 verhindern die UVC- induzierten Phosphorylierungen von c-Jun .....	58
Lokalisation der UVC-spezifischen Phosphorylierungen .....	59
Funktionelle Aktivierung des c-Jun-Proteins durch UVC .....	62
UVC-induzierte Modifikation von Elk-1 .....	65
Elk-1 ist notwendig für die UVC-induzierte Transkription vom SRE .....	67
Welche Proteinkinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1? .....	70
Welche Komponenten der Zelle initiieren Raf/ERK-abhängige Signaltransduktion nach UVC-Bestrahlung? .....	71
UVC induziert, im Gegensatz zu Phorbol ester, Ras-abhängige Signaltransduktion in HeLa Zellen .....	71
Wie aktiviert UVC das Ras-Protein? .....	74
Vorbehandlung von Zellen mit IL-1 $\alpha$ , EGF und bFGF hemmt eine nachfolgende UVC-Antwort .....	75

IL-1 $\alpha$ - und UVC-induzierte Phosphorylierung von c-Jun ist identisch.....	79
Spielt die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren eine Rolle bei UVC-induzierter Signaltransduktion?.....	82
IL-1 $\alpha$ und bFGF sind funktionelle Komponenten der UVC-induzierten Kollagenase-Genexpression in HeLa Zellen.....	82
IL-1 $\alpha$ , bFGF und EGF sind keine funktionellen Komponenten der schnellen UVC-induzierten Genexpression.....	86
Suramin hemmt schnelle UVC-induzierte Prozesse.....	88
Werden Wachstumsfaktorrezeptoren durch UVC funktionell aktiviert?.....	92
Der EGF-Rezeptor ist eine funktionelle Komponente UVC-abhängiger Signaltransduktion.....	92
UVC-Bestrahlung führt zur Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors.....	95
Tyrosinphosphorylierungen im Zellextrakt UVC-bestrahlter HeLa Zellen.....	99
Werden auch andere Wachstumsfaktorrezeptoren durch UVC aktiviert?.....	101
<b>Diskussion</b> .....	105
<b>Literatur</b> .....	117

## Einleitung

### *Wirkung von UV-Strahlung auf höhere Zellen*

Jeder Mensch ist ultravioletter (UV) Strahlung ausgesetzt. Der UV-Anteil des Sonnenlichts, der die Erdoberfläche erreicht, umfaßt Wellenlängenbereiche von 280 - 320 nm (UVB) und 320 - 400 nm (UVA). Kürzere Wellenlängen (< 280 nm; UVC) und kurzwellige Anteile des UVB, werden durch stratosphärisches Ozon absorbiert (Longstreth, 1988). Eine Abnahme an Ozon in der Stratosphäre würde daher v. a. eine erhöhte Exposition an UVB-Strahlung zur Folge haben.

Die biologischen Wirkungen des Sonnenlichts sind mannigfach: Sonnenbrand (Erythem), Pigmentierung, Alterung und Verdickung der Haut, Hautkrebs und Einflüsse auf das Immunsystem sind bekannt (Ananthaswamy und Pierceall, 1990; Kripke, 1990). Für alle diese Reaktionen ist der UVB-Anteil des Sonnenlichts am effektivsten und seine Wirkung wird vor allem der Fähigkeit, DNA zu schädigen, zugeschrieben. DNA in Lösung absorbiert UV-Strahlung maximal bei 260 nm, UV-spezifische Schäden der DNA (v. a. Pyrimidindimere) werden in vivo jedoch durch Wellenlängen weit über 300 nm induziert (Freeman et al., 1989; Quaite et al., 1992). Am gesichersten scheint der Zusammenhang zwischen der DNA-schädigenden Wirkung kurzwelliger UV-Strahlung und der Entstehung von Hautkrebs (vom Nicht-Melanomtyp): Schon vor genau 100 Jahren (1894) wurde ein Zusammenhang zwischen Sonnenlicht und der Entstehung von Hautkrebs postuliert. Die entscheidende Rolle des kurzwelligen UVB in diesem Prozeß wurde zu Beginn unseres Jahrhunderts entdeckt (s. Hall, 1993). Ein Defekt in der Fähigkeit, UV-induzierte Schäden der DNA zu reparieren (z. B. bei der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum) führt zu einer starken Prädisposition für Hautkrebs (Cleaver und Bootsma, 1975). Schließlich wurden in mehreren Hautkrebsproben Mutationen in Onkogenen und Tumor-Suppressorgenen gefunden, die auf UV-spezifische Veränderungen der DNA zurückzuführen sind (z. B. CC -> TT Austausch) (Ananthaswamy und Pierceall, 1990; Brash et al., 1991). Bereits in gesunder, UV-bestrahlter Haut kann dieser Typ von Mutation im Tumorsuppressorgen p53 vermehrt gefunden werden (Nakazawa et al; 1994). Im Vergleich zu Nicht-Melanom-

Hauttumoren (Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom) scheint die Korrelation zwischen erhöhter Sonnenexposition und der Entstehung von Melanomen nicht eindeutig, aber sehr wahrscheinlich zu sein (Hall, 1993). Auch rückt zunehmend die schädigende Wirkung des langwelligen UVA in das allgemeine Interesse, dessen Wirkung zumindest nicht ausschließlich durch DNA-Schädigung erklärt werden kann (Keyse, 1993 und Referenzen darin).

Nicht alle biologischen Wirkungen des UV-Lichts lassen sich durch die direkte Schädigung des Erbgutes erklären - aktive Expression von Genen spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Reaktion einer Zelle auf UV (und andere schädigende Agenzien; s. auch Holbrook und Fornace, 1991; Herrlich et al., 1992). Die Schädigung der DNA durch UV kann jedoch auch zu veränderter Genexpression führen, entweder indem der Schaden selbst ein induzierendes Signal darstellt, oder indem sich eine stabile Mutation in veränderter Genexpression manifestiert. Auf die Bedeutung UV-induzierbarer Genprodukte wird im folgenden eingegangen. Die enge funktionelle Koppelung zwischen der Reparatur strahlen-geschädigter DNA und der Transkription von Genen wird durch den Befund verdeutlicht, daß Komponenten des Exzisionsreparatursystems Bestandteile der basalen Transkriptionsmaschinerie in Eukaryonten sind (Drapkin et al., 1994).

### *UV-induzierte Genexpression*

Mehr als 100 UV-induzierbare Genprodukte wurden bisher in höheren Zellen identifiziert (Holbrook und Fornace, 1991; Herrlich et al., 1992; Keyse, 1993). Die genetische Reaktion auf UV-Strahlung wird unter dem Begriff "UV-Antwort" zusammengefaßt (Karin und Herrlich, 1989). Die UV-Antwort überlappt nur wenig mit der Hitzeschock-Antwort (Herrlich et al., 1992). Hingegen ähnelt sie stark den Reaktionen einer Zelle auf andere DNA-schädigende Agenzien (z. B. methylierende Substanzen, ionisierende Strahlung, reaktive Sauerstoffradikale), auf Behandlung mit Phorbol-ester-Tumorpromotoren und auf Behandlung mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Im Gegensatz zu Prokaryonten, werden jedoch die wenigsten der bekannten Genprodukte, die an der Reparatur geschädigter DNA beteiligt sind, nach UV-Strahlung verstärkt exprimiert. Ausnahmen davon sind die O<sup>6</sup>-Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase, DNA-Polymerase,

DNA-Ligase, Metallothionein und Ribonukleotidreduktase (Elledge und Davis, 1989; Kaina et al., 1990; Herrlich et al., 1992). Trotzdem kann erhöhte Resistenz von Zellen gegenüber UV-Schädigung nach einer Vorbehandlung mit niedrigen Dosen an UV beobachtet werden. Experimente zeigen auch die verbesserte Reaktivierung UV-geschädigter Viren in Zellen, die mit niedrigen UV-Dosen vorbehandelt wurden, im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Dieser Vorgang ist proteinsynthese-abhängig und offenbar unabhängig von funktionierender Exzisionsreparatur, da vergleichbare Effekte auch in reparatur-defizienten Xeroderma pigmentosum Zellen zu beobachten sind (s. Übersichtsartikel Keyse, 1993). Es scheint also, daß auch die induzierbaren Genprodukte, die nicht unmittelbar mit der Reparatur strahlen-geschädigter DNA in Zusammenhang gebracht werden können, zum Schutz der Zelle vor UV-Strahlung beitragen (s. auch unten).

Im folgenden soll ein Überblick über Funktion und Regulation jener UV-induzierbaren Gene gegeben werden, die in dieser Arbeit hauptsächlich untersucht werden.

### *c-fos*

Das *c-fos* Gen ist das zelluläre Protoonkogen der viralen *v-fos* Onkogene aus den murinen Finkel-Biskis-Jinkins- und Finkel-Biskis-Reilly-Maus Osteosarcom Viren (van Beveren et al., 1983; Jenuwein und Müller, 1986). Es kodiert für einen nukleären Transkriptionsfaktor (*c-Fos*), der, zusammen mit Vertretern der *Jun*-Familie (s. unten), verschiedene Formen des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein-1) bildet (Chiu et al., 1988). Transkriptionsfaktoren regulieren über die Bindung an spezifische DNA-Erkennungssequenzen ("Enhancer") die Transkription von Genen, indem sie direkt oder indirekt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren (Mitchell und Tjian, 1989). *c-Fos* wirkt nur im Heterodimer mit *Jun*-Proteinen. Heterodimerbildung erfolgt über "Coil-Coil" Wechselwirkungen der sogenannten "Leucin-Zipper" Domänen beider Proteine. Beiden Proteinfamilien (*Fos/Jun*) ist zusätzlich eine stark basisch geladene DNA-Bindedomäne gemeinsam, mit deren Hilfe sie an AP-1 Erkennungssequenzen (TRE, "TPA-Responsive Element; Angel et al., 1987b) im Promoterbereich von Genen binden.

Das *c-fos* Gen stellt den Prototyp der "Immediate Early Genes (IEG)" dar (Herschman, 1991). Diese zeichnen sich durch schnelle, proteinsynthese-

unabhängige Expression nach Stimulierung ruhender Zellen mit Mitogenen aus. In der Folge wurde die zentrale Schlüsselfunktion des c-fos Genprodukts bei der Umsetzung verschiedenster Stimuli in lang anhaltende genetische Reaktionen identifiziert (Nishikura und Murray, 1987; Schönthal et al., 1988; Herrlich und Ponta, 1989). Wachstumsfaktoren, zyttoplasmatische Onkoproteine, Phorbolster-Tumorpromotoren, UV und andere Formen von "Streß" verursachen innerhalb von 45 min die maximale Anhäufung c-fos-spezifischer m-RNA, die innerhalb von 90 min wieder auf Kontrollwerte absinkt (Greenberg und Ziff, 1984; Kruijer et al., 1984; Prywes und Roeder, 1986; Büscher et al., 1988; Schönthal et al., 1988; Hollander und Fornace, 1989). Proteinsynthesehemmer (Cycloheximid, Anisomycin) hemmen diese Genexpression nicht, sondern führen zur Superinduktion des c-fos Gens (Greenberg et al., 1986), ein Vorgang, der hauptsächlich auf der Verlängerung der Halbwertszeit der c-fos m-RNA beruht. Auch die Induktion der Expression des c-fos Gens durch Proteinsynthesehemmer per se wurde beschrieben (Edwards und Mahadevan, 1992). Dieser Effekt kann auch bei niedrigen Konzentrationen der Inhibitoren, die nicht zur Hemmung von Proteinsynthese ausreichen, beobachtet werden und beruht auf einem bislang unbekanntem Signaltransduktionsmechanismus (Auer, 1994).

Die zeitlich sehr definierte Expression des c-fos Gens setzt genaue Regulationsmechanismen voraus. Diese erfolgen auf der Ebene der Aktivierung und Repression der Transkription und m-RNA Stabilität (s. Übersichtsartikel Herrlich et al., 1989). Mehrere "Enhancer"-Elemente regulieren die transkriptionelle Stimulierung des c-fos Gens (Treisman, 1994). Eine zentrale Rolle spielt das "Serum Response Element (SRE)"; Mutation des SRE führt zu weitgehendem Verlust der c-fos Genexpression nach Serum-, Phorbolster- und UV-Behandlung von Zellen (Greenberg et al., 1987; Büscher et al., 1988; Graham und Gilman, 1991). Das SRE ist auch notwendig für die Autorepression der c-fos Genexpression durch das c-Fos Protein selbst, ein Mechanismus, der allerdings noch nicht genau geklärt ist (Sassone-Corsi et al., 1988; König et al., 1989; Schönthal et al., 1989). Ein Homodimer des Transkriptionsfaktors "Serum Response Factor (p67<sup>SRF</sup>, SRF)" bindet zusammen mit einem Monomer eines "Ternary Complex Factor (TCF)" an das SRE des c-fos Gens (Shaw et al., 1989; Hipskind et al., 1991). Beide Faktoren besetzen das SRE auch im "ruhenden" Zustand der

Zelle und werden nach Behandlung der Zelle posttranslational aktiviert (Herrera et al., 1989; König, 1991). Andere Elemente 5' und 3' des SRE's kooperieren mit dem SRE in der Regulation der c-fos Genexpression (Gilman et al., 1986; Bravo et al., 1987; Piette und Yaniv, 1987; Wagner et al., 1990).

### *c-jun*

Das c-jun Gen stellt das zelluläre Protoonkogen des viralen v-jun Onkogens aus dem "Avian Sarcoma Virus (ASV) 17" dar (Vogt und Bos, 1990). Es kodiert für einen nukleären Transkriptionsfaktor, der entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit Vertretern der Fos-, ATF- bzw. der Jun-Familie den Transkriptionsfaktor AP-1 bildet (Curran und Franza, 1988; van Dam et al., 1993).

Zahlreiche Stimuli induzieren die schnelle, proteinsynthese-unabhängige Expression von c-jun. Die Kinetik der Genexpression ähnelt derjenigen von c-fos, ist jedoch nicht identisch. So induziert UV-Bestrahlung in HeLa Zellen die Expression des c-jun Gens stärker als die des c-fos Gens; für Behandlung mit Phorbolster-Tumorpromotoren verhält es sich umgekehrt (Devary et al., 1991; Stein et al., 1992). Darüber hinaus führt Behandlung von murinen F9 Teratokarzinomzellen mit UV zur Expression beider Gene, c-fos und c-jun, Phorbolster aber nur zur Expression des c-fos Gens (Auer et al., 1994). Dies deutet darauf hin, daß unterschiedliche Signaltransduktionswege an der Regulation beider Gene beteiligt sein könnten.

Auch im Promoterbereich des c-jun Gens wirken mehrere "Enhancer"-Elemente kooperativ bei der Regulation der Expression. Zwei AP-1 Bindestellen (Jun1 TRE, Jun2 TRE, Herr et al., 1994) sind notwendig und ausreichend für die Induzierbarkeit durch UV und Phorbolster-Tumorpromotoren (Stein et al., 1992; Herr et al., 1994). Diese unterscheiden sich jedoch durch ein zusätzliches Nukleotid von der "klassischen" AP-1 Bindestelle aus dem Kollagenasepromoter und binden daher qualitativ unterschiedliche AP-1 Faktoren (Stein et al., 1992; van Dam et al., 1993; Herr et al., 1994). Diese bestehen v. a. aus Heterodimeren von Jun- und ATF-2-Proteinen. Es gilt also festzuhalten, daß das c-Jun Protein, als eine Komponente des Jun/ATF-2 Heterodimers, an der Regulation der Expression seines eigenen Gens beteil-

igt ist (Angel et al., 1988b), seine Aktivität je nach Partner im dimeren AP-1 Komplex jedoch variieren kann.

### *Kollagenase Typ I*

Das Kollagenase Typ I Enzym (im folgenden als Kollagenase bezeichnet) gehört zur Familie von sezernierten Matrix-Metalloproteasen, die für Um- und Abbau von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind (s. Übersichtsartikel Matrisian, 1990). Die Kontrolle der Aktivität der Kollagenase erfolgt auf mehreren Ebenen: Transkription, Prozessierung und Interaktion mit Inhibitoren. Die Kollagenase wurde früh als TPA- (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat-) induzierbares Protein identifiziert (Aggeler et al., 1984; Angel et al., 1987a) und die Charakterisierung des verantwortlichen Promoterelements (TRE) legte einen Grundstein für das heutige Verständnis der transkriptionellen Regulation induzierbarer Genexpression (Angel et al., 1987b; Angel und Karin, 1991). Das Kollagenase-TRE stellt den Prototyp einer AP-1 Bindestelle dar, die von c-Fos/c-Jun (AP-1) Heterodimeren *in vivo* erkannt wird. Potentiell können natürlich auch andere AP-1 Isoformen daran binden. Das Kollagenase-TRE ist notwendig und ausreichend für die Induzierbarkeit der Kollagenase durch TPA, Zytokine und UV (Angel et al., 1987a, b; Brenner et al., 1989; Stein et al., 1989). Jedoch scheint im Kontext des gesamten Promoters die Regulation von mehreren Elementen abzuhängen (Auble und Brinckerhoff, 1991; Auer, 1994). Interessanterweise bestehen deutliche Unterschiede in der Kinetik der Expression der Kollagenase nach verschiedenen Stimuli. TPA und Zytokine induzieren die schnelle Bindung von AP-1 *in vitro* und die Transkription des Kollagenasegens innerhalb von 0.5 h, die durch Protein-synthesehemmer nicht blockiert wird (Angel et al., 1987a; Brenner et al., 1989; Stein et al., 1989). Jedoch erscheint Proteinneusynthese notwendig für die effiziente anhaltende Expression des Gens zu sein (Angel et al., 1987a; Auer, 1994). Im Gegensatz dazu kann die Akkumulation Kollagenase-spezifischer m-RNA nach UV-Bestrahlung frühestens nach 24 h nachgewiesen werden (Angel et al., 1987a; Stein et al., 1989; Rahmsdorf et al., 1992). Offensichtlich sind sowohl die posttranslationelle Modifikation von AP-1 und die Neusynthese von Fos/Jun notwendig für die Expression des Kollagenasegens nach verschiedenen Stimulierungen. Erhöhte m-RNA

Mengen von c-fos und c-jun alleine erscheinen nicht ausreichend für diesen Prozeß (Conca et al., 1991).

### *Zytokine und Wachstumsfaktoren*

Schon lange weiß man um die UV-induzierte Freisetzung von Interleukin-1 (IL-1) aus epidermalen Zellen (Gahring et al., 1984; Ansel et al., 1988; Krämer et al., 1993). Zahlreiche andere Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden daraufhin identifiziert, die in vitro und in vivo nach UV-Bestrahlung von Zellen sezerniert werden: IL-6 (Urbanski et al., 1990), IL-10 (Rivas und Ullrich, 1992), Tumor Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Köck et al., 1990), "Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )" (Ellem et al., 1988), basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) (Krämer et al., 1993). Der Mechanismus, durch den diese Faktoren nach UV-Bestrahlung sezerniert werden, ist im einzelnen nicht bekannt. Für manche dieser Faktoren (z. B. IL-1 $\alpha$ , bFGF) ist der Sekretionsmechanismus überhaupt nicht geklärt. Für IL-1 $\alpha$  und bFGF wurden erhöhte Mengen an spezifischer m-RNA nach UVC-Bestrahlung gemessen (Krämer et al., 1993), ein Hinweis auf transkriptionelle Aktivierung der entsprechenden Gene. Allerdings sind auch Mechanismen der Freisetzung "gespeicherter" Wachstumsfaktoren möglich. Tatsächlich führt UV-Bestrahlung zur schnellen Aktivierung eines Enzyms, das das membranständige TGF $\alpha$  Vorläufermolekül proteolytisch aktivieren kann (Brown et al., 1993).

### *Welche Funktionen haben UV-induzierbare Genprodukte in Säugerzellen?*

UV-induzierte, sezernierte Zytokine dürften eine entscheidende Rolle bei den entzündlichen und immunologischen Wirkungen von UV-Strahlung spielen. IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  induzieren Fieber und Entzündungssymptome, wie sie bei der Erythemreaktion auf UV-Bestrahlung beobachtet werden (Dinarello et al., 1986; Köck et al., 1990). Die immunsuppressive Wirkung von UV-Strahlung wird unter anderem der Wirkung von IL-10, das nach UV-Bestrahlung von Keratinozyten sezerniert wird, zugeschrieben (Ullrich, 1994).

Eine Beteiligung der Kollagenase an Entzündungsprozessen in der Haut nach UV-Bestrahlung erscheint plausibel, ist aber nicht bewiesen. Behandlung von Zellen mit IL-1 und TNF $\alpha$  in Kultur, führt zur gesteigerten

Expression des Kollagenasegens (Brenner et al., 1989; Conca et al., 1991). Die Rolle der Kollagenase bei Migrationen transformierter Zellen ist gut dokumentiert (Matrisian, 1990) und dürfte auch bei Metastasierung von UV-induzierten Hauttumoren (Melanomen) eine Rolle spielen.

Auf Grund ihrer Schlüsselfunktion in zahlreichen Reaktionen der Zelle, ist die Rolle der Gene c-fos und c-jun in UV-induzierten Reaktionen schwer zu bestimmen. Zum einen tragen erhöhte Mengen an c-Fos und c-Jun zur Aktivierung AP-1-abhängiger Gene (wie z. B. der Kollagenase) bei (Chiu et al., 1988; Schönthal et al., 1988; 1989; Gack et al., 1994). Als wichtige Regulatoren des kontrollierten Zellwachstums, könnten sie jedoch auch eine Rolle bei der Transformation von Hautzellen durch UV eine Rolle spielen. So wurde z. B. gezeigt, daß in "sonnengealterter" Haut ("Seemannshaut"), konstitutiv erhöhte Mengen an c-fos-spezifischer m-RNA zu finden sind (Gilchrest, 1994). Zusammen mit der instabilisierenden Wirkung auf Chromosomen (van den Berg et al., 1991) könnten erhöhte Mengen an c-Fos Protein zur beobachteten Prädisposition sonnengealterter Haut für Krebs beitragen.

Trotz des Befundes, daß die meisten der bekannten DNA-Reparaturgene in höheren Zellen durch UV-Bestrahlung nicht induzierbar sind (s. oben), wird der UV-Antwort in Säugerzellen eine protektive Wirkung zugesprochen. Nicht nur die starke Konservierung einer vergleichbaren genetischen Antwort von der Hefe bis zum Mensch spricht dafür (Engelberg et al., 1994). Auch die Hemmung UVC-induzierter Genexpression durch Inhibitoren der UV-induzierten Signaltransduktion, erhöht die Sensitivität von Zellen gegenüber UVC-Bestrahlung (Devary et al., 1992). Schließlich konnte kürzlich gezeigt werden, daß Fibroblasten von Mäusen, denen durch homologe Rekombination das c-fos- bzw. das c-jun-Gen deletiert wurde, sensitiver auf UVC-Bestrahlung reagieren, als entsprechende Zellen aus Wildtyp-Mäusen (E. Wagner, Manuskript in Vorbereitung).

### *Transkriptionsfaktoren als Vermittler induzierter Genexpression*

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die basale Transkriptionsrate eines Promoters stark erhöhen (oder reprimieren) können. Sie sind in den meisten Fällen aus definierten funktionellen Domänen aufgebaut: Eine DNA-Bindedomäne vermittelt die sequenzspezifische Bindung an die DNA im Promoterbereich eines Gens. Trans-

aktivierungsdomänen aktivieren über verschiedenste Mechanismen die basale Transkriptionsmaschinerie. Die Regulation von Transkriptionsfaktoren kann auf der Ebene der Synthese und Degradation, aber auch durch posttranslationelle Modifikationen erfolgen. Diese beeinflussen entweder die DNA-Bindekapazität und/oder die Transaktivierungseigenschaften des Proteins. Wie oben erwähnt wurde, wird die "schnelle" Expression von Genen nach Stimulierung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, Phorbol-ester-Tumorpromotoren oder UV über die Aktivierung präexistierender Transkriptionsfaktoren vermittelt. In den letzten Jahren wurde intensiv an der Aufklärung dieser Mechanismen geforscht. Phosphorylierung durch Proteinkinasen spielt dabei eine entscheidende Rolle (Hunter und Karin, 1992).

Beide Faktoren am c-fos SRE, SRF und TCF (s. oben), werden nach Stimulierung von Zellen phosphoryliert: Mehrere Serinreste im N-terminalen Bereich von SRF wurden identifiziert, deren Phosphorylierung die DNA-Bindekapazität von SRF, zumindest in vitro, regulieren (Janknecht et al., 1992). Ser 103 wird in vitro durch die Ribosom-S6-Proteinkinase, eine wachstumsfaktor-induzierbare Kinase, phosphoryliert. Die Kinetik der Phosphorylierung an Ser 103 korreliert mit der c-fos Transkription nach Stimulierung von Zellen mit Wachstumsfaktoren (Rivera et al., 1993).

Mehrere Proteine mit "TCF-Aktivität" wurden identifiziert (Treisman, 1994). Elk-1 wurde ursprünglich auf Grund von Homologien zum ets-Onkogen aus dem E26 "Acute Leucemia Virus" kloniert und erst später seine TCF-Aktivität erkannt (Rao et al., 1989; Hipskind et al., 1991). Es gehört in eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer konservierten "Ets"-DNA-Bindedomäne und stellt den mengenmäßig größten Anteil an TCFs in verschiedenen Zellen dar (Zinck et al., 1993; Pingout et al., 1994). Mehrere Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich von Elk-1 wurden identifiziert und funktionell charakterisiert (Gille et al., 1992; Janknecht et al., 1993; Marais et al., 1993, Kortjenann et al., 1994). Der Phosphorylierungszustand von Elk-1 korreliert vollständig mit der transkriptionellen Aktivierung des c-fos Promotors durch Wachstumsfaktoren oder Phorbol-ester-Tumorpromotoren (Zinck et al., 1993).

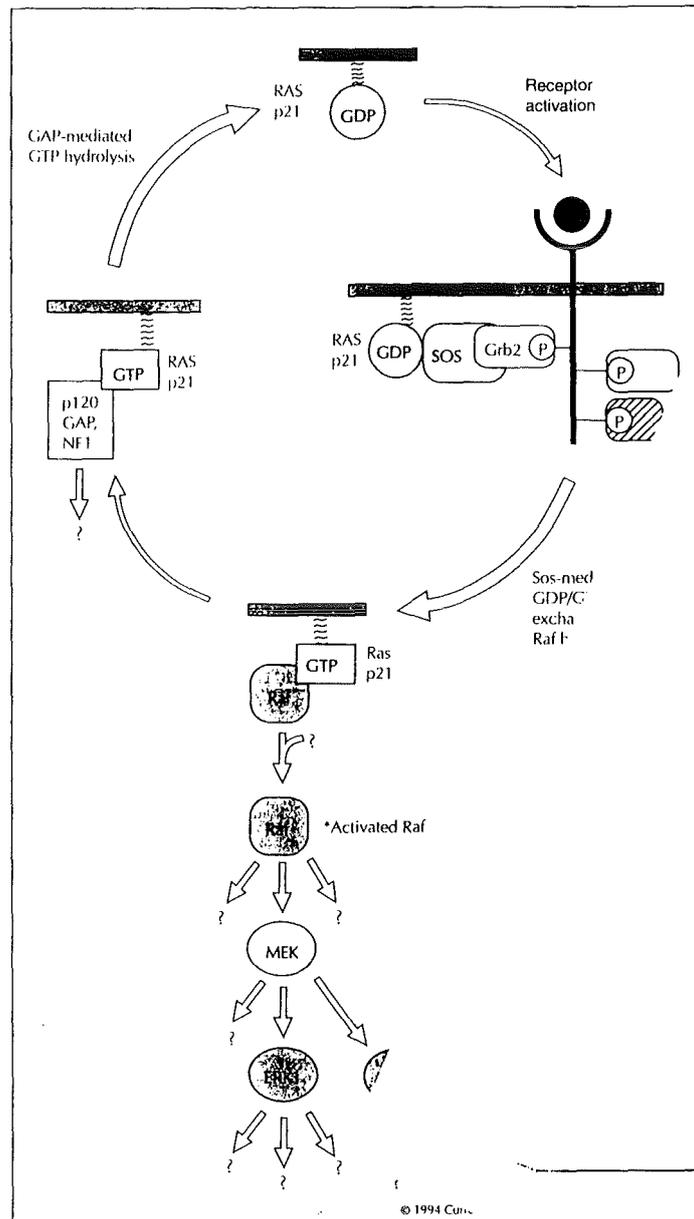
Wie bereits erwähnt, ist das c-Jun Protein selbst an der Regulation seines Gens (und anderer AP-1-abhängiger Gene) beteiligt (Angel et al., 1988b; Stein et al., 1992). Es wird ebenfalls durch Veränderungen im Phosphorylierungs-

zustand in seiner transkriptionellen Aktivität reguliert. Unstimulierte Zellen weisen geringe, aber nachweisbare Mengen an phosphoryliertem c-Jun Protein auf. Die phosphorylierten Aminosäuren (Ser und Thr) lokalisieren hauptsächlich im Bereich der DNA-Bindedomäne und führen dadurch vermutlich zur elektrostatischen Abstoßung des Proteins von der (negativ geladenen) DNA (Boyle et al., 1991a; Lin et al., 1992; s. auch Übersichtsartikel Sachsenmaier und Radler-Pohl, 1994). Die Stimulierung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, Phorbolster-Tumorpromotoren oder aktivierten Onkoproteinen hat zwei gegenläufige Veränderungen am c-Jun Protein zur Folge: Verlust der inhibitorischen Phosphorylierungen im Bereich der DNA-Bindedomäne und induzierte Phosphorylierung im Bereich der N-terminalen Transaktivierungsdomänen (Boyle et al., 1991a; Binètruy et al., 1991; Smeal et al., 1991, 1992; Pulverer et al., 1991; Adler et al., 1992; Franklin et al., 1992; Hagmeyer et al., 1993). Wie in dieser Arbeit gezeigt und gleichzeitig auch von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (Devary et al., 1992), induziert UVC-Bestrahlung sehr ähnliche Veränderungen am c-Jun Protein. Sowohl die verminderte negative Ladung in der DNA-Bindedomäne, als auch die erhöhte negative Ladung im Bereich der Transaktivierungsdomänen, resultieren in verbesserter Transaktivierungskapazität des c-Jun Proteins (Boyle et al., 1991a; Smeal et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993a) (s. auch Ergebnisse).

### *Signaltransduktionsmechanismen von der Zellmembran zu Transkriptionsfaktoren*

Transkriptionsfaktoren liegen am Ende einer Signaltransduktionskaskade, die von aktivierten Komponenten an der Zellmembran oder im Zytoplasma initiiert wird. Rezeptoren in der Plasmamembran binden wasserlösliche Hormone, wie Peptid-Wachstumsfaktoren oder Zytokine, und aktivieren über die Bildung von "Second Messenger" Molekülen zelluläre Proteinkinasen, die direkt oder indirekt Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Manche Rezeptoren besitzen selbst Proteinkinaseaktivität, wie z. B. die Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Insulin oder den "Platelet Derived Growth Factor (PDGF)". An Hand des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor, sollen die Mechanismen der Signaltransduktion eines Wachstumsfaktorrezeptors erläutert werden, der Protein-Tyrosinkinaseaktivität besitzt.

Bindung von EGF an seinen Rezeptor führt zur Dimerisierung bzw. Konformationsänderung zweier Rezeptormoleküle und dadurch zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Proteinkinaseaktivität. Die Rezeptormoleküle phosphorylieren sich daraufhin gegenseitig an Tyrosinresten, die in der Folge von Proteinen mit einer konservierten "Src Homology (SH) 2" Domäne gebunden werden (Schlessinger und Ullrich, 1992). SH2-Proteine können selbst enzymatische Aktivität haben, die zur Bildung von "Second Messenger" Molekülen führt (z. B. Phospholipase C, Ras-GTPase aktivierendes Protein; Margolis et al., 1989; 1990). Andere SH2-Proteine weisen keine (bekannte) Enzymaktivität auf und bestehen aus nicht viel mehr als SH2- und SH3- Domänen (SH3-Domänen binden an prolin-reiche Sequenzen, sind also auch für Protein/Protein Interaktionen wichtig). Diese "Adaptorproteine" führen zur korrekten Lokalisation von regulatorischen Proteinen an der Plasmamembran (Buday und Downward, 1993). Guaninnukleotid-Austauschfaktoren katalysieren die Beladung des Ras-Proteins mit GTP und wirken daher stimulierend, während GTPase aktivierende Proteine die Hydrolyse von GTP durch Ras steigern, also inhibierend auf Ras wirken (Boguski und McCormick, 1993).



*Schema 1 Ras-abhängige Signaltransduktion von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen*  
 (aus McCormick, Activators and effectors of ras p21 proteins, Current Opinion in Genetics & Development, 1994, 4: 71-76)

Über direkte Interaktion mit der Ser/Thr-spezifischen Proteinkinase c-Raf (Vojtek et al., 1993) aktiviert Ras eine Kaskade von Proteinkinasen: MAP/ERK-Kinase (MEK) ist ein Substrat für c-Raf und phosphoryliert ERK1 und ERK2 ("Extracellular Signal Regulated Protein Kinase 1/2") (Boulton et al., 1991; Howe et al., 1992; Kyriakis et al., 1992; Leever und Marshall, 1992; Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992). Man kann diesen Signalweg in vitro mit rekombinanten Proteinen rekonstituieren, d. h. alle notwendigen

Komponenten für die Ras-abhängige Aktivierung von ERKs sind identifiziert (MacDonald et al., 1993). Die Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Fos und Elk-1 enthalten potentielle Konsensus-Phosphorylierungsstellen für ERKs, wobei für c-Jun und Elk-1 die direkte Interaktion mit ERK2 in vitro gezeigt werden konnte (Pulverer et al., 1991; Marais et al., 1993; Rao und Reddy; 1994). Die Überexpression von ERK1 in vivo resultiert in Phosphorylierung und Aktivierung von Elk-1. Nach Mutation der Konsensus Phosphoakzeptorstellen für ERKs verliert Elk-1 seine transkriptionelle Aktivität (Janknecht et al., 1993). Dies läßt den Schluß zu, daß MAP/ERK-Kinasen diese Transkriptionsfaktoren in vivo direkt phosphorylieren. Somit läßt sich zum ersten mal eine zusammenhängende Kette von Signaltransduktionsmechanismen von der Zellmembran bis in den Zellkern darstellen. Natürlich sind andere Mechanismen ebenfalls beteiligt und sicherlich noch gar nicht bekannt.

Jeder regulatorische Vorgang in der Zelle muß seinerseits kontrolliert werden. Daher stehen treibenden Reaktionen immer auch hemmende Mechanismen gegenüber. Außerdem müssen Reize wieder gelöscht werden, um für eine weitere Stimulierung zur Verfügung zu stehen. Verschiedene Mechanismen gewährleisten die "Abschaltung" von Signaltransduktion nach der erfolgten Aktivierung: Rezeptor-Ligand Komplexe werden internalisiert und degradiert, regulatorische Phosphatgruppen werden durch Proteinphosphatasen entfernt, GTP-bindende Proteine kehren in den GDP-beladenen Zustand zurück, Inhibitoren interagieren mit aktiven Enzymen, etc. Eine gemeinsame Eigenschaft der meisten Signaltransduktionswege ist die transiente "Refraktorität" gegenüber einer erneuten Stimulierung mit dem selben Agens. Eine (oder mehrere) Komponenten der Signaltransduktion werden vorübergehend inaktiviert oder müssen neu synthetisiert werden, so daß eine erneute Stimulierung desselben Signalweges unmöglich ist (Büscher et al., 1988). Bekannte Beispiele dafür sind z. B. die Aktivierung und die nachfolgende Inaktivierung und Degradation von Proteinkinase C- (PKC-) Isoformen durch Phorbol-ester-Tumorpromotoren (Kraft et al., 1982), oder die liganden-induzierte Inaktivierung und Internalisierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Stoscheck und Carpenter, 1984; Downing et al., 1989).

Es sei an dieser Stelle auch erwähnt, daß sich unterschiedliche Signaltransduktionswege auf allen Ebenen gegenseitig beeinflussen können: So

induziert die Behandlung von Zellen mit Phorbol-ester-Tumorpromotoren eine inhibitorische Phosphorylierung am EGF Rezeptor (Cochet et al., 1984; Hunter et al., 1984; Lin et al., 1986); cAMP-Behandlung hemmt eine nachfolgende EGF-induzierte Signaltransduktion "unterhalb" des EGF Rezeptors (Burgering et al., 1993); Transkriptionsfaktoren können sich gegenseitig positiv und negativ beeinflussen (Ponta et al., 1992; Stein et al., 1993).

Daraus ergibt sich ein sehr komplexes Netzwerk von regulatorischen Vorgängen in einer Zelle und die Erforschung *eines* Signaltransduktionsweges nach Stimulierung kann immer nur begrenzte Aspekte der Vorgänge in der Zelle beleuchten.

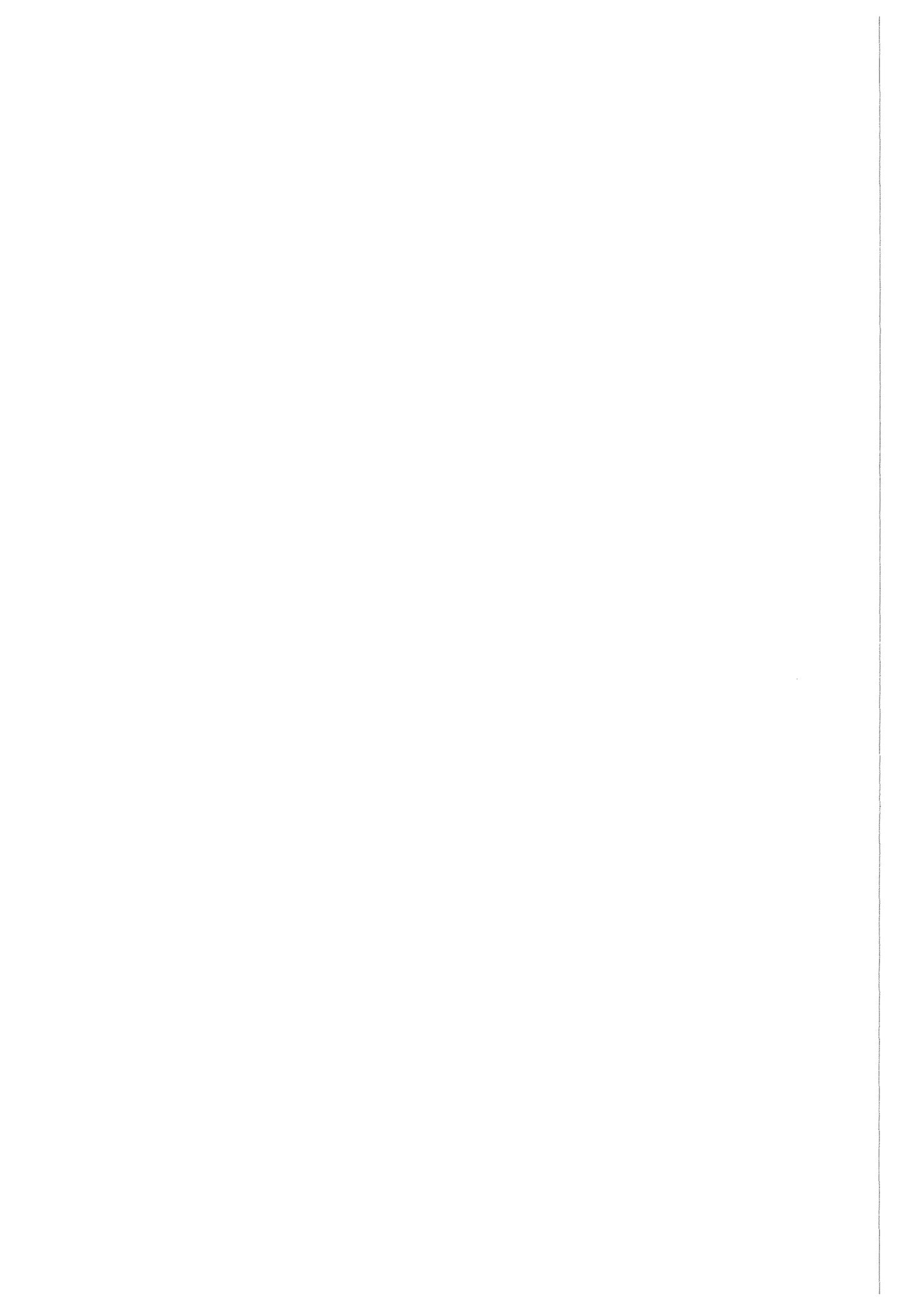
### *Was war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit über UV-induzierte Signaltransduktion bekannt?*

Büscher et al. (1988) konnten zeigen, daß sowohl UVC als auch Phorbol-ester c-fos Genexpression über das SRE induzieren. Jedoch werden von beiden Induktoren unterschiedliche Signaltransduktionswege zum SRE besprochen. Dies beruhte v. a. auf der Beobachtung, daß Phorbol-ester-Behandlung zur Refraktorität der Zellen gegenüber einer nachfolgenden Behandlung mit Phorbol-estern führte, aber eine nachfolgende UVC-Antwort nicht beeinflusste, also keine "Kreuzrefraktorität" induziert wurde. Durch den Einsatz von Inhibitoren wurden Hinweise auf die Beteiligung von Proteinkinasen an der UVC-Antwort gewonnen (Büscher et al., 1988; Krämer et al., 1990; Devary et al., 1991). Mehrere Evidenzen schlossen jedoch eine Beteiligung der PKC-Isoformen an der UVC-induzierten Signaltransduktion aus (Karin und Herrlich, 1989; Holbrook und Fornace, 1991). Gebel (1992) konnte zeigen, daß die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos nach Behandlung von Zellen mit UVC oder Phorbol-estern innerhalb von Minuten phosphoryliert werden und daß sich diese Modifikationen (in HeLa Zellen) qualitativ voneinander unterscheiden.

Stein et al. (1989) publizierten Evidenzen, daß die UVC-induzierte Schädigung der DNA für die Expression der Gene für Kollagenase, Metallothionein und des "Human Immunodeficiency Virus Long Terminal Repeat (HIV-LTR)" notwendig ist und identifizierte auch die entsprechenden Transkriptionsfaktoren, die für die Expression dieser Gene nach UVC-Bestrahlung verantwortlich sind. Folgende Evidenzen unterstützten die Hypothese, daß die Schädigung der DNA ein notwendiger Zwischenschritt

in der Expression dieser Gene nach UV-Bestrahlung ist: Zum einen waren die Aktionsspektren für Geninduktion und Zellabtötung nahezu identisch, d. h. UV induzierte Genexpression am besten im kurzwelligen Bereich, in dem die DNA-schädigende Wirkung am höchsten ist. Zum anderen reichten in Zellen von Xeroderma pigmentosum Patienten niedrigere UV-Dosen zur effizienten Genexpression aus, als in Zellen von gesunden Menschen. Der Defekt in der Fähigkeit, UV-induzierte Schäden in der DNA durch Exzisionsreparatur zu entfernen, führte demnach zu einem längeren Verweilen der Schäden in der DNA, und daher zu einem länger andauernden Signal (Miskin und Ben-Ishai, 1981).

Schon früh wurde erkannt, daß UV-bestrahlte Zellen in Kultur Faktoren ins Zellkulturmedium sezernieren, die in unbestrahlten Zellen ähnliche genetische Reaktionen auslösen, wie UV selbst (Schorpp et al., 1984; Rotem et al., 1987). Deshalb wurde eine funktionelle Beteiligung dieser Faktoren an UV-induzierter Genexpression postuliert. Krämer (1991) konnte zeigen, daß UVC-bestrahlte HeLa Zellen IL-1 $\alpha$  und bFGF sezernieren. Er erhärtete die Hypothese einer funktionellen Beteiligung beider Faktoren an der UVC-induzierten Expression des Kollagenasegens, aufgrund der Hemmbarkeit dieses Vorgangs durch Suramin, eines Hemmers von Wachstumsfaktorrezeptoren (Krämer et al., 1993).



## Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit möchte ich die Mechanismen, wie UVC-Bestrahlung zu veränderter Genexpression in Säugerzellen führt, erforschen. Dazu werde ich zwei Formen von Genexpression als Endpunkt wählen, die schnelle, proteinsynthese-unabhängige Expression der Gene *c-fos* und *c-jun* und die verzögerte, proteinsynthese-abhängige Expression des Kollagenasegens. Im ersten Fall kann angenommen werden, daß in der Zelle vorhandene Transkriptionsfaktoren durch UVC posttranslational aktiviert werden. Ich gehe davon aus, daß die durch UVC hervorgerufenen Signaltransduktionsmechanismen ähnlich sind wie jene, die auch durch andere Stimuli aktiviert werden, die ähnliche genetische Reaktionen wie UVC hervorrufen. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, daß die selben regulatorischen Sequenzen in den Promotoren induzierbarer Gene die Reaktion auf Wachstumsfaktoren, Phorbol-ester-Tumorpromotern und UVC vermitteln. Daher werde ich bekannte Komponenten der Signaltransduktion auf ihre Aktivierbarkeit durch UVC untersuchen und dadurch versuchen, den Signalweg von den Transkriptionsfaktoren zurückzufolgen. Im besten Fall werde ich so Komponenten identifizieren können, die direkt durch UVC-Bestrahlung adressiert werden.

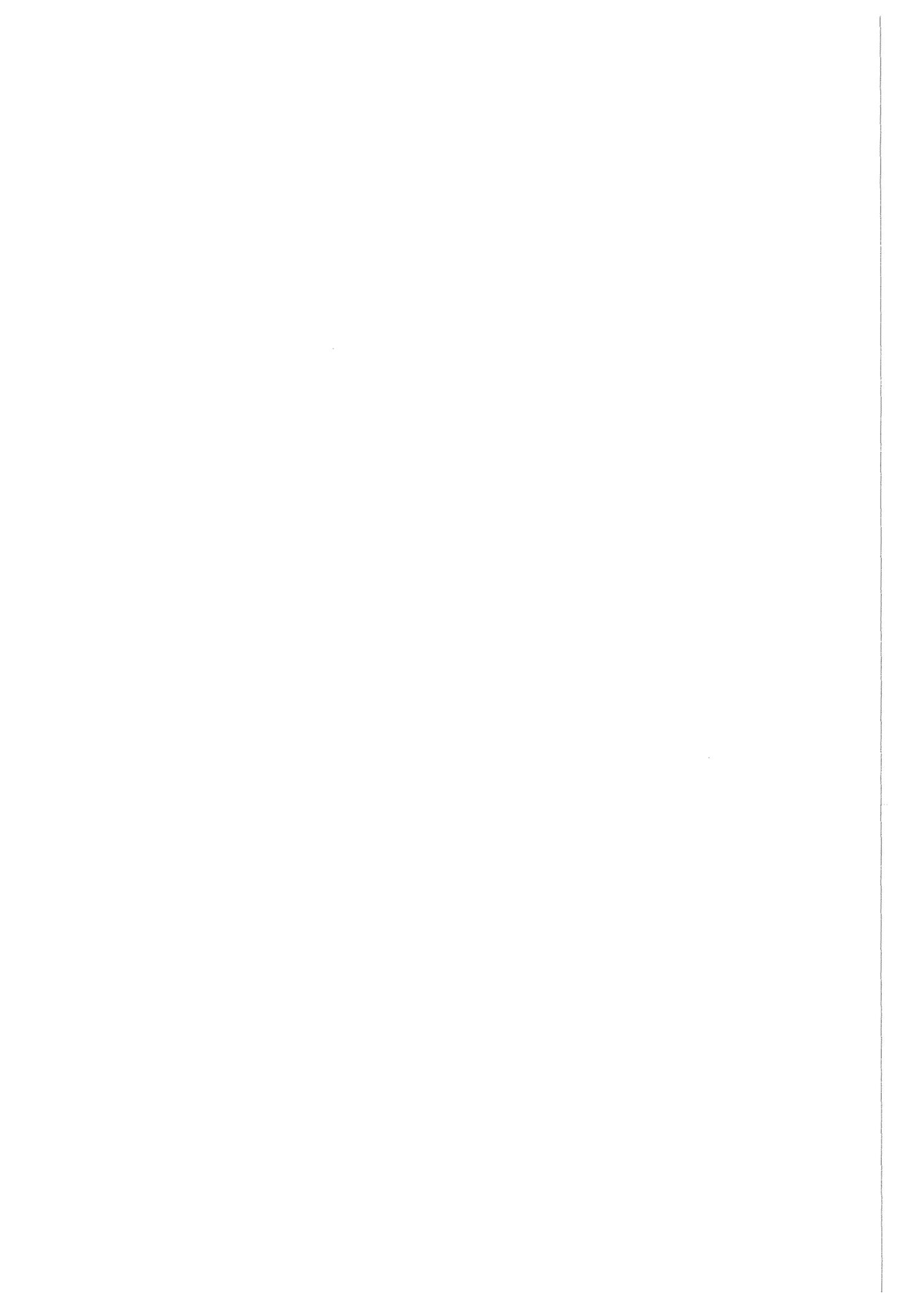
Die erste Serie von Experimenten wird sich mit der posttranslationalen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *c-Jun* und *Elk-1* beschäftigen. Beide sind für die Regulation der Expression der Gene *c-jun* bzw. *c-fos* notwendig und sind konstitutiv an ihre Erkennungssequenzen in den Promotoren gebunden. Ich werde mich auf die Analyse des Phosphorylierungszustandes beider Proteine konzentrieren, da dies eine der wahrscheinlichsten Regulationsmechanismen ist. Sollten Unterschiede in der Phosphorylierung der Proteine nach Bestrahlung von Zellen mit UVC zu erkennen sein, wird es notwendig sein, die Funktionalität dieser Veränderungen zu zeigen. Dies wird durch die Analyse von Mutanten bewerkstelligt werden. Parallel dazu wird meine Kollegin A. Radler-Pohl der Frage nachgehen, welche Proteinkinasen durch UVC aktiviert werden können und ob diese als regulatorische Kinasen für die Transkriptionsfaktoren *c-Jun* und *Elk-1* in Betracht kommen. Auch hier wird die Strategie verfolgt, bekannte Komponenten auf UVC-Aktivierbarkeit zu testen. Frau Radler-Pohl wird sich dabei auf Kinasen der MAP/ERK-Familie konzentrieren.

Sollte sich zeigen, daß Proteinkinasen durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren an der UVC-induzierten Genexpression beteiligt sind, stellt sich die Frage, welche Komponenten die Aktivierung dieser Kinasen vermitteln. Die meisten bekannten Signaltransduktionsmechanismen rühren von aktivierten Komponenten in oder an der Zellmembran her. Auch diese werden in die Untersuchung UVC-induzierter Signalmechanismen mit eingeschlossen. Hier bietet sich die Verwendung von dominant-negativ wirkenden Mutanten, die die Aktivität endogener Proteine hemmen, an. Die Analyse dieser Fragestellungen wird auch Hinweise liefern, welche Kompartimente der Zelle in der UVC-Antwort involviert sind.

Der Möglichkeit der Aktivierung membranständiger Komponenten durch UV wird auch in einem anderen experimentellen Ansatz nachgegangen. Welche Rolle spielen sezernierte Wachstumsfaktoren an der UVC-induzierten Expression des Kollagenasegens? UVC könnte, über die Freisetzung und Bindung von Liganden an ihre Rezeptoren, zu einer indirekten Aktivierung von Rezeptoren führen, die vermutlich zur verzögerten Genexpression nach UVC beitragen würden. Obwohl eine Beteiligung sezernierter Wachstumsfaktoren an der frühen Expression der Gene *c-fos* und *c-jun* unwahrscheinlich erscheint, wird der Einfluß der Hemmung rezeptor-abhängiger Signaltransduktion auch auf die frühe Genexpression untersucht. Mehrere Möglichkeiten der spezifischen und unspezifischen Inhibition von Wachstumsfaktoren bzw. -rezeptoren existieren: Die Vorbehandlung von Zellen mit einem Wachstumsfaktor hemmt die nachfolgende Wirkung desselben Faktors, vermutlich über die transiente Inaktivierung des Rezeptors. Ich werde untersuchen, ob eine Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren UVC-induzierte Reaktionen der Zelle hemmt. Darüber hinaus werde ich mit spezifischen neutralisierenden Antikörpern bzw. Antagonisten die Bindung bekannter Liganden an ihre Rezeptoren verhindern und den Einfluß dieser Behandlung auf die UVC-Antwort untersuchen. Um auch unbekannte Liganden zu hemmen, wird ein genereller Hemmstoff, der Rezeptor-Liganden-Interaktionen hemmt, zur Anwendung kommen. Schließlich kann durch die Expression dominant-negativer Rezeptor-Mutanten die Beteiligung eines Rezeptors an der Genexpression analysiert werden.

Für die meisten der gezeigten Experimente werde ich HeLa Zellen (epitheliale Zervix-Karzinom Zelllinie) verwenden. Die genetischen Reaktionen dieser Zellen sind vergleichbar mit denen von Epidermiszellen (Garmyn et al., 1992; Gilchrest et al., 1994; Roddey et al., 1994). Da UVC (260 nm) ähnlich, jedoch effizienter als UVB (290 nm) wirkt, wurde in dieser Arbeit mit UVC gearbeitet. Auch hier zeigen eigene und veröffentlichte Daten vergleichbare Reaktionen von Zellen auf UVC und UVB (Hollander und Fornace, 1989).

Durch diese Experimente erhoffe ich mir, Aufschluß über Signaltransduktionskomponenten zu bekommen, die durch UVC aktiviert werden und dadurch die genetische Reaktion einer Zelle auf UV-Strahlung regulieren.



## Material

### *Chemikalien*

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwassersystem der Firma Millipore entsalzt wurde, angesetzt.

Acrylamid-Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit
Agarose	Biozym, Hameln
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
ATP	Boehringer, Mannheim
Azetyl-Coenzym A	Sigma, München
BES	Sigma, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Desoxycholsäure (Natriumsalz)	Sigma, München
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
D-Dinitrophenyllysin	Merck, Darmstadt
DMSO	Roth, Karlsruhe
DMSO (für die Zellkultur)	Fluka, Buchs
DMEM	Sigma, München
DTT	Boehringer, Mannheim
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylazetat	Merck, Darmstadt
FCS	Gibco, Eggenstein
Ficoll	Sigma, München
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
G-50 Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glaswolle	Merck, Darmstadt

Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma, München
Glyoxal	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Glyzerophosphat	Sigma, München
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hexamin-Cobaldchlorid	Fluka, Buchs
Hefextrakt	Difco, Detroit
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
K-Na-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, München
L-Leuzin	Sigma, München
L-Lysin-HCL	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MEM (defizient)	Sigma, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
MES (Pufferan®)	Roth, Karlsruhe
Methanol (technisch)	Roth, Karlsruhe
Methionin	Sigma, München
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, München
Natriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt
Natriumziträt	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Sigma, München
Okadasäure	Moana Prod., Honolulu
Oligo-dT-Zellulose	Pharmacia, Freiburg
p-Nitrophenylphosphat	Merck, Darmstadt
Penicillin	BioWhittaker, Walkersville
Phenolrot	Sigma, München
PMSF	Sigma, München
PPO	Sigma, München
"Prime It™ Random Primer Kit"	Stratagene, Heidelberg
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-PLUS-Sepharose	Oncogene Sci, Uniondale
PVP-360	Sigma, München

Pyridin	Sigma, München
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
SDS-PAGE Standardproteine	Bio-Rad, München
Sperma-DNA (aus Hering)	Boehringer, Mannheim
Streptomycin	BioWhittaker, Walkersville
Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier Safe)	Packard, Groningen
TEMED	Bio-Rad, München
TPA	Sigma, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Bio-Rad, München
t-RNA (aus E. coli)	Boehringer, Mannheim
Trypton	Difco, Detroit
Tween-20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxyd	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
 <i>Laborartikel</i>	
Bio-Imaging Analyzer	Fuji, Japan
Brutschrank (Cytoperm)	Heraeus, Stuttgart
DC-Platten (kieselgel-beschichtet)	Macherey-Nagel, Düren
DC-Platten (zellulose-beschichtet)	Merck, Darmstadt
Einmal-Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Einschweißfolie	Andion Elektro GmbH, Kleve
Elektrophoreseapparatur (für Peptidkartierung)	CAMAG, Berlin
ELISA-Meßgerät (Titertek Multiskan PLUS)	Laborbedarf Malar, Nauheim
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme (X-Omat M20 Processor)	Kodak
Filterpapier (GB002)	Schleicher und Schuell, Dassel
Gelkammer für RNA-Agarosegel	BRL, Gaithesbury
Geltrockner	Bio-Rad, München
Laser-Densitometer	LKB/Pharmacia, Freiburg
"Mighty Small™ SE 250" Proteingelapparatur	Hoefer Scientific Instr., USA
Mikrozentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen
Nitrozellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Nylonmembran (Highbond N <sup>+</sup> )	Amersham-Buchler, Braunschweig
Parafilm™	Bender und Hobein, Bruchsal

Petrischalen für Bakterien	Greiner, Nürtingen
pH-Papier	Merck, Darmstadt
Plastikzentrifugenröhrchen	Falcon bzw. Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon)	Millipore, Bedford
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Röntgenfilmkassetten (Cronex)	Dupont
Speed Vac®	Savant, Farmingdale
Spektralphotometer (SPEKOL UV/VIS)	Zeiss, Jena
"Stratalinker"	Stratagene, Heidelberg
Stromübertragungstreifen (für Peptidkartierung)	CAMAG, Berlin
Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron
Transferapparatur für Western Blot	Hoefer Scientific Instr., USA
Transilluminator (IL-350M)	Bachofer, Reutlingen
Ultraturrax	Janke und Kunkel, Staufen
Ultrazentrifugen	Beckman, Stuttgart
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
Vapoklav Dampfsterilisator	Sterico AG, Dieticon
Vortex	Janke und Kunkel, Staufen
Wärmeschrank mit Rotationseinrichtung	Bachofer, Reutlingen
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen (Quick Seal™)	Beckman, Stuttgart

### **Radiochemikalien**

<sup>32</sup> P-Orthophosphat (370 Mbq/ml, ca. 370 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
L- <sup>35</sup> S-Methionin (370 mBq/ml, > 37000 GBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α- <sup>32</sup> P-dCTP (370 MBq/ml, 11000 GBq/ml)	Amersham-Buchler, Braunschweig
D-threo-(dichlorazetyl-1- <sup>14</sup> C)-Chloramphenicol (7,4 MBq/ml, 2.11 GBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig

**Wachstumsfaktoren**

Interleukin 1 $\alpha$ (human, rekombinant, aus E. coli, spez. Aktivität: 1 - 2 x 10 <sup>8</sup> U/mg)	British Biotechnology Ltd., Abingdon
Interleukin 1 $\alpha$ (keine spezif. Aktivität bekannt)	Biogen, Genf
Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (human, rekombinant, aus E. coli, spez. Aktivität: ca. 1 x 10 <sup>8</sup> U/mg)	British Biotechnology Ltd., Abingdon
Epidermaler Wachstumsfaktor (human, rekombinant, aus S. cerevisiae) ED <sub>50</sub> = 0.34 ng/ml	Sigma, München
Platelet Derived Growth Factor-BB Homodimer (human, rekombinant, aus E. coli, ED <sub>50</sub> = 1 - 3 ng/ml)	Calbiochem, La Jolla
Platelet Derived Growth Factor-AA Homodimer (human, rekombinant, ED <sub>50</sub> < 50 ng/ml)	Gibco BRL, Eggenstein
Insulin (aus Rinderpankreas; keine spez. Aktivität bekannt)	Sigma, München

**Antikörper**

anti EGF-Rezeptor (monoklonal IgG <sub>2a</sub> , Klon 528, gegen humanen EGF-Rezeptor aus A431 Zellen)	Oncogene Sci., Uniondale
anti c-Jun/AP-1 (Ab-1) (polyklonal, IgG, aus Kaninchen, gegen Peptid AS 209 - 225 aus v-Jun)	Oncogene Sci., Uniondale
anti IL-1 $\alpha$ (polyklonal, IgG, Protein G-gereinigt, aus Ziege, gegen gereinigtes, rekombinantes, humanes IL-1 $\alpha$ )	British Biotechnology Ltd., Abington
anti Il-1 $\alpha$ (polyklonal, gereinigt, aus Kaninchen)	Biogen, Genf
anti bFGF (polyklonal, IgG, Protein A-gereinigt, aus Kaninchen, gegen gereinigten Rinder bFGF)	British Biotechnology Ltd., Abington

Präimmenserum (Serum aus nicht immunisierten Kaninchen)	Institut für Genetik, Kernforschungszentrum, Karlsruhe
anti Phosphotyrosin (monoklonal, IgG <sub>1</sub> , Klon PT-66, gegen Phosphotyrosin-BSA)	Sigma, München
anti Maus-Immunglobuline, gekoppelt an Peroxidase aus Meerrettich (polyklonal, IgG, aus Kaninchen, gegen Maus-Immunglobuline)	Dako, Glostrup (DK)
anti Kaninchen-Immunglobuline, gekoppelt an Peroxidase aus Meerrettich (polyklonal, IgG, aus Ziege, gegen Kaninchen-Immunglobuline)	Dako, Glostrup (DK)
IL-1 Rezeptorantagonist (human, rekombinant)	Ciba-Geigy, Basel

### *Enzyme*

Proteinase K	Sigma, München
Restriktionsenzyme und 10 x Puffer	Boehringer, Mannheim Biolabs, Frankfurt Pharmacia, Freiburg USB, Cleveland
Trypsin für die Zellkultur	Difco, Detroit
Trypsin ("Sequencing Grade")	Boehringer, Mannheim

### *Puffer + Lösungen*

**PBS:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.6

**100 x Denhardt's Lösung:** 2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA

## *Medien*

Alle Medien wurden in Pulverform gekauft und nach den Herstellerangaben gelöst, mit Natriumcarbonat versetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

DMEM	Gibco, Eggenstein
F12-Medium	Gibco, Eggenstein
MEM Eagle's Medium defizient (ohne Leuzin, Lysin, Methionin und Phosphat)	Sigma, München
RPMI defizient (ohne Leuzin, Lysin, Glutamin und Methionin)	Sigma, München

### **<sup>32</sup>P-Markierungsmedium:**

MEM Eagle's Medium defizient + 0.4 mM L-Leuzin + 0.4 mM L-Lysin-HCl + 0.1 mM Methionin

### **<sup>35</sup>S-Markierungsmedium:**

RPMI defizient + 0.4 mM L-Leuzin + 0.4 mM L-Lysin-HCl + 2 mM Glutamin

### **<sup>32</sup>P/<sup>35</sup>S-Doppelmarkierungsmedium:**

MEM (defizient) + 0.4 mM L-Leuzin + 0.4 mM L-Lysin-HCl

## *Plasmide*

### Expressionsplasmide

RSV-c-Jun wt und RSV-c-Jun S1+S2 sind in Pulverer et al. (1991) beschrieben. Beide Plasmide wurden mir von J. R. Woodgett, Ludwig Institute for Cancer Research, London, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid CMV-c-Jun ( $\Delta$ 89-91) erhielt ich von M. Birrer, National Cancer Institute, Bethesda. Die Expressionsvektoren RSV-GAL4-c-Jun wt, RSV-GAL4-c-Jun (S1+S2), RSV-GAL4-v-Jun und RSV-GHF-GAL4 wurden bereits beschrieben (Radler-Pohl et al., 1993a) und wurden mir freundlicherweise von A.

Radler-Pohl, T. Oehler und P. Angel, alle am Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pUC-RSV-CAT, enthält das CAT-Gen aus pRSVcat (Gorman et al., 1982) unter der Kontrolle des RSV-LTR im Vektor pUC-RSV (P. Angel, unveröffentlicht), dem gleichen Vektor, der für die oben genannten Expressionsplasmide zur Verwendung kam (kloniert und zur Verfügung gestellt von M. Litfin, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe). Das Expressionsplasmid pElk<sub>2-374</sub>, pSRF (Ala 103) und der entsprechende "leere" Vektor pEv3S (Matthias et al., 1989) wurden in Janknecht und Nordheim (1992) bzw. Janknecht et al. (1992) beschrieben. Beide Plasmide stellte mir A. Nordheim, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule, Hannover, zur Verfügung. RSV-H-ras (Asn 17) bzw. RSV-H-ras (Leu 61) wurden beschrieben (DeVries-Smits et al., 1992; Medema et al., 1991) und wurden mir, inklusive des "leeren" Vektors (RSV-H20), von H. Bos, Laboratory for Physiological Chemistry, University of Utrecht, überlassen. Das Expressionsplasmid für die dominant-negative EGF-Rezeptor-Mutante (pRK5-HerNA8) (Redemann et al., 1992) erhielt ich, zusammen mit dem Plasmid pRK5-Herc, das für den gesamten menschlichen EGF-Rezeptor kodiert, von A. Ullrich, Max Planck Institut für Biochemie, München. Das entsprechende "leere" Expressionsplasmid (pRK5-0) entstand durch XbaI-Verdau von pRK5-HerNA8, Abtrennung der kodierenden Sequenzen und anschließender Religation des Plasmids.

### Reporterplasmide

Das Plasmid 17Mx2-tk-CAT wurde in Webster et al. (1988) beschrieben und von P. Chambon, Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes du CNRS, Strasbourg, zur Verfügung gestellt. Das SRE-tk-CAT Reporterplasmid wurde in König et al. (1989) beschrieben, das tk-CAT Plasmid entspricht pBLCAT4 in Jonat et al. (1990). Beide Plasmide wurden mir von H. König, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe, überlassen. Das -711/+45-fos-CAT wurde in Büscher et al. (1988), das -517/+63-coll-CAT und das 5xTRE-TATA-CAT in Jonat et al. (1990) beschrieben.

c-DNA Fragmente zur Hybridisierung von m-RNA (s. Northern Blot)

**v-fos (Maus):** PstI-Fragment aus dem Plasmid pUC9-v-fos (Curran et al., 1982; Rahmsdorf et al., 1987)

**c-jun (Mensch):** HindIII/PstI-Fragment des Plasmids RSV-c-Jun (Angel et al., 1988b)

**Gapdh (Ratte):** PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985)

**Kollagenase (Mensch):** HindIII/SalI-Fragment des Plasmids pCllase1 (Angel et al., 1987a)

**Zelllinien**

HeLa tk<sup>-</sup> (in der vorliegenden Arbeit nur als HeLa bezeichnet) ist eine menschliche Cervixkarzinom-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde mir vom Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

F9 tk<sup>-</sup> (in der vorliegenden Arbeit nur als F9 bezeichnet) ist eine embryonale Maus-Teratokarzinom-Zelllinie, die ich von P. Angel, Instiut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe, erhielt.

Rat-1, Rat-1/Her und Rat-1/LA29 Zellen sind Ratten-Fibroblasten-Zelllinien, die mit retroviralen Expressionsvektoren für den humanen EGF-Rezeptor (Rat-1/Her) bzw. für ts-v-Src (Rat-1/LA29) stabil transfiziert sind (Wasilenko et al. 1990; 1991) und wurden mir von M. J. Weber, Departement of Microbiology and Cancer Research Center, Charlottesville, zur Verfügung gestellt.

A431 ist eine menschliche epidermale Karzinomzelllinie (Ullrich et al., 1984), die auf Grund einer Chromosomentranslokation und Genamplifikation sehr hohe Mengen an EGF-Rezeptor expremiert. Erhalten von J. van Zoelen, Departement of Cell Biology, University of Nijmegen.

NIH3T3 Maus-Fibroblasten-Zelllinien, die den menschlichen Insulin-Rezeptor (NIH3T3-HIR), den menschlichen  $\alpha$ -PDGF Rezeptor (NIH3T3- $\alpha$ PDGFR), den menschlichen  $\beta$ -PDGF-Rezeptor (NIH3T3- $\beta$ PDGFR) bzw. ein Hybridmolekül aus dem menschlichen EGF-Rezeptor und dem v-erbB Onkogen (NIH3T3-HER-erbBES4) stabil überexprimieren, erhielt ich von A. Ullrich, Max Planck Institut für Biochemie, München.

### ***Bakterien***

**E. coli DH5 $\alpha$ :** F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *recA1*,  
*gyrA96*, *relA1*

## Methoden

### *Zellkultur*

Alle Zellen wurden bei 6% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte und 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Medien, Puffer und Glaswaren waren steril. HeLa Zellen wurden in DMEM Medium mit 8%FCS, Rat-1, Rat-1/Her, Rat-1/LA29, A431 und NIH-3T3 Zellen im gleichen Medium mit 10% FCS kultiviert. Das Kulturmedium für F9 Zellen setzte sich aus DMEM- + F12-Medium (1 : 1) + 10% FCS + 2 mM Glutamin + 10<sup>-4</sup> M β-Mercaptoethanol zusammen. Die Kultivierung erfolgte in sterilen, beschichteten Plastikpetrischalen oder -flaschen. Die Menge an Kulturmedium richtete sich nach der Fläche und wurde so gewählt, daß der Flüssigkeitsstand ca. 5 mm über der Zellschicht betrug. Die Zellen wurden vor oder kurz nach Erreichen der Konfluenz passagiert. Zellkulturmedium, dem im Verlauf eines Versuches unsterile Substanzen zugesetzt wurde (z.B. DNA), wurde mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt.

### *Passagieren von Zellen*

Die Zellen wurden einmal mit PBS (37°C, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, s. Puffer und Lösungen) gewaschen und für einige sec mit Trypsin (0.25% in 15 mM Na-Zitrat, 134 mM KCl, 0.001% Phenolrot, pH 7.6) gespült. Die Trypsinlösung wurde abgesaugt, so daß ca. 0.5 ml zurückblieb, und die Zellen für einige min im Brutschrank inkubiert. Klopfen erleichterte das vollständige Ablösen der Zellen und wurde mit einem Mikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium (37°C) gesammelt, gut suspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturflaschen oder -schalen verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl eignete sich eine Zählkammer nach Neubauer.

### *Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Nach dem Ablösen der Zellen durch Trypsin (s. oben) wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (3 min, 330 g im Schwingbecherrotor), in dem gewünschten Volumen Einfriermedium (= Zellkulturmedium + 10%

steriles DMSO) suspendiert und auf Einfrierröhrchen verteilt. Als Regel galt: zwei Einfrierröhrchen pro konfluenter Zellkulturschale ( $\varnothing$  14 cm). Die Ampullen wurden schrittweise abgekühlt (30 min bei 0°C; einige h bei -20°C; einige h bei -80°C) und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Ampullen bei 37°C im Wasserbad erwärmt und der Inhalt langsam in 10 ml Kulturmedium (37°C) suspendiert, zentrifugiert (3 min, 330 g), erneut in Kulturmedium suspendiert und auf eine Zellkulturschale ( $\varnothing$  14 cm) verteilt.

### ***Sterilisation***

Medien, Puffer, Lösungen und mit Zellen oder Mikroorganismen in Kontakt gekommener Abfall wurde bei 120°C und 1.4 bar Luftdruck für 20 min in feuchter Atmosphäre sterilisiert (Autoklav). Glaswaren wurden für mehrere Stunden bei 180°C in trockener Atmosphäre sterilisiert.

### ***Markierung von Proteinen mit $^{35}\text{S}$ -Methionin bzw. $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in Kultur***

(Die Angaben in [Klammern] beziehen sich auf  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat).

Die Zellen wurden mit 37°C warmen PBS [TBS (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 125 mM NaCl)] gewaschen und das Markierungsmedium für das jeweilige Isotop (s. Medien) zugesetzt. Das Volumen des Markierungsmediums wurde möglichst gering gehalten, um eine hohe Konzentration an Isotop zu erzielen. Dem Medium wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin [ $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat] entsprechend den Abbildungslegenden zugesetzt und die Zellen für 3 h [3 h] im Brutschrank inkubiert (die Markierungsdauer mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin richtet sich nach der Halbwertszeit des zu untersuchenden Proteins). Bei Markierungen in Kultur mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin wurde in den Brutschrank eine offene Petrischale mit Aktivkohle gestellt, um flüchtige radioaktive Abbauprodukte des Methionins zu binden. Nach Ablauf der Inkubationszeit bzw. der anschließenden Stimulierung der Zellen (s. dort) wurde das Markierungsmedium gesammelt, die Zellen einmal mit PBS (0°C) gewaschen und zur Immunpräzipitation vorbereitet.

### ***Sicherheitsvorkehrungen bei Markierung von Zellen mit radioaktiven Isotopen***

Besonders das Markieren von Proteinen mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in Kultur erforderte besondere Vorsichtsmaßnahmen, da große Mengen an Radioaktivität eingesetzt wurden und  $^{32}\text{P}$  eine große Strahlungsreichweite besitzt (7.9 m in Luft). Die Experimente wurden in einem Isotopenlabor durchgeführt. Alle Manipulationen erfolgten hinter Plexiglas (Dicke: 20 mm; Abschirmung auch nach unten!) und zusätzlich wurde eine Bleischürze getragen. Abfallbehälter waren ebenfalls aus Plexiglas (Dicke: 10 mm).  $^{32}\text{P}$ - und  $^{35}\text{S}$ -haltige Flüssigkeiten wurden getrennt gesammelt, hinter Blei gelagert und nach Ablauf mehrerer Halbwertszeiten entsorgt. Besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, sich möglichst kurz hohen Strahlungsdosen auszusetzen. Vorratsgefäße, Abfallbehältnisse für das radioaktive Markierungsmedium bzw. die Zellkulturschalen wurden so schnell wie möglich aus dem Experimentierbereich entfernt. Vor und nach einem Experiment wurde der gesamte Arbeitsbereich, die verwendeten Geräte und die eigene Person gründlich gemessen (Geiger-Müller Zähler) und gegebenenfalls dekontaminiert.

### ***Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors***

Die Zellen wurden einmal mit PBS (0°C) gewaschen und auf Eis in 0.8 - 1.0 ml Lysispuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 0.25 mM para-Nitrophenylphosphat, 0.1 mM ATP, 10 µg/ml Leupeptin; siehe auch Obermeier et al., 1993) aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben in Mikrozentrifugenröhrchen überführt, kurz gemischt (Vortex) und durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 13000 g, 4°C). Die Überstände wurden in Gegenwart von Protein G-Sepharose (10 µl gepacktes Volumen) und 0.5 µg anti-EGF-Rezeptor Antikörper für 1.5 - 2 h bei 4°C rotiert. Die Sepharosegekoppelten Antigen-/Antikörperkomplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren (5 sec, 13000 g, RT) pelletiert und viermal mit je 1.0 ml Waschpuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 10% Glycerin, 0.1% Triton X-100) und anschließender Zentrifugation (5 sec) gewaschen. Als letzter Schritt wurde die Sepharose

mit einer Kanüle trockengesaugt und in 20 µl SDS-PAGE Probenpuffer (s. dort) aufgenommen.

#### Herstellung von $\text{Na}_3\text{VO}_4$ (Kypta et al., 1988)

$\text{Na}_3\text{VO}_4$  (100 mM) wurde in etwas weniger als dem Endvolumen  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit verdünnter HCl (1 : 5) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt (Messung mit Indikatorpapier; Lösung wird gelb!). Nach Erreichen des pH Wertes wurde die Lösung bei 100°C im Wasserbad erhitzt, bis diese farblos wurde. Nach Abkühlen auf RT wurde der pH Wert kontrolliert, das Endvolumen eingestellt und die Stammlösung für nicht länger als 2 Monate bei 4°C gelagert. Sollte sich der pH Wert nach der Abkühlung verändern, muß er erneut eingestellt und die Lösung wie oben erhitzt werden. Dieser Vorgang muß so oft wiederholt werden, bis der pH-Wert stabil bleibt.

#### ***Immunpräzipitation des c-Jun Proteins***

Die Zellen wurden einmal mit PBS (0°C) gewaschen und auf Eis in 0.5 - 0.8 ml RIPA-Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 125 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Desoxycholat, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin) aufgenommen. Die Lysate wurden in Mikrozentrifugenröhrchen für Ultrazentrifugen (TL-100, Beckman) überführt und 30 min bei 120000 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Protein A-Sepharose (10 µl gepacktes Volumen) und 0.5 µg anti-c-Jun Antikörper (Ab-1) versetzt und für 1.5 - 2 h bei 4°C rotiert. Die Präzipitate wurden viermal mit RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen (vgl. Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors). Als letzter Schritt wurde die Sepharose mit einer Kanüle trockengesaugt und in 20 µl SDS-PAGE Probenpuffer (s. dort) aufgenommen.

#### ***SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)***

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach Lämmli (1970). Die Konzentration von Acrylamid (im Verhältnis 37,5 : 1 mit Bisacrylamid gemischt) im Trenngel wird in den Abbildungslegenden angegeben (% AA-Bis in 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS,

0.025% TEMED, 0.02% Ammoniumperoxodisulfat). Die Gellösung wurde durch Unterdruck entgast, zwischen zwei durch Abstandhalter getrennte Glasplatten (12 x 14 cm) gegossen und während des Polymerisierungsvorganges mit 0.5% SDS (in H<sub>2</sub>O) überschichtet. Eine der beiden Glasplatten besaß eine 10 cm lange Aussparung mittig am oberen Rand; die Gellösung wurde bis ca. 1.5 cm unter den Rand dieser Aussparung gegossen. Nach erfolgter Polymerisierung des Trenngels wurde das Sammelgel (5% AA-Bis in 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% TEMED und 0.05% Ammoniumperoxodisulfat) über das Trenngel gegossen und in Gegenwart eines "Kammes", der in die Aussparung der Glasplatte paßte, polymerisiert. Durch die "Zähne" des Kammes bildeten sich Taschen im Sammelgel, in die die Proteinproben, die zuvor in SDS-PAGE Probenpuffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.02% Bromphenolblau) für 5 min bei 100°C denaturiert worden waren, aufgetragen wurden. Der Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 0.1% SDS) stellte die Verbindung zwischen Anode und Kathode her. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA zur Anode, bis die Bromphenolblaufront ( $M_r = 670$ ) das Gel verlassen hatte. Zur Verfolgung der Elektrophorese wurde in den meisten Fällen gefärbte Standardproteine bekannten Molekulargewichts in dem Gel aufgetrennt und erlaubten so die Bestimmung des Molekulargewichts des interessierenden Proteins. Im Falle der Auftrennung von radioaktiv-markierten Proteinen, wurden <sup>14</sup>C-markierte Standardproteine verwendet.

#### *Sichtbarmachung von <sup>35</sup>S- bzw. <sup>14</sup>C-markierten Proteinen im Polyacrylamidgel durch Fluorographie*

Da <sup>35</sup>S und <sup>14</sup>C schwache  $\beta$ -Strahler sind, empfiehlt es sich, ihre Signale durch Fluorographie zu verstärken. Hierzu wurden Polyacrylamidgele, die <sup>35</sup>S- oder <sup>14</sup>C-markierte Proteine enthielten, in zwei Schritten á 30 min mit DMSO entwässert und für mindestens 2 h bei RT in einer 22%-igen PPO-Lösung (in DMSO) geschüttelt. Durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O präzipitierte das (wasserunlösliche) PPO im Gel und überschüssiges PPO wurde entfernt. Das Gel wurde anschließend auf einem Geltdrockner bei 80°C und Unterdruck für 1.5 h getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert. Da PPO als Szintillator wirkt, kommt es zu einer Umwandlung der radioaktiven Signale in Lichtimpulse und dadurch zu einer Verstärk-

ung der Signale am Film im Vergleich zur herkömmlichen Autoradiographie. Auf Grund dieser Tatsache konnten PPO-aktivierte Gele jedoch nicht durch "Phospho-Storage" Technik sichtbar gemacht werden (s. Autoradiographie).

### ***Identifizierung von immobilisierten Proteinen durch Antikörper (Western Blot Analyse)***

Zur genaueren Identifizierung von Proteinen oder deren Modifikationszustand wurden diese, nach Auftrennung durch SDS-PAGE, elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran übertragen. Dazu wurde die hydrophobe Membran kurz in Methanol benetzt und mit Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 0.01% SDS, 20% Methanol) gewaschen. Das Polyacrylamidgel, zwei Stück Filterpapier und zwei Schwämme wurden ebenfalls für einige Minuten in Transferpuffer equilibriert. Gel und Membran wurden in direkten Kontakt gebracht, von beiden Seiten mit je einem Stück Filterpapier und einem Schwamm "sandwichartig" umgeben und in einem Gittergestell fixiert (s. auch Towbin et al., 1979). Das Gestell wurde vertikal in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer geklemmt, so daß das von zwei Elektroden erzeugte Stromfeld rechtwinklig auf die Fläche des Gels bzw. der Membran gerichtet war. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 - 150 mA konstanter Stromstärke für 2 - 16 h mit Kühlung.

Die Membran mit den gebundenen Proteinen wurde kurz mit TBS (25 mM Tris-HCl pH 8.1, 125 mM NaCl) gewaschen und für mindestens 30 min in einer Trockenmilchlösung (4% Trockenmagermilch in TBS und 0.5% Tween-20; TM-TBS) geschüttelt. Antikörper, die das gewünschte Epitop erkennen (= primärer Antikörper), wurden in TM-TBS verdünnt (üblicherweise 1 : 2000 - 1 : 3000) und zusammen mit der Membran luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Membran wurde für mindestens 1.5 h unter Rotation bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 4-maliges Waschen der Membran mit TM-TBS für je 2 min entfernt und anschließend in der selben Art und Weise mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser war jeweils gegen Immunglobuline der Spezies des primären Antikörpers gerichtet und war zusätzlich an das Peroxidaseenzym aus Meerrettich

gekoppelt. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation wurde überschüssiger Sekundärantikörper wie oben gewaschen und die Membran zusätzlich zweimal für je 2 min mit TBS gewaschen. Die Membran wurde daraufhin auf eine saubere Glasplatte gelegt, im Dunkeln mit einem Substratgemisch (Fa. Amersham) für 1 min inkubiert und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig entfernt. Haushaltsfolie wurde möglichst faltenfrei über die Membran gespannt und die Membran mit einem herkömmlichen Röntgenfilm in einer Filmkassette exponiert (einige sec - min, RT). Durch peroxidase-katalysierte Oxidation des Substrates Luminol wurde dieses angeregt und emittierte Licht im Bereich von 428 nm ("Enhanced Chemoluminescence, ECL"; s. auch Gebrauchsanleitung der Fa. Amersham). Der Röntgenfilm wurde anschließend wie bei der herkömmlichen Autoradiographie entwickelt.

### *2-dimensionale tryptische Peptidkartierung (Boyle et al., 1991b)*

Proteine, die in Kultur mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat, bzw. simultan mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert worden waren, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (0.45  $\mu\text{m}$  Porenweite) übertragen (vgl. Western Blot Analyse). Im Gegensatz zur PVDF-Membran muß Nitrozellulose nicht in Methanol benetzt werden. Die markierten Proteine wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht, auf der Nitrozellulosemembran lokalisiert und jene Bereiche, die das gewünschte Protein enthielten, mit einem Skalpell ausgeschnitten. Nach 30-minütiger Inkubation in 0.5% PVP-360 (in 100 mM Essigsäure) bei 37°C wurden die Nitrozellulosestücke kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  und anschließend in 50 mM Ammoniumcarbonat gespült. Die membran-gebundenen Proteine wurden in einem minimalen Volumen 50 mM Ammoniumcarbonat mit 10  $\mu\text{g}$  Trypsin ("sequencing grade"; Boehringer Mannheim) bei 37°C für mindestens 2 h inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Durch den Verdau lösten sich die Peptide von der Membran und der Puffer mit den Peptiden wurde in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die NZ-Membran wurde mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und der Überstand mit dem Verdauansatz vereinigt. Durch wiederholtes Einkonzentrieren im Vakuum (Speed Vac®) und Resuspendieren in  $\text{H}_2\text{O}$  wurde überschüssiges Ammoniumcarbonat aus den Proben solange entfernt, bis kein Pellet mehr zu sehen war.

Um Artefakte bei der 2-dimensionalen Auftrennung der Peptide zu vermeiden, mußten Methionin- und Cysteinreste oxidiert werden. Ameisensäure und Wasserstoffperoxid (37%) wurden im Verhältnis 9 : 1 gemischt und nach 60-minütiger Inkubation bei RT auf Eis abgekühlt. Je 50 µl der so entstandenen Perameisensäure wurden zu den getrockneten Peptiden gegeben, für 60 min auf Eis inkubiert, mit 1 ml H<sub>2</sub>O (0°C) gemischt und im Vakuum eingetrocknet. Die Peptide wurden in 400 µl Peptid-Elektrophoresepuffer (6% Ameisensäure, 1.25% Essigsäure, 0.25% Pyridin; pH 1.9) suspendiert und unlösliches Material durch Zentrifugation (10 min, 13000 g, RT) abgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und im Vakuum eingetrocknet. Die Gesamt-cpm an <sup>32</sup>P der trockenen Peptide wurden im Szintillationsmeßgerät ohne Szintillationsflüssigkeit ermittelt (Cherenkow cpm). Um die Menge an <sup>35</sup>S-spezifischen Zerfällen zu bestimmen, wurden die Peptide in 5 µl Peptid-Elektrophoresepuffer suspendiert und 1 µl davon in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Durch geeignetes Setzen der Energiefenster im Szintillationsmeßgerät konnten so <sup>35</sup>S- von <sup>32</sup>P-spezifischen Zerfällen unterschieden werden. Zur zwei-dimensionalen Auftrennung wurden im Falle von <sup>35</sup>S/<sup>32</sup>P Doppelmarkierungen gleiche Mengen an <sup>35</sup>S-spezifischen cpm pro Probe eingesetzt.

### 1. Dimension: Elektrophorese

Die in 4 µl Peptid-Elektrophoresepuffer gelösten Peptide wurden punktförmig in die Mitte und 2 cm vom unteren Rand einer 20 x 20 cm zellulosebeschichteten Dünnschichtchromatographie- (DC-) Platte aufgetragen. Gegenüberliegend vom Probenauftragungspunkt, 2 cm vom oberen Rand der Platte entfernt, wurde ein 1 : 1 Gemisch aus Xylencyanol (1 mg/ml; blau) und N-Dinitrophenyllysin (5 mg/ml; gelb) als Farbindikator der Elektrophorese aufgetragen. Das Gemisch trennte sich während der Elektrophorese in seine beiden Bestandteile auf. Ein Filterpapier wurde etwas größer als eine DC-Platte ausgeschnitten und entsprechend den Proben- und Farbauftragungspunkten mit kreisrunden Aussparungen versehen. Das Filterpapier wurde in Peptid-Elektrophoresepuffer befeuchtet (nicht tropfnaß!) und vorsichtig auf die DC-Platte gelegt, so daß die kreisrunden Aussparungen genau über den Auftragungspunkten für die Probe bzw. den Farbindikator positioniert

wurden. Dadurch saugte sich der Puffer im Bereich der Aussparungen konzentrisch in die Zellulosebeschichtung und führte zu einer weiteren Konzentration der Probe bzw. des Farbindikators. Der Rest der Platte sollte gleichmäßig feucht, jedoch nicht naß sein. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch vorsichtiges Abtupfen mit einem Kleenex-Papierhandtuch entfernt. Die DC-Platte wurde auf einer H<sub>2</sub>O-gekühlten Elektrophoreseapparatur plaziert, so daß Anode bzw. Kathode links bzw. rechts vom Probenauftragspunkt zu liegen kamen. Durch Stromübertragungstreifen aus Papier wurde eine Verbindung zwischen DC-Platte und zwei Elektrodenpuffertanks hergestellt. Beim Schließen des Gerätes mit dem Deckel, tauchten Anode bzw. Kathode jeweils in die mit Peptid-Elektrophoresepuffer gefüllten Tanks und führten somit zum Stromfluß quer über die DC-Platte. Die Elektrophorese dauerte 30 min bei 1000 V. Da in dem Peptid-Elektrophoresepuffer (pH 1.9) der Großteil aller Aminosäurereste positiv geladen war, konnte davon ausgegangen werden, daß die meisten Peptide zur Kathode wandern würden.

## 2. Dimension: Chromatographie

Die DC-Platten wurden nach der Elektrophorese luftgetrocknet und anschließend einer aufsteigenden Chromatographie (Laufmittel: 37.5% Butanol, 25% Pyridin, 7.5% Essigsäure) unterzogen, bis die Lauffront ca. 2/3 der Plattenhöhe gewandert war (4 - 5 h). Nach Trocknung (Abzug!) wurden die <sup>32</sup>P- bzw. <sup>35</sup>S-markierten Peptide durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Um im Falle von <sup>35</sup>S/<sup>32</sup>P-Doppelmarkierungen nur die <sup>32</sup>P-spezifischen Signale nachzuweisen, wurden die Platten mit jeweils zwei Röntgenfilmen exponiert, so daß die <sup>35</sup>S-spezifischen Signale durch den ersten Film vollständig abgefangen wurden.

### *Autoradiographie*

Nukleinsäuren oder Proteine, die mit <sup>32</sup>P markiert worden waren, wurden durch Exposition mit einem Röntgenfilm bei -70°C in einer lichtdichten Kassette und anschließender Entwicklung (automatisierte Entwicklungsmaschine) sichtbar gemacht. <sup>14</sup>C- bzw. <sup>35</sup>S-markierte Proteine wurden durch Fluorographie (s. dort), <sup>14</sup>C-Chloramphenicol durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Für alle Isotopen (außer <sup>3</sup>H) eignete sich auch die

"Phospho-Storage" Technologie. Sie beruht darauf, daß eine sensitive Schicht auf einer "Imaging Plate" durch radioaktive Strahlung stabil angeregt wird, die bei nochmaliger Anregung durch einen Laserstrahl die gespeicherte Energie proportional zur Radioaktivität als Luminiszenz abgibt. Das Abtasten der Schicht mit dem Laser und die Messung der dabei entstehenden Lichtimpulse erfolgten in einem Bio-Imaging Analyzer (BAS 100; Fuji Photo Film Co, Ltd., Japan) und die anschließende quantitative Auswertung mittels geeigneter Software (MacBAS) an einem MacIntosh Computer. Die Exposition der radioaktiven Proben mit der beschichteten "Imaging Plate" erfolgte in einer herkömmlichen Filmkassette bei Raumtemperatur. Die "Imaging Plate" konnte durch weißes Licht gelöscht und wiederverwendet werden.

#### *Densitometrische Auswertung von Signalen am Röntgenfilm*

Die quantitative Auswertung von Autoradiographie-Signalen erfolgte mit einem "Enhanced Laser Densitometer; Ultrosan XL" und dem angeschlossenen Softwarepaket "GelScan XL" (Fa. Pharmacia) nach den Angaben der Herstellerfirma.

#### *Transiente Transfektion von Zellen*

##### *DEAE-Dextran Methode (Kawai und Nishizawa, 1984)*

HeLa Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  pro Zellkulturschale ( $\varnothing$  9 cm) ausgesät. Zur Transfektion wurden die Zellen einmal mit 37°C warmen TBS (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen und für 30 min mit 1.0 ml eines Gemisches aus DNA und 0.5 mg/ml DEAE-Dextran in TBS inkubiert. Während dieser Zeit verblieben die Zellkulturschalen in der Sterilbank und wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit ab und zu geschwenkt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS (37°C) gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versetzt. 6 - 8 h später wurde das Medium gegen Zellkulturmedium mit 0.5% FCS ausgetauscht (s. auch Behandlung von Zellen).

Kalziumphosphat Methode (Graham und van der Eb, 1973)

F9 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät, so daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion exponentiell wuchsen. Ein Gemisch aus Plasmid-DNA, H<sub>2</sub>O und 0.25 M CaCl<sub>2</sub> wurde in einem geeigneten sterilen Plastikröhrchen vorbereitet und unter vorsichtigem Schütteln tropfenweise in ein Plastikzentrifugenröhrchen mit dem gleichen Volumen an doppelt konzentriertem (2x) HeBS-Puffer (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.05 mit NaOH eingestellt) pipettiert. Das Volumen des Zentrifugenröhrchens sollte ein Vielfaches des Gesamt-Flüssigkeitsvolumens haben, um gleichmäßige, sanfte Durchmischung zu ermöglichen. Das Präzipitat bildete sich während einer 30-minütigen Inkubation bei RT und wurde anschließend tropfenweise in das Zellkulturmedium einer Schale verteilt. Das Volumen eines Transfektionsansatzes wurde so gewählt, daß die gewünschte Menge Plasmid-DNA (s. Abbildungslegenden) in 1/10 des Volumens des Zellkulturmediums einer Schale vorlag. Die Zellen wurden daraufhin für 6 h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert, das Präzipitat durch 2-maliges Waschen mit PBS (37°C) entfernt und frisches Zellkulturmedium zugesetzt.

Modifizierte Kalziumphosphat Methode (Chen und Okayama, 1987)

Rat-1 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät, so daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion exponentiell wuchsen. Ein Gemisch aus Plasmid-DNA, H<sub>2</sub>O und 0.25 M CaCl<sub>2</sub> wurde in einem Zentrifugenröhrchen (Vol ≥ 12 ml) vorbereitet. Dazu wurde unter vorsichtigem Schütteln das gleiche Volumen an doppelt konzentriertem (2x) BBS-Puffer (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6.95 mit HCl eingestellt) tropfenweise pipettiert. Das Präzipitat bildete sich während einer 30-minütigen Inkubation bei RT und wurde anschließend tropfenweise in das Zellkulturmedium einer Schale verteilt. Das Volumen eines Transfektionsansatzes wurde so gewählt, daß die gewünschte Menge Plasmid-DNA (s. Abbildungslegenden) in 1/10 des Volumens des Zellkulturmediums einer Schale vorlag. Die anschließende Inkubation der Zellen erfolgte bei 35°C, 3% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte für 6 - 8 h. Anschließend wurde das Präzipitat durch 2-

maliges Waschen mit PBS entfernt, frisches Zellkulturmedium zugesetzt und die Zellen unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

### *Behandlung von Zellen zur Stimulierung der Genexpression*

Sofern nicht anders angegeben, wurde das Zellkulturmedium aller Zellen 16-24 h vor Behandlung mit UVC oder anderen Induktoren durch "Hungermedium" (Zellkulturmedium mit 0.5% FCS) ersetzt. Zur Behandlung wurden alle Schalen einmal mit PBS (37°C), im Falle von Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in Kultur mit TBS (s. dort), gewaschen. Die UV-Bestrahlung erfolgte ohne PBS mit einer UVC Lampe (Maximalemission bei 265 nm, 15 W) und einer Dosis von  $30 \text{ J/m}^2$  (Bei einem Abstand von 32 cm hatte die Lampe eine Leistung von  $1.4 \text{ J/m}^2 \times \text{sec}$ ; die Bestrahlungsdauer betrug daher 21 sec). Im Falle höherer Bestrahlungsdosen (s. Abbildungslegenden) wurde entweder der Abstand der UVC Lampe verringert oder als Strahlungsquelle ein "Stratalinker" verwendet. Die Berechnung der UVC-Dosis erfolgte nach Herstellerangaben. In keinem Fall betrug die Bestrahlungsdauer mehr als 30 sec. Im in Abb. 14 gezeigten Experiment wurden die Zellen durch DMEM-Medium (ohne Phenolrot) hindurch bestrahlt (2 min, insgesamt  $600 \text{ J/m}^2$ ). Die Kontrollschalen wurden immer identisch zur UVC-Bestrahlung behandelt (ohne Bestrahlung). Betrug die Inkubationsdauer nach der UVC-Bestrahlung mehr als 1 min, wurde das ursprüngliche Kulturmedium zurückgegeben. Die Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren bzw. Phorbolster-Tumorpromotoren erfolgte durch Verdünnung konzentrierter Stammlösungen in das Zellkulturmedium. Zur Aktivierung des temperatursensitiven v-Src Enzyms in Rat-1/LA29 Zellen wurden die Zellen von der restriktiven Temperatur (39°C) in einen Brutschrank mit der permissiven Temperatur (35°C) transferiert.

### *Bestimmung der m-RNA Menge zellulärer Gene (Northern Blot Analyse)*

Alle Lösungen und Glaswaren wurden durch Hitzesterilisation von RNAsen befreit; Einmal-Plastikwaren waren immer frisch und steril. Während aller Manipulationen wurden Handschuhe getragen.

#### Isolierung von m-RNA

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung (s. Abbildungslegenden) einmal mit PBS (0°C) gewaschen und in der Kulturschale in 5 ml (Ø 9 cm) bzw. 10 ml (Ø 14 cm) STE-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) mit 300 µg/ml Proteinase K und 0.5% SDS, lysiert. Die Lysate wurden in sterile Plastik-Zentrifugenröhrchen (Vol = 50 ml) überführt, für 20 sec mit einem Ultraturrax (halbmaximale Leistung) homogenisiert und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert (die Lysate können auch bei -80°C zwischengelagert werden). Anschließend wurden die Homogenate mit NaCl zu einer Endkonzentration von 0.5 M versetzt und in Gegenwart von 50 mg Oligo-dT-Zellulose pro Probe für 2 - 4 h bei RT rotiert. Oligo-dT-Zellulose konnte regeneriert werden (zweimal Waschen mit einem großem Volumen 0.1 M NaOH, 5 mM EDTA; fünfmal mit H<sub>2</sub>O, zweimal mit HSB-Puffer (s. unten)) und wurde in einer 50%-igen (v/v) Suspension in HSB-Puffer bei 4°C gelagert. Die Oligo-dT-Zellulosegebundene m-RNA wurde durch Zentrifugation der Homogenate (2 min, 400 g, 15°C im Schwingbecherrotor) pelletiert und viermal mit je 10 ml HSB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) gewaschen. Die m-RNA wurde eluiert, indem die Oligo-dT-Zellulose dreimal mit je 1 ml und einmal mit 1.5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen wurde, wobei der erste Waschschrift verworfen und die restlichen (insgesamt 3.5 ml) in einem sterilen Plastikzentrifugenröhrchen (Vol = 12 ml) auf Eis gesammelt wurden. 400 µl der Eluate wurden im Spektralphotometer zur Bestimmung der m-RNA Konzentration gemessen. Der Rest wurde mit t-RNA aus *E. coli* (10 µg pro Probe), 3 M Na-Azetat (pH 5.0) zu einer Endkonzentration von 0.2 M und dem 2.5 fachen Volumen Ethanol versetzt und für mindestens 16 h bei -20°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (20 min, 14500 g, 4°C im Schwingbecherrotor) pelletiert, einmal mit 80% Ethanol (in H<sub>2</sub>O) gewaschen, erneut für 10 min pelletiert und im Exsikkator getrocknet.

### Auftrennung von m-RNA im Agarosegel

Die m-RNA wurde in H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 0.5 - 1 µg/µl aufgenommen und die angegebene Menge (s. Abbildungslegenden) mit RNA-Denaturierungslösung (21.6% deionisiertes Glyoxal (s. unten), 75.4% DMSO, 3% 50 x RNA-Laufpuffer (s. unten)) im Verhältnis 1 : 1.8 gemischt. Das Gemisch wurde für 8 min bei 50°C im Wasserbad erhitzt und mit 1/5 Vol RNA-Ladepuffer (50% Glyzerin, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.9, 0.4% Bromphenolblau, 0.5 µg/µl Ethidiumbromid) versetzt. Die Proben wurden in die Taschen eines Agarosegeles (1.4% in RNA-Laufpuffer (s. unten); zur Herstellung von Agarosegelen s. auch Agarosegelelektrophorese von DNA) gefüllt und für 2.5 - 3 h bei 75 V zur Anode aufgetrennt, bis die Bromphenolblaufront ca. 8 cm weit gewandert war. Dabei mußte der Laufpuffer zwischen Anode und Kathode zirkuliert werden. Der RNA-Laufpuffer wurde als 50-fach konzentrierte Stammlösung (0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.9 mit Phosphorsäure eingestellt) vorbereitet und für die Elektrophorese 1 : 49 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

### Deionisieren von Glyoxal

Glyoxal (30% in H<sub>2</sub>O) wurde mit ca. 10% (w/v) Mischbett-Ionenaustauscher (AG 501-X8 (D), Bio-Rad) versetzt und vorsichtig mit einem Magnetrührer gerührt (20 min, RT). Der Ionenaustauscher wurde durch einen Faltenfilter abfiltriert und die Glyoxallösung mit frischem Ionenaustauscher gemischt. Der Vorgang wurde sooft wiederholt, bis der pH-Wert der Lösung  $\geq 5$  war. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### Transfer von m-RNA auf eine Membran

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die aufgetrennte RNA mittels Kapillarkräften auf eine Nylonmembran übertragen ("Northern Blot"). Dazu wurde das Gel auf einen Filterpapierstreifen plaziert, der mit beiden Enden in ein Reservoir mit 20 x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0.3 M Na-Zitrat pH 6.5) tauchte. Über dem Gel wurden, in derselben Größe wie das Gel, die Nylonmembran, 3 in 20 x SSC-Puffer befeuchtete Filterpapiere, drei

trockene Filterpapiere und ein Stapel Kleenex Papierhandtücher gelegt und mit Hilfe einer Glasplatte und eines Gewichts (0.5 kg) beschwert. Nach 16 h wurde die Membran für 1.5 min im UV-Licht (302 nm, Transilluminator, 180 W) fixiert und anschließend der Hybridisierung mit radioaktiv markierten c-DNA Proben unterzogen oder trocken bei RT gelagert.

#### Hybridisierung immobilisierter m-RNA mit $^{32}\text{P}$ -markierten c-DNA Proben

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (Prähybridisierung), wurde die Membran für mindestens 1 h in einem verschließbaren Meßzylinder (Vol = 250 ml) mit 20 ml Hybridisierlösung (6 x SSC, 5 x Denhardt's Lösung (s. Puffer und Lösungen), 0.5% SDS, 100 µg/ml Sperma-DNA aus Hering) in waagerechter Position bei 65°C rotiert. Hierzu stand ein Wärmeschrank mit einer Rotationseinrichtung zur Verfügung. Die Membran wurde so an die Innenwand des Zylinders gelegt, daß die RNA-gebundene Seite durch die Rotation gleichmäßig mit Hybridisierlösung benetzt wurde. Zur Hybridisierung mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten c-DNA Probe (s. dort) wurde die Probe denaturiert (5 min bei 100°C) und in die auf 10 ml reduzierte Hybridisierlösung im Zylinder pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte für weitere 16 h unter Rotation bei 65°C. Überschüssige Probe wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Puffern sinkender Salzkonzentration entfernt (zweimal 15 min mit 2 x SSC + 0.1% SDS; einmal 30 min mit 1 x SSC + 0.1% SDS, ein- zweimal 15 min mit 0.5 x SSC + 0.1% SDS). Die Membran wurde in feuchtem Zustand in Plastikfolie eingeschweißt und die radioaktiven Signale durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur Rehybridisierung mit anderen Proben wurde die Membran für 15 min in Dehybridisierungslösung (0.5% SDS in H<sub>2</sub>O) bei 95°C erhitzt und einer erneuten Prähybridisierung unterzogen.

#### *Markierung von cDNA-Fragmenten mit $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP*

c-DNA Fragmente wurden durch Restriktionsverdauung (s. dort), Auftrennung im Agarosegel (s. dort) und anschließender Isolierung aus dem Gel (exakt nach Sambrook et al., 1989; 6.24 - 6.27) gereinigt und durch die "Random Prime" Methode radioaktiv markiert (s. auch Gebrauchsanleitung der Fa. Stratagene). 50 - 100 ng Fragment-DNA wurden mit H<sub>2</sub>O in einem Endvolumen von 23 µl gemischt, mit 10 µl einer Lösung zufalls-

generierter 9-mer Oligonukleotide ("Random Primer") versetzt, für 5 min bei 100°C denaturiert und weitere 5 min auf Eis abgekühlt. 10 µl einer 5-fach konzentrierten Nukleotidlösung (jeweils 0.1 mM dATP, dGTP, und dTTP) sowie 3 µl <sup>32</sup>P-α-dCTP (370 MBq/ml; ca. 110 TBq/mmol) und 1 µl Klenow Fragment der DNA Polymerase I (5 U/µl) wurden zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation (37°C) wurde die Reaktion mit 2 µl "Stop-Mix" (0.5 M EDTA pH 8.0) und 50 µl TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) gestoppt. 1 µl der Reaktion wurde abgenommen und im Szintillationsmeßgerät ohne Szintillationsflüssigkeit gemessen (Cherenkow-cpm).

#### Ausschlußchromatographie über "gespinnene Säulen"

Sie diene zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide aus dem Markierungsansatz. Einmalspritzen (Vol = 1 ml) wurden mit Glaswolle abgedichtet und mit G-50 Sepharose (in TEN-Puffer; s. oben) bis zu einem gepackten Volumen von 0.9 - 1.0 ml gefüllt. Zum Entfernen überschüssiger Flüssigkeit wurden die Säulen in ein Zentrifugenröhrchen (Vol = 12 ml) gehängt und zentrifugiert (4 min, 170 g, RT, im Schwingbecherrotor). 100 µl TEN-Puffer wurden in die trockene Säule pipettiert, wie oben zentrifugiert, und dieser Vorgang sooft wiederholt, bis das Eluatvolumen exakt 100 µl betrug (das Eluat wurde in einem Mikrozentrifugenröhrchen gesammelt). Die so vorbereiteten Säulen konnten mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert werden. Die Markierungsreaktion (100 µl; s. oben) wurde in der selben Weise durch die Säule in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen zentrifugiert. 1 µl des Eluats wurde entnommen und zusammen mit dem Aliquot der Markierungsreaktion (s. oben) im Szintillationszähler ohne Szintillationsflüssigkeit gemessen (Cherenkow-cpm). Aus dem Verhältnis der beiden Werte konnte die Effizienz des Einbaus von <sup>32</sup>P-α-dCTP bzw. die spezifische Aktivität (in cpm/µg DNA) der Probe ermittelt werden. Ca. 1 - 2 x 10<sup>6</sup> cpm der markierten Probe (spez. Aktivität ca. 1 - 2 x 10<sup>7</sup> cpm/µg) wurden zur Hybridisierung der immobilisierten RNA eingesetzt (s. Northern Blot Analyse) oder bei -20°C gelagert.

### *Analyse der Expression des Chloramphenicolazetyltransferase- (CAT-) Gens*

Die Zellen einer Zellkulturschale wurden einmal mit PBS (RT) gewaschen, mit einem Gummispatel in 1 ml PBS abgeschabt und in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch kurzes Zentrifugieren (10 sec, 13000 g, RT) pelletiert und in 100 µl 0.25 M Tris-HCl pH 7.5 resuspendiert. Durch dreimaliges Frieren und Tauen im flüssigen Stickstoff bzw. Wasserbad (37°C) wurden die Zellen aufgebrochen und anschließend das Debris abzentrifugiert (5 min, 13000 g, RT). 5 µl des Überstandes wurden zur Proteinmengenbestimmung mit 145 µl Lowry-Lösung I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1 N NaOH) und 250 µl Lowry-Lösung IV (s. unten) gemischt. Nach Zugabe von je 30 µl 50%-iger Folin-Lösung (in H<sub>2</sub>O) wurden die Ansätze kräftig gemischt (Vortex) und für 30 min im Dunkeln stehengelassen. Lowry-Lösung IV wurde frisch zubereitet, indem Lowry-Lösung II (2% Na-K-Tartrat in H<sub>2</sub>O) und Lowry-Lösung III (1% CuSO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O) je 1 : 100 in Lowry-Lösung I verdünnt wurden. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden aufsteigende Mengen an Rinder-serumalbumin (BSA) (0 -60 µg) in insgesamt 145 µl Lowry-Lösung I gelöst, mit je 5 µl 0.25 M Tris-HCl pH 7.5 versetzt und gleich behandelt wie die Proben. Nach der 30-minütigen Inkubation im Dunkeln wurden Aliquots der Proben bzw. der Eichwerte spektrophotometrisch bei 600 nm vermessen und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Platten-Meßgerät.

Gleiche Mengen Extraktprotein wurden mit je 7000 pmol <sup>14</sup>C-Chloramphenicol (57 mCi/mmol), 0.8 mM Acetyl-Coenzym A und 0.25 M Tris-HCl pH 7.5 in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 1 ml Ethylazetat beendet und das <sup>14</sup>C-Chloramphenicol und seine Reaktionsprodukte durch gutes Mischen und anschließendes Zentrifugieren (5 min, 13000 g, RT) extrahiert. Der Lösungsmittelüberstand wurde im Vakuum eingetrocknet (Speed-Vac®) und das Pellet in 15 µl Ethylacetat suspendiert. Die Proben wurden 2 cm vom Rand einer kieselgel-beschichteten DC-Folie (20 x 20 cm) punktförmig nebeneinander aufgetragen, getrocknet und einer aufsteigenden Chromatographie in Chloroform : Methanol (9 : 1) unterzogen. Dadurch trennten sich die azetylierten Reaktionsprodukte des Chloramphenicols vom unazetylierten Substrat. Nachdem die Laufmittelfront ca. 5 cm vom oberen Rand entfernt war (ca. 50 min), wurde

die Platte luftgetrocknet und die radioaktiven Signale durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Durch quantitative Ermittlung der Radioaktivität im Substrat bzw. den Reaktionsprodukten, konnte die Enzymaktivität des CAT-Enzyms in pmol azetyliertes Chloramphenicol/ mg Extraktprotein x h berechnet werden. Die quantitative Auswertung erfolgte entweder durch Ausschneiden der entsprechenden Regionen der DC-Folie und Messung der Radioaktivität im Flüssig-Szintillationsmeßgerät oder durch Messung der Signalintensitäten am "Phospho-Storage" Gerät.

### *Gewinnung von Plasmid-DNA aus E. coli*

#### Transformation von E. coli (Hanahan, 1986)

500 ml LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefextrakt, 1% NaCl, 0,1% Glukose in H<sub>2</sub>O) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur E. coli DH5 $\alpha$  in LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> = 0,4 bei 37°C geschüttelt (2 - 3 h). Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (15 min, 1000 g, 4°C) und der Überstand gründlich entfernt. Die Bakterien wurden in insgesamt 20 ml sterilfiltriertem, kaltem TFB-Puffer (100 mM KCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM HAcOCl<sub>3</sub>, 10 mM MES-KOH pH 6,2, 15% Glyzerin) durch vorsichtiges Schwenken suspendiert, auf Zentrifugenröhrchen (Vol = 50 ml) verteilt und das Puffervolumen auf insgesamt 100 ml erhöht. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 1000 g, 4°C), vorsichtig in insgesamt 20 ml TFB-Puffer (4°C) resuspendiert und entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder in Aliquots zu je 200  $\mu$ l bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden in einem sterilen Plastikzentrifugenröhrchen je 100  $\mu$ l kompetente Bakterien (frisch oder auf Eis aufgetaut) mit 1 -100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Nach einem 1,5 minütigen "Hitzeschock" bei 42°C wurden die Transformationsansätze mit je 1 ml SOC-Medium (0,5% Hefextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) versetzt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. 100 - 300  $\mu$ l eines Transformationsansatzes wurden auf eine Agarplatte (LB-Medium + 1,5% Agar + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C bebrütet.

### Plasmidpräparation

Einzelkolonien eines Transformationsansatzes wurden durch "Mini-präparation" von Plasmid-DNA aus kleinen Mengen Bakterien (exakt nach Sambrook et al., 1989; 1.25 - 1.28) und anschließendem Restriktionsverdau (s. dort) mit geeigneten Enzymen überprüft. Positive Klone wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium (s. oben) + 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C geschüttelt und in 500 ml desselben Mediums angeimpft. Die Kultur wurde für mindestens 20 h bei 37°C geschüttelt und die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 4000 g, RT) pelletiert. Diese wurden in insgesamt 20 ml Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert und für 30 min auf Eis stehengelassen. Anschließend wurden insgesamt 40 ml Lösung II (0.2 M NaOH, 1% SDS) unter Rotieren tropfenweise zugegeben und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von insgesamt 30 ml Lösung III (3 M Na-Azetat pH 4.8) wurde das Lysat kräftig gemischt und für 60 min auf Eis stehengelassen. Bakteriendebris wurde durch Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4°C) pelletiert, der Überstand durch ein Kleenex Papierhandtuch in frische Zentrifugenbecher filtriert und mit 2.5 Vol Ethanol für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation (10 min, 16000 g, 4°C) gesammelt, der Überstand dekantiert und das Präzipitat in insgesamt 20 ml Lösung IV (0.1 M Na-Azetat, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 ml Ethanol erfolgte eine weitere Fällung bei -20°C für ca. 1 h. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (10 min, 16000 g, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet im Exsiccator getrocknet. Der Niederschlag wurde in 4.2 ml einer 51.5%-igen (w/v) CsCl-Lösung (in 1 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 µg/ml Ethidiumbromid) gelöst und mittels einer Spritze in ein verschweißbares Ultrazentrifugenröhrchen (Vol = 5 ml) gefüllt. Nach luftblasenfreiem Auffüllen mit der gleichen CsCl-Lösung, wurde das Röhrchen verschweißt und zentrifugiert (16 h, 270000 g, 20°C). Durch die Bildung eines CsCl-Gradienten fokussierte die intakte und die in Einzelsträngen gebrochene Plasmid-DNA in zwei distinkten Banden, so daß die intakte DNA mit einer Spritze entnommen und erneut im CsCl-Gradienten (wie oben) zentrifugiert werden konnte (5 h, 270000 g, 20°C). Die Plasmid-Bande wurde entnommen, das Flüssigkeitsvolumen mit H<sub>2</sub>O auf ca. 4 ml erhöht und das Ethidiumbromid durch wiederholtes Ausschütteln mit

H<sub>2</sub>O-gesättigtem Butanol extrahiert (das Ethidiumbromid wanderte in die organische Phase). Die klare Plasmidlösung wurde mit Na-Azetat (pH 4.8) zu einer Endkonzentration von 0.2 M versetzt und in einem 2.5-fachen Volumen Ethanol bei -20°C gefällt (mindestens 1 h). Nach Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4°C), wurde das Pellet einmal mit 80% Ethanol (in H<sub>2</sub>O) gewaschen, erneut zentrifugiert, im Exsikkator getrocknet und in einem kleinen Volumen H<sub>2</sub>O (0.5 - 1.0 ml) gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch ermittelt und die DNA bei -20°C gelagert.

### *Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

In einem Volumen von 10 - 50 µl wurde DNA, 1/10 Vol 10 x Restriktionsverdau-puffer (wurde zusammen mit den Enzymen vom Hersteller bezogen), H<sub>2</sub>O und Enzym gemischt und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Der Berechnung der Enzymmenge lag die Definition zu Grunde, daß 1 Unit Enzym 1 µg λ-Phagen DNA in 1 h bei 37°C vollständig verdaut. Es wurde üblicherweise maximal 25% der nötigen Units, die für einen vollständigen Verdau in 1 h nötig gewesen wären, eingesetzt und dafür die Inkubationsdauer erhöht. Die Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

### *Agarosegelelektrophorese von DNA*

Agarose wurde je nach der Größe der erwarteten DNA-Restriktionsfragmente in der gewünschten Konzentration (ca. 1 +/- 0.3%) in 0.5 x TBE-Laufpuffer (45 mM Tris, 45 mM Borat, 1 mM EDTA; pH 8.0 (ohne Einstellen!)) durch Kochen gelöst und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die auf ca. 50°C abgekühlte Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und in Gegenwart eines "Kammes" bis zur Erstarrung abgekühlt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Vol 5 x DNA-Probenpuffer (50% Glycerin, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% Bromphenolblau) gemischt, das Gel mit Laufpuffer überschichtet und die Proben in die Geltaschen, die durch die "Zähne" des Kammes gebildet wurden, gefüllt. Die Elektrophorese der Proben erfolgte zur Anode (100 V konstant). Durch die Gegenwart des Ethidiumbromids war eine Visualisierung der DNA im UV-Licht (302 nm, Transilluminator, 180 W) möglich.

### *Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

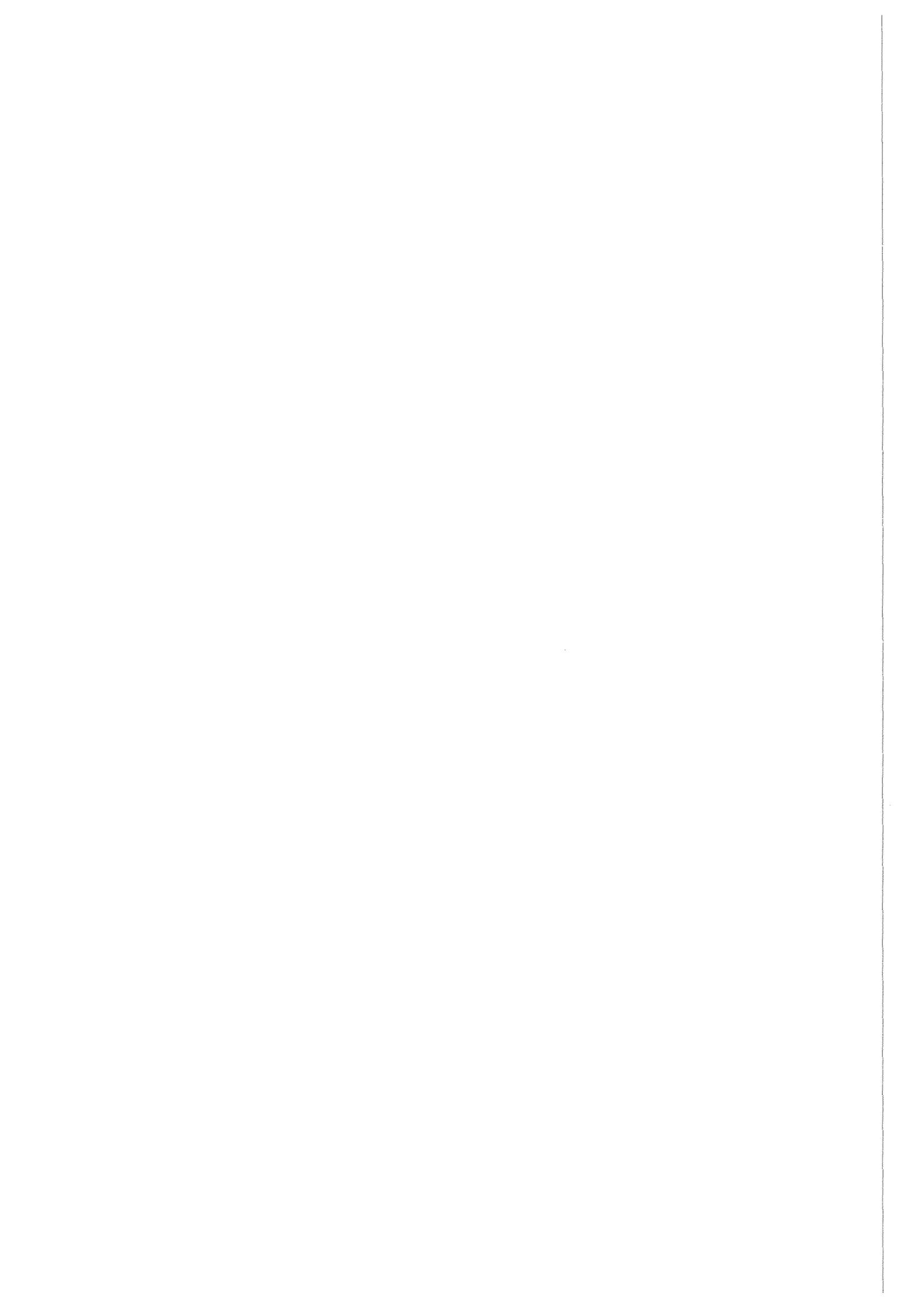
DNA oder RNA wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und die Absorption bei 260 bzw. 280 nm in einer Quarzglasküvette gemessen. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 bzw. 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte zwischen 1.8 - 2 : 1 liegen. Zur Berechnung der Konzentration wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{DNA: } OD_{260} \times 50 = [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{RNA: } OD_{260} \times 40 = [\mu\text{g/ml}]$$

### *Präparation von Zellkernextrakten (Zinck et al., 1993)*

Die Zellen wurden einmal mit PBS (0°C) + 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> + 10 mM NaF + 0.5 mM PMSF gewaschen, in dem selben Puffer von der Schale geschabt und in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt (Eis!). Die Zellen wurden kurz zentrifugiert (10 sec, 13000 g, RT) und das Pellet in 400 µl hypotonem Lysispuffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 20 mM β-Glyzerophosphat, 10 mM para-Nitrophenylphosphat, 400 nM Okadasäure) mit Hilfe eines Plastikspatels vorsichtig suspendiert. Nach Inkubation (10 min, Eis) wurden die Zellen kurz und kräftig gemischt (Vortex) und wie oben kurz zentrifugiert. Das Pellet (= Kerne) wurde in 100 µl Hochsalzpuffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% Glyzerin, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 20 mM β-Glyzerophosphat, 10 mM para-Nitrophenylphosphat, 400 nM Okadasäure) suspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 14000 g, 4°C) wurden die Überstände (= Kernextrakte) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.



## Ergebnisse

Die meisten der hier gezeigten Daten wurden veröffentlicht (Krämer et al., 1993; Radler-Pohl et al., 1993a; 1993b; Herrlich et al., 1994; Sachsenmaier et al., 1994a; 1994b). Die Publikationen werden nur dann zitiert, wenn nicht eigene Daten erwähnt werden.

### *Wie werden die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1 aktiviert?*

Die Protoonkogene c-fos und c-jun werden über posttranslationelle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren innerhalb von Minuten nach UVC-Bestrahlung verstärkt transkribiert (Büscher et al., 1988; Devary et al., 1991; Stein et al., 1992). Die effiziente transkriptionelle Aktivierung des c-fos Gens durch UVC setzt das Vorhandensein eines intakten "Serum Response Element" (SRE) voraus (Büscher et al., 1988). Es bindet einen Komplex aus einem Dimer des "Serum Response Factor" (SRF) und einem Monomer eines "Ternary Complex Factor" (TCF) (s. Einleitung). Beide Proteine sind Phosphoproteine und ihre Aktivierung durch Wachstumsfaktoren oder Phorbolster-Tumorpromotoren beruht auf zusätzlicher Phosphorylierung. Für den TCF Elk-1 korreliert die induzierte Phosphorylierung mit der transkriptionellen Aktivierung des c-fos Promoters (Zinck et al., 1993). Im Promoter des c-jun Gens sind zwei Bindestellen für Vertreter der AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie für die Induzierbarkeit durch UVC verantwortlich (Stein et al., 1992; Herr et al., 1994). Da in den meisten Zellen das c-Jun-Protein eine Untereinheit von AP-1 darstellt, nimmt c-Jun autoregulatorisch an der Regulation seiner eigenen Transkription teil (Angel et al., 1988b).

Um herauszufinden, wie UVC-Bestrahlung die Gene c-jun und c-fos über die sie regulierenden Transkriptionsfaktoren aktiviert, wurde im folgenden die posttranslationelle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1 nach UVC-Bestrahlung von Zellen untersucht.

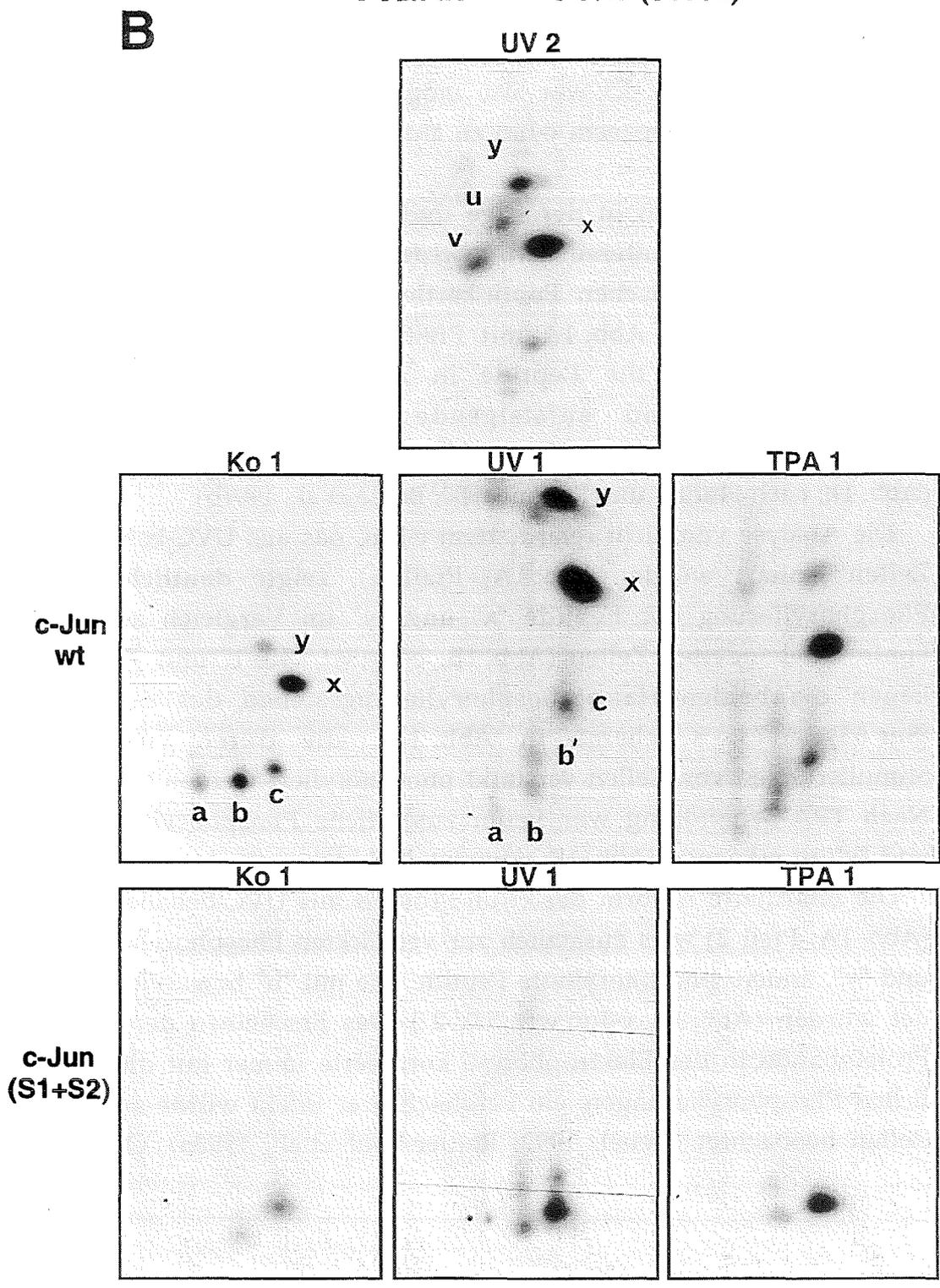
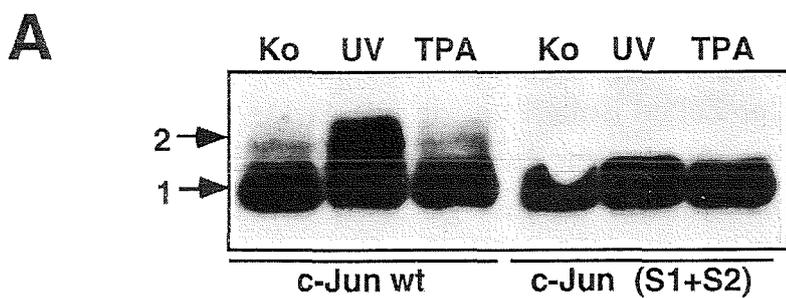
UVC-Bestrahlung induziert die schnelle Phosphorylierung von c-Jun

Die Regulation der Transaktivierungseigenschaften des c-Jun-Proteins erfolgt hauptsächlich über Veränderungen im Phosphorylierungszustand des Proteins (Hunter und Karin, 1992; Sachsenmaier und Radler-Pohl, 1994). Dieser ändert sich z. B. drastisch nach Behandlung von Zellen mit Phorbol-ester-Tumorpromotoren und nach Überexpression transformierender Onkogen-Produkte (Boyle et al., 1991a; Smeal et al., 1991; 1992). Ich untersuchte daher, ob ähnliche Veränderungen auch nach Bestrahlung von Zellen mit UVC auftreten.

F9 Zellen (eine Maus-Teratokarzinom-Zelllinie) exprimieren kein endogenes c-Jun (Chiu et al., 1988). Diese wurden mit einem Expressionvektor, der für menschliches c-Jun kodiert, transient transfiziert, in Kultur mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat markiert und mit UVC bzw. 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) behandelt. Daraufhin isolierte ich das c-Jun-Protein durch Immunpräzipitation und bestimmte dessen Gehalt an  $^{32}\text{P}$  durch elektrophoretische Auftrennung und anschließender Autoradiographie.

*Abb.1 Modifikation von c-Jun durch UVC*

- A. F9 Zellen wurden mit je 10  $\mu\text{g}$  pro Petrischale ( $\varnothing$  6 cm) RSV-c-Jun wt Expressionsplasmid (c-Jun wt) bzw. RSV-c-Jun S1+S2 (c-Jun (S1+S2)) transient transfiziert (Kalziumphosphat Methode). Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 2.5 h mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in Kultur markiert (37 MBq/ml; 370 TBq/mmol) und mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV) bzw. TPA (50 ng/ml) behandelt. 20 min nach der Behandlung wurden die Proteine durch Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Antikörper (c-jun/AP-1 (Ab-1)) isoliert, durch SDS-PAGE (10% AA-Bis) aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose Membran übertragen (Western Blot). Die Abbildung zeigt die Autoradiographie der Membran (16 h). Die Pfeile bezeichnen unterschiedliche Modifikationsformen von c-Jun.
- B. Die verschiedenen modifizierten Formen von c-Jun (1 und 2; vgl. B.) wurden mit Trypsin gespalten, die resultierenden Peptide zwei-dimensional aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (2 - 6 d; 600 bis 800 Cherenkow-cpm an  $^{32}\text{P}$  wurden pro Probe aufgetrennt). Die Phosphopeptide wurden entsprechend Abb. 1A mit Kleinbuchstaben bezeichnet.



In Abb. 1A ist zu sehen, daß c-Jun-Protein, das 20 min nach UVC-Bestrahlung der Zellen isoliert wurde, verstärkte Phosphorylierung und ein retardiertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese zeigte (Abb. 1A, Isoformen von c-Jun mit Pfeilen gekennzeichnet). Behandlung der Zellen mit TPA hingegen hatte keinen Einfluß auf den Phosphorylierungszustand von c-Jun. Nicht transfizierte F9 Zellen zeigten unter denselben Behandlungsbedingungen keine nachweisbaren Mengen an c-Jun-Protein (Daten nicht gezeigt). Es war also möglich, transient expremiertes c-Jun unabhängig von endogenem c-Jun zu analysieren

Um Veränderungen in der Lage und Intensität einzelner Phosphorylierungsstellen zu untersuchen, wurde das c-Jun-Protein einer zweidimensionalen tryptischen Peptidkartierung unterzogen. Die  $^{32}\text{P}$ -markierten Proteine (in Abb. 1A mit Pfeilen gekennzeichnet) wurden mit Trypsin gespalten, die Peptide in zwei Dimensionen aufgetrennt (Elektrophorese und aufsteigende Chromatographie) und die phosphorylierten Peptide durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 1B; nach Hunter und Sefton, 1980; Boyle et al., 1991b).

Die Analyse von nicht retardiertem c-Jun, das aus UVC-behandelten F9 Zellen isoliert wurde (Abb. 1A, Pfeil 1), zeigte deutlich verstärkte Phosphorylierung der Peptide "x" und "y" im Vergleich zu c-Jun aus kontroll-behandelten Zellen (Abb. 1B, c-Jun wt, "Ko 1" und "UV 1"). Hier liegen die beiden Hauptphosphorylierungsstellen des c-Jun-Proteins (Ser 63/Ser 73; s. Schema in Abb. 1C), die durch verschiedenste Stimulierungen von Zellen verstärkt phosphoryliert werden (s. Einleitung). Nach TPA-Behandlung war kaum zusätzliche Phosphorylierung an "x" und "y" zu erkennen (Abb. 1B, c-Jun wt, "TPA1").

Die retardierte Isoform des c-Jun-Proteins aus UVC-behandelten Zellen (Abb. 1A, Pfeil 2) wies zusätzlich zur verstärkten Phosphorylierung an "x" und "y", andere phosphorylierte Peptide, die mit "u" bzw. mit "v" bezeichnet wurden (Abb. 1B, c-Jun wt, "UV 2"). Das Erscheinen der retardierten Proteinbande in der Elektrophorese korrelierte immer mit diesen zusätzlichen Phosphorylierungen; ein vergleichbarer Effekt wurde auch in HeLa Zellen beobachtet (Gebel, 1992; Radler-Pohl et al., 1993a). Offensichtlich

erhöht sich nach Bestrahlung der Zellen der Anteil an hyperphosphoryliertem c-Jun Protein.

**C**

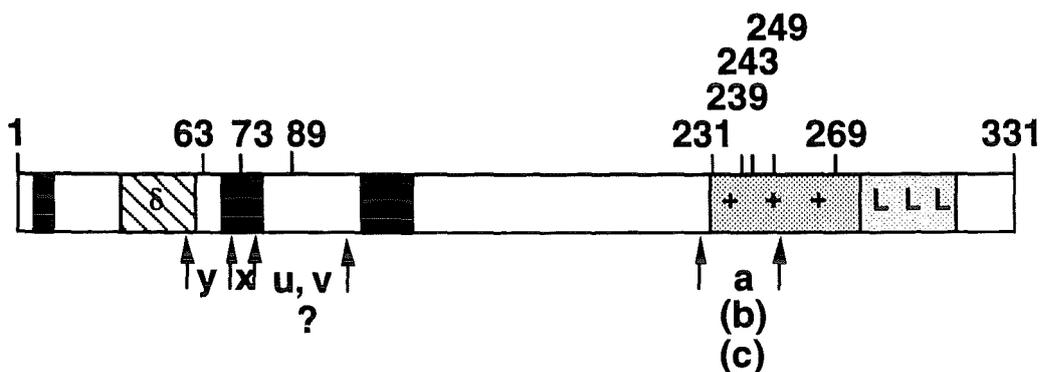


Abb.1 Modifikation von c-Jun durch UVC

C Schematische Darstellung des menschlichen c-Jun-Proteins. Die N- und C-terminalen Aminosäuren, sowie die bekannten Phosphorylierungsstellen sind mit Nummern gekennzeichnet. Pfeile bezeichnen Trypsin-Erkennungssequenzen, die zur Ausbildung von phosphorylierten Peptiden in der 2-dimensionalen Auftrennung führen (a, b, c, x, y, u und v; s. auch Text). Schwarze Kästchen entsprechen den Transaktivierungsdomänen nach Angel et al. (1989), gepunktete Kästchen kennzeichnen die DNA-Bindedomäne, bestehend aus der "Basischen Region" (+) und dem "Leuzin-Zipper" (L). Die gestreifte Box ( $\delta$ ) bezeichnet eine Domäne von 26 Aminosäuren (Delta-Domäne), die im v-Jun-Protein fehlt (Maki et al., 1987).

Die Phosphorylierung der Peptide "a", "b" und "c" spiegelt den Ladungszustand der DNA-Bindedomäne des c-Jun-Proteins wider und damit seine Fähigkeit, an DNA zu binden (Boyle et al., 1991a). Die drei Peptide stellen tri-, di- und monophosphorylierte "Phosphoisomere" eines Peptids aus dem Bereich der basischen DNA-Binderegion von c-Jun dar (s. Schema in Abb. 1C). Sowohl UVC- als auch TPA-Behandlung von F9 Zellen resultierte in der Dephosphorylierung dieses Peptids (vgl. "a" in "Ko 1", "UV 1" und "TPA 1" in Abb. 1B, c-jun wt) und somit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zur mono- und diphosphorylierten Form des Peptids ("c" bzw. "b"). Die Aufspaltung des Peptids "b" in "b + b'" (Abb. 1B, "UV1", "TPA1") wurde bereits nach TPA-Behandlung von HeLa Zellen beschrieben (Boyle et al., 1991a) und ist vermutlich auf die alternative Phosphorylierung verschiedener Stellen im Peptid zurückzuführen. (Die Signale, die in der

direkten Verlängerung der Peptide "a" bzw. "b" auf der Höhe von "y" zu sehen sind (c-Jun wt, "UV1" bzw. "TPA1") waren nicht reproduzierbar und stellen vermutlich Verunreinigungen oder Artefakte der Chromatographie dar.)

Es kann also festgehalten werden, daß sich der Phosphorylierungszustand von transient expremiertem c-Jun in F9 Zellen nach UVC-Bestrahlung stark verändert. Verstärkter Phosphorylierung im Bereich der Transaktivierungsdomänen steht Dephosphorylierung im Bereich der DNA-Bindedomäne gegenüber. Darüber hinaus können nach UVC-Bestrahlung zusätzliche Phosphorylierungen beobachtet werden. Ähnliche Vorgänge lassen sich auch an endogenem c-Jun Protein aus HeLa Zellen beobachten (Gebel, 1992; Radler-Pohl et al., 1993).

#### Mutationen von Ser 63 und Ser 73 verhindern die UVC-induzierten Phosphorylierungen von c-Jun

Um die Bedeutung der Phosphorylierungen nach UVC-Bestrahlung und deren Lokalisation näher zu charakterisieren, testete ich mutierte Proteine, die ebenfalls transient in F9 Zellen expremiert wurden. In ähnlicher Weise wie oben beschrieben wurden F9 Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für c-Jun mit Mutationen an Ser 63 bzw. Ser 73 zu Leu (Pulverer et al., 1991) kodiert. Diese Aminosäureaustausche hatten erwartungsgemäß den Verlust der Phosphopeptide "x" und "y" in der zwei-dimensionalen Peptidkartierung zur Folge (Abb. 1B, c-Jun (S1+S2)). Allerdings verhinderten die beiden Mutationen auch das Erscheinen der retardierten Bande in der ein-dimensionalen Auftrennung (Abb. 1A, c-Jun (S1 + S2)) und die Ausprägung der Peptide "u" und "v" (Abb. 1B, c-Jun (S1+S2)). Das bedeutet, daß die Phosphorylierungen an "u" und "v" nach UVC-Bestrahlung von der Phosphorylierung an Ser 63/73 abhängen. Ein ähnliches Phänomen wurde im Bereich der DNA-Bindedomäne von c-Jun beobachtet: Mutation von Ser 243 hatte den Verlust aller Phosphorylierungen an den benachbarten Phosphorylierungsstellen zur Folge (Hagmeyer et al., 1993; vgl. auch Schema in Abb. 1C).

Interessanterweise schienen die Mutationen von Ser 63 und Ser 73 auch einen Einfluß auf den Phosphorylierungszustand der DNA-Binderegion zu haben (Abb. 1B; c-Jun (S1+S2)). Bereits in kontroll-behandelten Zellen,

konnte man das typische Muster ("a", "b" und "c") nicht mehr erkennen, was auf eine konstitutive Dephosphorylierung dieses Peptids hindeutete. Eine Bezeichnung der Phosphopeptide war nicht möglich; vermutlich handelte es sich jedoch um "b" und "c".

#### Lokalisation der UVC-spezifischen Phosphorylierungen

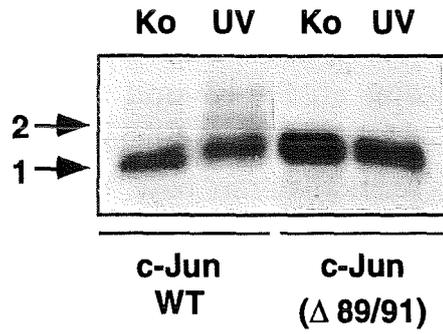
Um zu testen, ob eine Mutation im N-terminalen Bereich von c-Jun generell den Verlust der umliegenden Phosphorylierungen zur Folge hat, testete ich eine zusätzliche Mutante in dem beschriebenen transienten Expressionssystem (s. oben). Eine Deletion entfernt drei Threoninreste (AS 89 - 91) in unmittelbarer Nachbarschaft der Phosphorylierungsstellen Ser 63 und Ser 73. In diesem Experiment markierte ich die Zellen in Kultur simultan mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat. Dies erlaubte mir, exakt gleiche Mengen an Protein (=  $^{35}\text{S}$ -spezifische cpm) in der zweidimensionalen Peptidkartierung einzusetzen und die Veränderungen im Phosphorylierungszustand der Peptide besser zu quantifizieren.

In Abb. 2A ist zu sehen, daß die Deletion der drei Aminosäuren, ähnlich wie die Punktmutationen an Ser 63 und Ser 73, den Verlust der retardierten Isoformen von c-Jun nach UVC-Bestrahlung zur Folge hatte (c-Jun ( $\Delta$  89/91)). Die zwei-dimensionale Peptidkartierung zeigte allerdings, daß in c-Jun ( $\Delta$  89/91) die Peptide "x" und "y" noch deutlich zu sehen waren. Das Peptid "y" war bereits in nicht behandelten Zellen verstärkt phosphoryliert (Abb. 2B). Die Phosphorylierung war sogar stärker, als in c-Jun wt nach Bestrahlung mit UVC (vgl. quantitative Auswertung unterhalb und seitlich der Abbildung). Diese basale Phosphorylierung ließ sich durch UVC-Bestrahlung nicht mehr weiter steigern. Auch die Dephosphorylierung des Peptids "a" nach UV war nicht mehr sichtbar. In diesem Experiment war in unbehandelten Zellen bereits die Aufspaltung des Peptids "b" in "b + b'" zu erkennen. Dieser Effekt konnte öfters nach Überexpression von c-Jun beobachtet werden.

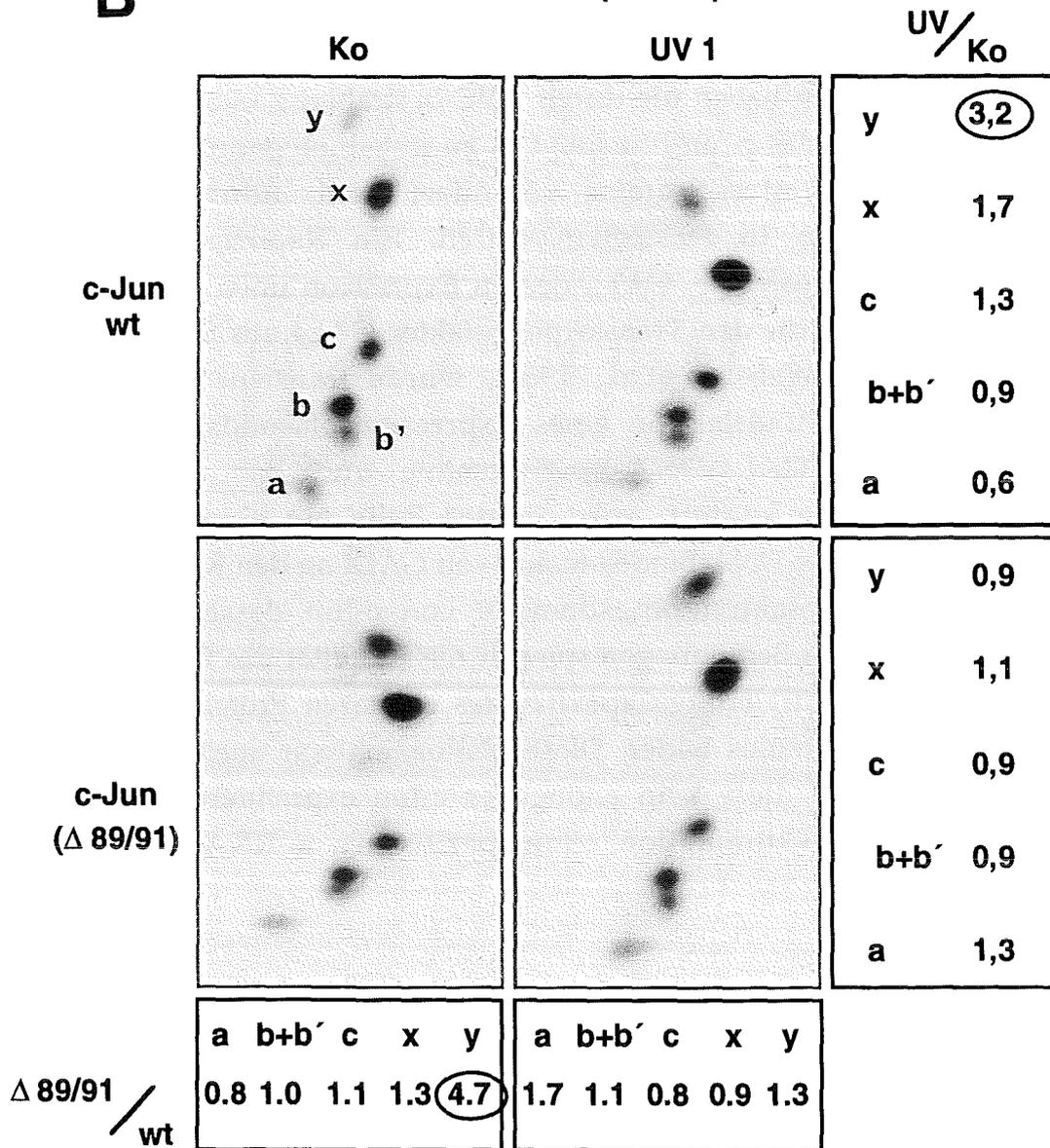
*Abb. 2 Phosphopeptidkartierung von c-Jun mit einer Deletion der Aminosäuren 89 bis 91*

- A. F9 Zellen wurden mit je 10  $\mu$ g pro Petrischale ( $\varnothing$  6 cm) RSV-c-Jun wt (c-Jun wt) bzw. CMV-c-Jun  $\Delta$ 89/91 (c-Jun  $\Delta$ 89/91) Expressionsplasmid transient transfiziert (Kalziumphosphat Methode). 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen in Kultur mit  $^{32}$ P-Orthophosphat (37 MBq/ml; 370 TBq/mmol) und  $^{35}$ S-Methionin (7 MBq/ml; 370 TBq/mmol) simultan markiert (3 h) und mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV) behandelt bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen. Nach 20 min wurden die c-Jun-Proteine durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper c-jun/AP-1 (Ab-1) isoliert, durch SDS-PAGE (10% AA-Bis) aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western Blot). Die Abbildung zeigt die Autoradiographie der Membran (16 h). Die Pfeile bezeichnen unterschiedliche Modifikationsformen von c-Jun.
- B. Die Proteine in A wurden einer zwei-dimensionalen Phosphopeptidkartierung unterzogen (vgl. Abb. 1). Die Abbildung zeigt Autoradiographien der  $^{32}$ P-spezifischen Signale. Pro DC-Platte wurden 1000  $^{35}$ S-spezifische cpm aufgetragen. Die  $^{32}$ P-spezifischen Signale wurden densitometrisch quantifiziert und die Verhältnisse der Intensitäten der Signale von UV-bestrahlten zu kontrollbehandelten (seitlich) und mutiertem c-Jun zu Wildtyp c-Jun (unterhalb) angegeben.

**A**



**B**



Das bedeutet, daß die Deletion der drei Threoninreste an Position 89, 90 und 91 zum Verlust der Phosphorylierungen an "u" und "v" führen, ohne jedoch die Phosphorylierung an Ser 63 und Ser 73 zu verhindern. Dies deutet darauf hin, daß die durch UVC induzierten Phosphorylierungen "u" und "v" in diesem Bereich lokalisieren bzw. vom Vorhandensein (einer) der drei Aminosäuren abhängen.

### Funktionelle Aktivierung des c-Jun-Proteins durch UVC

Welche Bedeutung haben die durch UVC-Bestrahlung induzierten Phosphorylierungen für das c-Jun-Protein? Um zu testen, ob dadurch tatsächlich die Aktivität des c-Jun-Proteins verändert wird, führte ich Transaktivierungsstudien in F9 Zellen durch. Ein Reporterogen (Chloramphenicolacetyltransferase, CAT), dessen Expression unter der Kontrolle zweier Bindestellen für den Transkriptionsfaktor GAL4 aus *Saccharomyces cerevisiae* steht (Webster et al., 1988), wurde transient in F9 Zellen transfiziert. Bei Kotransfektion eines Expressionsplasmids, das für ein Hybrid aus der GAL4-DNA-Bindedomäne und der c-Jun Transaktivierungsdomäne kodiert, wird in der Zelle ein chimäres Protein gebildet, das über die DNA-Bindedomäne von GAL4 an den Reporter bindet und über die Transaktivierungsdomäne von c-Jun dessen Expression steuert. Unter diesen Bedingungen spiegelt die Aktivität des CAT-Reporterenzym die Transaktivierungskapazität des chimären Proteins, und nicht eines endogenen Proteins wider. Diese Maßnahme war auch in F9 Zellen notwendig (obwohl diese kein endogenes c-Jun exprimieren), da UVC-Bestrahlung zur Akkumulation c-jun-spezifischer m-RNA führt (Auer et al., 1994).

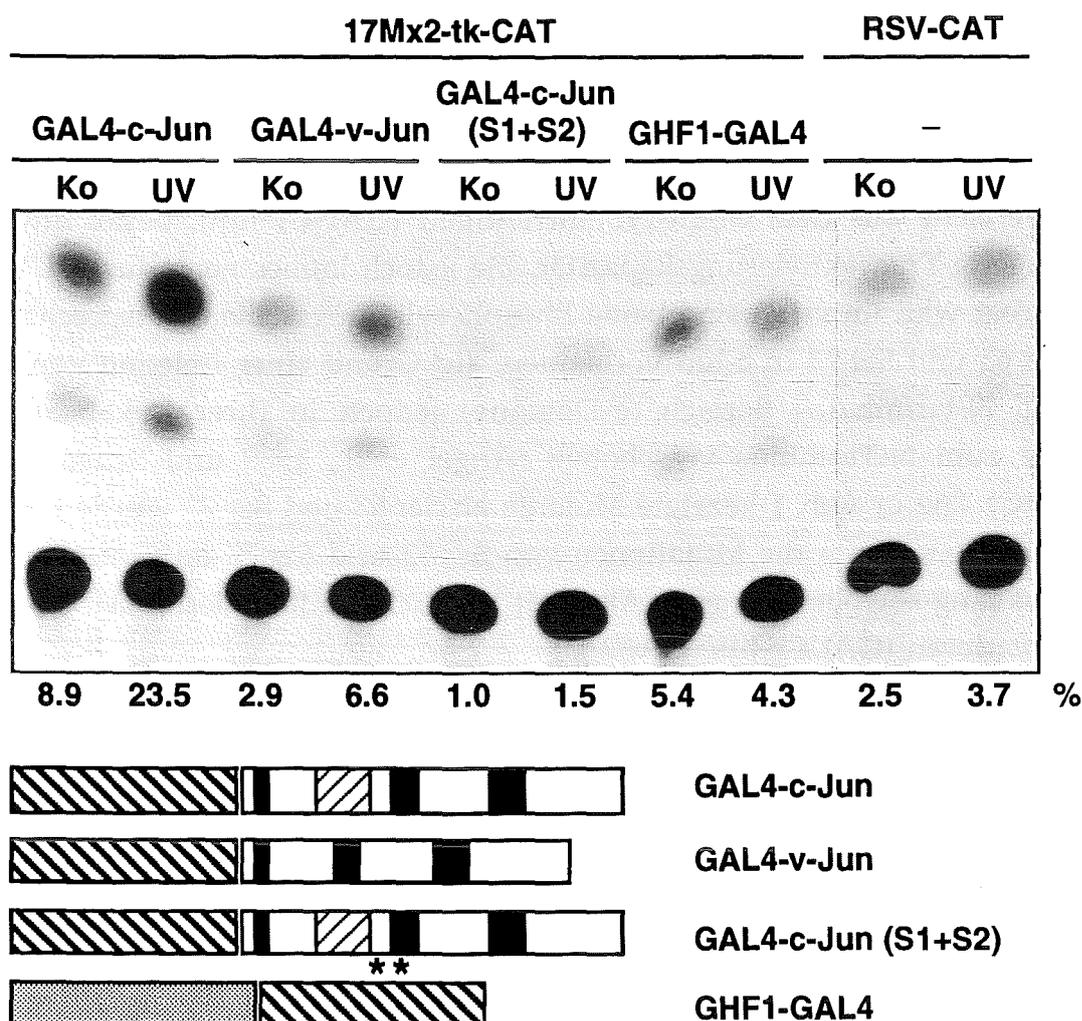


Abb. 3 Funktionelle Aktivierung des c-Jun-Proteins durch UVC

F9 Zellen wurden mit je 5 µg pro Petrischale (ø 9cm) des GAL4-abhängigen Reporterplasmids 17Mx2-tk-CAT (Webster et al., 1988) und je 2 µg der Expressionsplasmide für die angegebenen Fusionsproteine transient transfiziert (Kalziumphosphat Methode). Parallel dazu wurden Zellen mit je 2 µg pUC-RSV-CAT3 (RSV-CAT) Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>) behandelt (UV) oder der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko) und nach weiteren 24 h die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt. Die Umsetzung von Chloramphenicol zu acetyliertem Chloramphenicol ist in % angegeben.

Im unteren Teil der Abbildung ist eine schematische Darstellung der Fusionsproteine zu sehen. Dick gestreifte Kästchen stellen die DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (AS 1-147; Webster et al., 1988) dar. Die Darstellung der c-Jun-spezifischen Anteile von AS 1-166 des menschlichen c-Jun-Proteins erfolgte wie in Abb. 1C. Sternchen kennzeichnen die Lokalisation der Aminosäureaustausche an Ser 63 und Ser 73. Das gepunktete Kästchen repräsentiert Anteile des Transkriptionsfaktors GHF-1 von AS 1-139 (Theill et al., 1989).

Das GAL4-c-Jun Hybrid, das die ersten 166 Aminosäuren (AS) des c-Jun-Proteins und die DNA-Bindedomäne von GAL4 enthält (GAL4-c-Jun), zeigte basale Transaktivierung, die durch UVC-Bestrahlung der Zellen gesteigert werden konnte (Abb. 3). Ein Hybridprotein, das die entsprechenden Bereiche aus dem v-Jun-Protein enthielt (GAL4-v-Jun), besaß etwas verringerte Transaktivierungskapazität, die jedoch immer noch durch UVC steigerbar war. Im v-Jun sind beide Phosphorylierungsstellen, entsprechend zu Ser 63 und Ser 73 in c-Jun vorhanden, auf Grund einer Deletion von 26 AS im N-terminalen Bereich ( $\delta$ -Domäne) jedoch in ihrer Lokalisation relativ zum N-Terminus verschoben (Angel et al., 1989 und Schema in Abb. 1C). Die in Abb. 1 gezeigte Mutante an Ser 63 und Ser 73 wurde ebenfalls getestet. Durch die Mutationen von Ser 63 und Ser 73 im GAL4-c-Jun Hybrid ging sowohl die basale Aktivität als auch die Induzierbarkeit durch UVC verloren (GAL4-c-Jun (S1+S2)).

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Phosphorylierungen an Ser 63/73 das c-Jun-Protein funktionell aktivieren. Um auszuschließen, daß die UVC-Bestrahlung einen Einfluß auf die DNA-Bindekapazität der GAL4-DNA-Bindedomäne hat, wurde die Transaktivierungsdomäne eines anderen, zum c-Jun nicht verwandten Transkriptionsfaktors, mit der GAL4-Bindedomäne fusioniert. UVC-Bestrahlung hatte keinen Einfluß auf die Transaktivierung durch den Transkriptionsfaktor GHF-1 ("Growth Hormone Factor-1"; Lefevre et al., 1987) im GAL4-abhängigen Transkriptionsnachweis (Abb. 3, GHF1-GAL4). Darüberhinaus wurde auch die Expression des CAT-Gens, das unter der Kontrolle des "Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat" (RSV-LTR) steht, durch Bestrahlung der Zellen mit UVC nicht gesteigert (Abb. 3, RSV-CAT). Der RSV-LTR steuert die Expression aller gezeigten chimären Proteine. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß vermehrte Neusynthese der GAL4-Hybridproteine nach UVC-Bestrahlung für die Aktivierung des Reportergens verantwortlich war.

### UVC-induzierte Modifikation von Elk-1

Im folgenden wurde geprüft, ob auch das TCF-Protein Elk-1 nach UVC-Bestrahlung aktiviert wird. Elk-1 ist als Bestandteil des ternären Komplexes am SRE an der Regulation der c-fos Genexpression beteiligt (s. Einleitung). Da keine Antikörper zur Isolierung des Proteins durch Immunpräzipitation zur Verfügung standen, wurde Elk-1 auf Grund seiner Fähigkeit, sequenzspezifisch an DNA zu binden, nachgewiesen ("Electrophoretic Mobility Shift Assay"; "Bandshift" Analyse). Zwei unterschiedliche Ansätze führten zu identischen Resultaten: Die Bindung von Elk-1 im Komplex mit SRF an das c-fos-SRE (Daten nicht gezeigt) und die SRF-unabhängige Bindung von Elk-1 an eine Bindesequenz für das Ets-Protein E74 aus *Drosophila* (Urness und Thummel, 1990, s. unten). TCF-Proteine binden ebenfalls an diese Sequenz, im Gegensatz zu der SRE-Sequenz jedoch in Abwesenheit von SRF (Janknecht und Nordheim, 1992; Rao und Reddy, 1992). Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Raymund Zinck und Dr. Alfred Nordheim von der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach UVC-Bestrahlung wurden aus HeLa Zellen Kernextrakte präpariert (s. auch Zinck et al., 1993). Gleiche Mengen an Protein wurden mit dem <sup>32</sup>P-markierten, doppelsträngigen E74-Oligonukleotid inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Protein-E74 Komplexe und anschließender Autoradiographie waren 2 - 5 min nach UVC-Bestrahlung zusätzliche E74-Protein Komplexe zu erkennen (Abb. 4A, mit Sternchen markiert). Dieser Vorgang war transient, mit einem Maximum bei 10 min, und war 90 min nach Bestrahlung wieder beendet. Behandlung von Zellen mit epidermalemem Wachstumsfaktor (EGF) oder TPA induzierte die Ausbildung identischer Komplexe (s. auch Abb. 6A). Um die Identifizierung der spezifischen Komplexe von unspezifischen Interaktionen mit dem Oligonukleotid (nicht gezeigt) zu erleichtern, wurde in Abb. 4A auch Kernextrakt aus HeLa Zellen, die transient mit einem Expressionsplasmid für Elk-1 transfiziert wurden, mit dem E74-Oligonukleotid inkubiert.

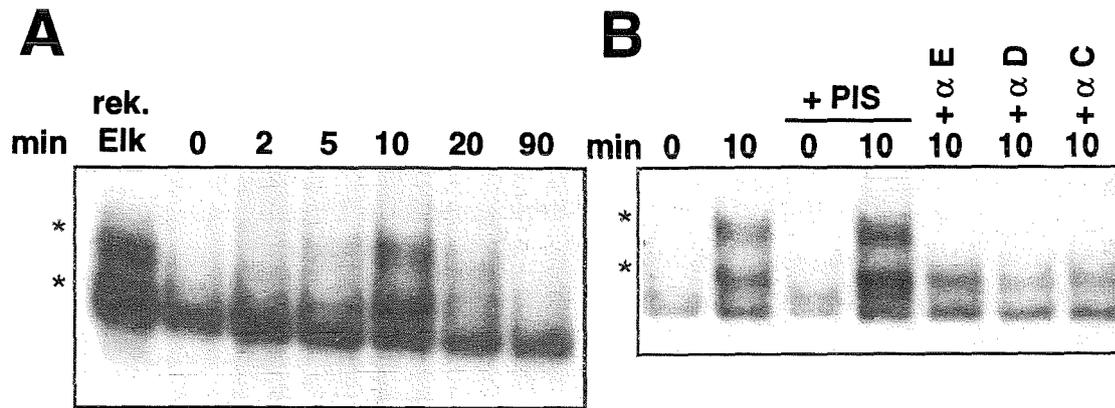


Abb.4 Modifikation und funktionelle Aktivierung von p62<sup>TCF</sup>/Elk-1

- A. HeLa Zellen wurden mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten Kernextrakte gewonnen (Zinck et al., 1993). 10 µg Protein jeder Probe wurden mit <sup>32</sup>P-markiertem E74-Oligonukleotid inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und die Protein-DNA Komplexe durch Autoradiographie sichtbar gemacht (exakt nach Zinck et al., 1993). Die Sternchen kennzeichnen induzierte Protein-DNA Komplexe. In der Spur "rek. Elk" sieht man Protein-E74 Komplexe, die mit Kernextrakt aus HeLa Zellen gewonnen wurden, die transient mit einem Expressionplasmid für Elk-1 transfiziert worden waren (Janknecht und Nordheim, 1992).
- B. Kernextrakte von UVC-behandelten HeLa Zellen (wie in A) wurden mit Prä-immunserum (PIS) bzw. drei verschiedenen Antiseren gegen Elk-1 (αE, αD, αC; Zinck et al., 1993) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proteinbindung an das E74-Oligonukleotid wie in A.

Man sieht, daß der unterste der Komplexe aus den UVC-behandelten HeLa Zellen mit dem transient expremierten Elk-1 komigrierte. Die induzierten Komplexe hatten jedoch eine andere elektrophoretische Mobilität, als das überexpremierte Elk-1 Protein. Die Natur des zusätzlichen Komplexes im Extrakt transfizierter Zellen ("rek. Elk") war nicht bekannt und dürfte auf die Überexpression des Proteins zurückzuführen sein.

Um sicher zu gehen, daß wirklich das Elk-1 Protein mit dem E74-Oligonukleotid interagiert, wurden die Extrakte der UVC-bestrahlten HeLa Zellen mit drei Antiseren, die gegen verschiedene Domänen von Elk-1 gerichtet sind, vorinkubiert (αE, αD, αC; Zinck et al., 1993). Alle drei Antiseren verhinderten spezifisch die Ausbildung des "obersten", induzierten Protein-DNA Komplexes (Abb. 4B). Dies stand im Gegensatz zu Befunden aus anderen Zellen, wo gezeigt wurde, daß die Antikörper die Ausbildung aller E74-gebundenen Komplexe verhinderten und daß die induzierte Ausbildung zusätzlicher Protein-DNA Komplexe (nach Behandlung mit

Wachstumsfaktoren oder Phorbolestern) hauptsächlich auf Phosphorylierung von Elk-1 zurückzuführen war (Zinck et al., 1993). Die Aktivierung endogener Phosphatasen (durch Entfernen von Ser/Thr- und Tyr-spezifischer Phosphataseinhibitoren) hatte das Verschwinden aller Komplexe am E74-Oligonukleotid in HeLa Zellen zur Folge (A. Nordheim, persönliche Mitteilung).

Demnach induziert UVC-Bestrahlung (und Behandlung mit EGF oder TPA) unter diesen experimentellen Bedingungen die schnelle Bindung von Elk-1 an das E74-Oligonukleotid. Diese beruht auf einem Aktivierungsmechanismus, der sehr wahrscheinlich durch Phosphorylierung von Elk-1 bewerkstelligt wird. Die Elk-1-spezifischen Antiseren verhindern nur die Ausbildung eines der Komplexe. Vermutlich handelt es sich bei den beiden anderen Komplexen um andere Proteine aus der TCF Familie (Treisman, 1994) oder um verschiedene Modifikationsformen eines dieser Proteine. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Antikörper nur eine bestimmte Modifikationsform von Elk-1 erkennen und die beiden durch die Antikörper nicht beeinflussten Komplexe ebenfalls Elk-1 enthalten. Da die drei Antiseren jedoch gegen drei verschiedene Bereiche des Elk-1-Proteins gerichtet sind, erscheint diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich.

#### Elk-1 ist notwendig für die UVC-induzierte Transkription vom SRE

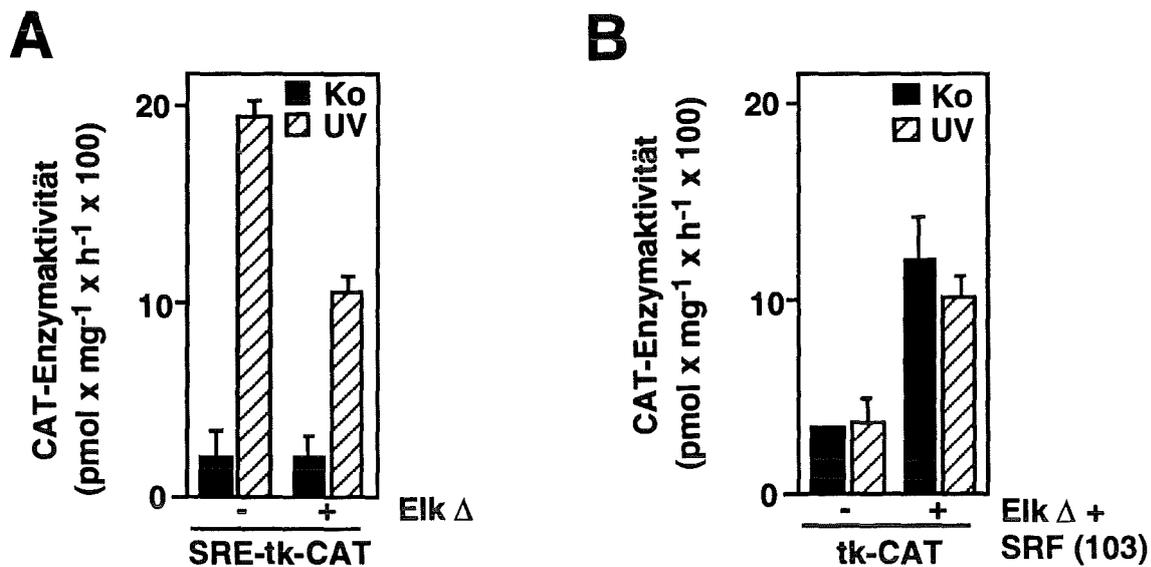
Um zu prüfen, ob die UVC-induzierten Veränderungen am Elk-1-Protein auch eine funktionelle Bedeutung haben, wurde die Aktivität des endogenen Proteins durch transiente Überexpression einer inaktiven Mutante von Elk-1 gehemmt (Janknecht et al., 1993).

Ein Reporterplasmid, das das CAT-Gen unter der Kontrolle zweier SRE-Elemente aus dem c-fos Promoter und des minimalen Promoters des Herpes simplex Thymidinkinase- (TK-) gens enthielt (SRE-tk-CAT), wurde transient in HeLa Zellen transfiziert. UVC-Bestrahlung steigerte die Expression dieses Reporters um das 8-fache (Abb. 5A). Um spezifisch die Wirkung von Elk-1 zu hemmen, wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid, das für ein verkürztes Elk-1-Protein kodiert (Elk  $\Delta$ ), kotransfiziert. Die Deletion entfernt 54 Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Proteins. Die betreffende Region enthält die Transktivierungsdomäne mit den Hauptphosphorylierungsstellen (Gille et al., 1992; Janknecht et al., 1993;

Marais et al., 1993). Das verkürzte Protein besitzt noch die Fähigkeit, an DNA zu binden (Janknecht und Nordheim, 1992) und wirkt, vermutlich über Verdrängung des endogenen Proteins, hemmend auf Elk-1-abhängige Transkription (dominant-negativer Effekt) (Janknecht et al., 1993). Expression des Elk  $\Delta$ -Proteins führte zu einer 50%-igen Hemmung der UVC-induzierten Expression des Reportergens (Abb. 5A). Eine nur teilweise Hemmung durch Elk  $\Delta$  schien plausibel, da Elk-1 nicht der einzige TCF in HeLa zu sein scheint (s. Abb. 4B) und da vermutlich SRF zur UVC-Induzierbarkeit des SRE's beiträgt (unveröffentlichte Daten). Eine Punktmutation im SRE, die die Bindung aller TCF-Faktoren verhindert, hatte dagegen den nahezu vollständigen Verlust der UVC-Induzierbarkeit des SRE-tk-CAT Reporters zur Folge (A. Radler-Pohl, unveröffentlicht), ein Hinweis, daß die Präsenz eines TCF absolut notwendig für SRE-abhängige Transkription nach UVC-Bestrahlung ist.

*Abb.5 Funktionelle Aktivierung von p62<sup>TCF</sup>/Elk-1*

- A. HeLa Zellen wurden mit 3  $\mu$ g pro Petrischale ( $\varnothing$  9 cm) des SRE-abhängigen Reporterplasmids (SRE-tk-CAT) transient transfiziert (DEAE-Dextran Methode). Zusätzlich erhielten die Zellen entweder 5  $\mu$ g des Expressionsvektors pElk<sub>2-374</sub> (Janknecht und Nordheim, 1992) (+ Elk  $\Delta$ ) oder des entsprechenden "leeren" Expressionsvektors pEv3S (Mathias et al., 1989) (- Elk  $\Delta$ ). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV) behandelt oder der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko) und nach weiteren 24 h die CAT-Enzymaktivität bestimmt. Die Säulen entsprechen Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.
- B. HeLa Zellen wurden mit 3  $\mu$ g tk-CAT Reporterplasmid, zusammen mit je 5  $\mu$ g pElk<sub>2-374</sub> und pSRF (Ala 103) (Janknecht et al, 1992), kotransfiziert (+ Elk  $\Delta$  + SRF (103)) bzw. erhielten gleiche Mengen an dem entsprechenden "leeren" Expressionsvektor pEv3S (- Elk  $\Delta$  + SRF (103)). Die Analyse der Expression des Reporterplasmids erfolgte wie in A.



Als Kontrolle, daß die Überexpression des trunktierten Elk-1-Proteins keinen unspezifischen inhibitorischen Effekt ausübt, wurde der Einfluß des dominant-negativen Elk  $\Delta$  auf die Expression eines CAT-Reporterkonstruktes untersucht, dessen Expression nur vom TK-Promoter (ohne SRE; tk-CAT) reguliert wurde (Abb. 5B). In den hier gezeigten Experimenten wurde zusätzlich zu Elk $\Delta$  auch ein Expressionsplasmid für ein mutiertes SRF kotransfiziert (SRF (Ala 103)). Dieses verstärkte die Hemmung der UV-induzierten Expression des SRE-tk-CAT Reporters durch Elk  $\Delta$  (Daten nicht gezeigt). Der tk-CAT Reporter zeigte eine vergleichbare Basalaktivität wie das SRE-tk-CAT Plasmid, die durch UVC-Bestrahlung nicht erhöht wurde. Die Koexpression der dominant-negativen Elk-1-Mutante und der SRF-Mutante führte erstaunlicherweise zu einem signifikanten Anstieg der Expression des tk-CAT Reporters. Dies würde bedeuten, daß Elk und/oder SRF oder auch endogenes c-Fos-Protein einen inhibitorischen Einfluß auf tk-abhängige Transkription hätten. Der beobachtete Befund unterstrich jedoch die Spezifität der hemmenden Wirkung der dominant-negativen Mutanten auf die SRE-abhängige Transkription.

Die bisher gezeigten Experimente dienten der Aufklärung der Mechanismen, wie UVC zur schnellen transkriptionellen Aktivierung der Gene c-fos und c-jun führt. Latent in der Zelle vorliegende Transkriptionsfaktoren werden durch UVC-Bestrahlung modifiziert und erlangen dadurch erhöhte Transaktivierungseigenschaften. Diese Experimente legen auch nahe, daß UVC modifizierende Enzyme (z. B. Proteinkinasen) aktivieren kann. Dies veranlaßte mich, die Mechanismen der UVC-induzierten Signaltransduktion zu den Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

### *Welche Proteinkinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1?*

In Kollaboration mit meiner Kollegin A. Radler-Pohl konnten Kinasen identifiziert werden, die die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1 nach UVC-Bestrahlung von Zellen phosphorylieren könnten. Der Großteil der dafür notwendigen Experimente wurde von Frau Radler-Pohl durchgeführt und die Resultate werden hier zum besseren Verständnis der nachfolgend gezeigten Daten zusammengefaßt.

UVC-Bestrahlung von HeLa Zellen aktiviert innerhalb von wenigen Minuten ERK-1 und ERK-2, zwei Vertreter der Familie der MAP Kinasen (s. Einleitung). Mehrere Veröffentlichungen zeigten, daß die Phosphorylierung von Elk-1 nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren und Phorbolestern sehr wahrscheinlich über die direkte Wirkung von ERK-Proteinen vermittelt wird (Marais et al., 1993; Janknecht et al., 1993). Ob ERK-Proteine auch direkt c-Jun phosphorylieren, ist nicht eindeutig geklärt (Pulverer et al., 1991; Minden et al., 1994). Die ERK-Aktivierung durch UVC ist zeitlich gesehen der Phosphorylierung von Elk-1 kurz vorgelagert und folgt einer ähnlichen Kinetik wie die Phosphorylierung von Elk-1. Ein deutlicher Hinweis für die funktionelle Rolle von ERK-Proteinen ist die Hemmbarkeit UVC-, wie auch phorbolster-induzierter Transkription vom c-fos Promoter durch die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von ERK-2 (Robbins et al., 1993). Schließlich wurde auch gezeigt, daß eine dominant-negative Mutante der Kinase c-Raf mit der UVC- und Phorbolster-induzierten Aktivierung von AP-1-abhängigen Reportergenkonstrukten interferiert.

Dies zeigt, daß UVC (und Phorbolster) eine Kinasekaskade aktiviert, die identisch mit der nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren oder Phorbolestern ist. c-Raf aktiviert über Phosphorylierung der MAP/ERK Kinase (MEK) die ERK-Kinasen (s. Einleitung), die ihrerseits, direkt oder indirekt, die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1 phosphorylieren können.

*Welche Komponenten der Zelle initiieren Raf/ERK-abhängige Signaltransduktion nach UVC-Bestrahlung?*

Durch die Identifizierung zytoplasmatischer Proteinkinasen, die an der UVC-Antwort beteiligt sind, war es gelungen, das UVC-induzierte "Signal" bis zur Zellmembran zurückzuverfolgen. Es ist bekannt, daß c-Raf über direkte Interaktion mit Ras-GTP zur Plasmamembran dirigiert und dort funktionell aktiviert wird (Leevers et al., 1994). Es war daher naheliegend zu prüfen, ob die Aktivierung des Ras-Proteins notwendig für die UVC- und phorbolster-induzierte Genexpression ist.

*UVC induziert, im Gegensatz zu Phorbolster, Ras-abhängige Signaltransduktion in HeLa Zellen*

In einem vergleichbaren Versuchsansatz wie für Elk-1 beschrieben (s. oben) wurde die Aktivität des endogenen Ras-Proteins durch transiente Überexpression einer dominant-negativen Mutante gehemmt. Ein Aminosäureaustausch an Stelle 17 des Ha-Ras-Proteins (Ser zu Asn) führt zu erhöhter Affinität des Proteins zu GDP. Bei Überexpression dieser Mutante kommt es vermutlich zur kompetitiven Verdrängung eines Nukleotid-Austauschfaktors vom endogenen Protein (Feig und Cooper, 1988). Dieser Austauschfaktor katalysiert die Beladung von Ras-GDP mit GTP (Downward et al., 1990a).

Unterschiedliche UVC-induzierbare Reporter-Genkonstrukte wurden mit der dominant-negativen Ras-Mutante in HeLa Zellen kotransfiziert und der Einfluß auf die induzierte Expression der Reporter untersucht. Zum einen verwendete ich ein CAT-Reporterplasmid, dessen Expression durch c-fos-spezifische Promotersequenzen von Position -711 bis +45 reguliert wird (-711/+45-fos-CAT). Zum anderen schloß ich in diese Untersuchungen auch zwei AP-1-abhängige Konstrukte ein: -517/+63-coll-CAT enthält Promotersequenzen des menschlichen Kollagenasegens und das 5xTRE-TATA-CAT Reporterplasmid besteht aus fünf Wiederholungen der AP-1 Bindestelle aus dem menschlichen Kollagenasegen-Promoter und der TATA-Box des Albumingens aus *Xenopus laevis* (Jonat et al., 1990). Das 5xTRE-Konstrukt bindet andere AP-1 Faktoren als die AP-1-Stelle im Kontext des Kollagenasepromoters und folgt einer schnellen Expressionskinetik nach Stimulierung von Zellen mit UVC oder Phorboltester (Radler-Pohl et al., 1993a; Auer, 1994). Das -517/+63-coll-CAT sollte als Beispiel für die verzögerte Genexpression nach UVC-Bestrahlung dienen, dessen effiziente Expression die Neusynthese von AP-1 (und anderen) Faktoren voraussetzt (s. Einleitung).

*Tabelle 1 Einfluß einer dominant-negativen Ras-Mutante auf induzierte Genexpression*

HeLa Zellen wurden mit je 5 µg pro Petrischale (ø 9 cm) der angegebenen CAT-Reporterplasmide transient transfiziert (DEAE-Dextran Methode). Zusätzlich erhielten die Zellen 5 µg des "leeren" Expressionsplasmids RSV-H20 (- H-ras (Asn 17)) oder 5 µg des Expressionsplasmids RSV-H-ras (Asn 17) (+ H-ras (Asn 17); DeVries-Smits et al., 1992). Wo gekennzeichnet, wurde jeweils 1 µg des Expressionsplasmids RSV-H-ras (Leu 61) kotransfiziert (H-ras (Leu 61); Bos, 1989). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV), TPA (60 ng/ml) bzw. EGF (2 ng/ml) und nach weiteren 24 h die Bestimmung der Aktivität des CAT-Reporterenzym (pmol azetyliertes <sup>14</sup>C-Chloramphenicol/mg x h). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je zwei unabhängigen Experimenten.

<b>Stimulus</b>	<b>- H-ras (Asn 17)</b>	<b>+ H-ras (Asn 17)</b>
<b><u>A. -711/+45 fos-CAT</u></b>		
Ko	340.3 (100%)	243.1 (71.4%)
UV	14768.1 (100%)	6990.3 (47.3%)
TPA	4268.1 (100%)	2955.6 (69.2%)
H-ras (Leu 61)	2838.9 (100%)	2654.2 (93.5%)
EGF	1040.3 (100%)	350.0 (33.6%)
<b><u>B. -517/+63 coll-CAT</u></b>		
Ko	135.7 (100%)	113.8 (83.9%)
UV	789.0 (100%)	113.8 (14.4%)
TPA	93070.9 (100%)	54570.9 (58.6%)
H-ras (Leu 61)	21875.0 (100%)	15575.0 (71.2%)
<b><u>C. 5 x TRE-TATA-CAT</u></b>		
Ko	3251.1 (100%)	750.6 (23.1%)
UV	21124.5 (100%)	4262.2 (20.2%)
TPA	187162.5 (100%)	127575.0 (68.2%)
H-ras (Leu 61)	41650.0 (100%)	44450.0 (106.7%)

In Tabelle 1 wurden die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefaßt. Für alle drei Reporter galt: (a) Die UVC-induzierte Expression der Reporter war in Gegenwart der dominant-negativen Ras-Mutante (+ Ha-ras (Asn 17)) deutlich gehemmt. Die Inhibition der beiden AP-1-abhängigen Reporter (-517/+63; 5xTRE) war am effizientesten, die Aktivität des c-fos Promoters wurde zu ca. 50% gehemmt. Das 5xTRE-TATA-CAT Konstrukt zeigte, im Gegensatz zu den beiden Reportern, die durch komplexe Promotoren reguliert wurden, eine hohe Basalexpression, die durch die Ras-Mutante stark hemmbar war. (b) Die TPA-induzierte Expression der Reporter war deutlich weniger gehemmt als die UVC-induzierte Expression. Dies stand im Übereinklang mit Befunden, daß in HeLa Zellen phorbolster-abhängige Signaltransduktion unabhängig von Ras funktioniert (Medema et al., 1991), im Gegensatz zu z. B. PC 12 Pheochromozytom Zellen (Thomas et al., 1992) oder T-Lymphozyten (Downward et al., 1990b). (c) Kotransfektion eines

Expressionplasmids für aktiviertes Ras (Ha-ras (Leu 61)) führte zu einer starken Aktivierung der Reporter, die durch die Gegenwart der dominant-negativen Ras-Mutante nicht, oder nur marginal, gehemmt wurde. Dies galt als negative Kontrolle, da das aktivierte Ras-Protein überwiegend in der GTP-beladenen Form vorliegt, deshalb unabhängig von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren ist und durch die Mutante nicht beeinflußt werden sollte (s. auch Medema et al., 1991). Als positive Kontrolle für die Wirkung der dominant-negativen Ras-Mutante wurde die Expression des -711/+45-fos-CAT Reportergens durch EGF-Behandlung der Zellen induziert. Diese Aktivierung war durch die Ras-Mutante hemmbar. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigten die Aktivierung des Ras-Proteins durch EGF (z.B. Buday und Downward, 1993).

Diese Experimente zeigen, daß UVC die Ras-abhängige Signaltransduktion zu verschiedenen Promotoren induzieren kann. Diese beinhalten sowohl "frühe" Promotoren, die überwiegend durch Modifikation präexistierender Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (c-fos, c-jun, 5xTRE), als auch "späte" Promotoren, für deren effiziente Aktivierung Neusynthese von Transkriptionsfaktoren notwendig ist (Kollagenase). Die Hemmung von UVC-induzierter Signaltransduktion durch die dominant-negative Ras-Mutante macht darüber hinaus deutlich, daß auch das Ras-Protein nicht direkt durch UVC aktiviert wird, sondern daß das "Signal" zum Ras transportiert werden muß (z.B. über Aktivierung eines Guanin-Nukleotidaustauschfaktors).

### *Wie aktiviert UVC das Ras-Protein?*

Zahlreiche Studien zur Regulation und Funktion von Ras zeigen die zentrale Rolle dieses Proteins in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren, insbesondere Rezeptor-Tyrosinkinase (s. Übersichtsartikel Schlessinger, 1993). Durch Bindung an Rezeptoren aktivieren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren das membranständige Ras-Protein. Es stellte sich also die interessante Frage, ob auch im Falle von UVC-Bestrahlung Rezeptoren in einen aktivierten Zustand überführt werden, ähnlich wie nach Bindung ihres Liganden. Zwei Mechanismen für diesen Vorgang sind denkbar: UVC induziert die Mobilisierung und Bindung von Liganden

an die Rezeptoren oder die Bestrahlung selbst führt zu einer ligandenunabhängigen, aktivierenden Konformationsänderung von Rezeptoren.

Ich wählte unterschiedliche Ansätze, um eine Beteiligung von Rezeptoren an der UVC-induzierten Signaltransduktion zu untersuchen. Alle zielten darauf ab, die Aktivität von Rezeptoren zu hemmen und den Einfluß dieser Behandlungen auf die Reaktionen der Zelle nach Bestrahlung mit UVC zu testen. Ein experimenteller Ansatz nützte die Eigenschaft von Liganden aus, nach Bindung an ihre Rezeptoren den spezifischen, rezeptor-abhängigen Signaltransduktionsweg transient zu hemmen. Parallel dazu ging ich der Frage nach, ob sezernierte Liganden an der UVC-Antwort beteiligt sind. Dazu bediente ich mich spezifischer und unspezifischer Hemmer der Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren.

#### Vorbehandlung von Zellen mit IL-1 $\alpha$ , EGF und bFGF hemmt eine nachfolgende UVC-Antwort

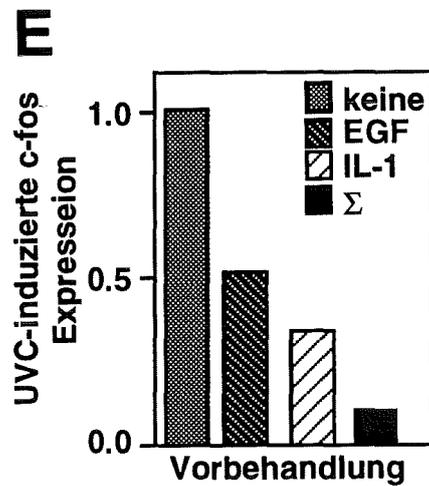
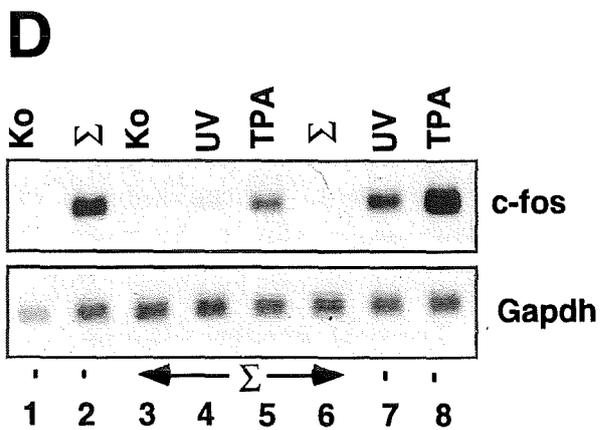
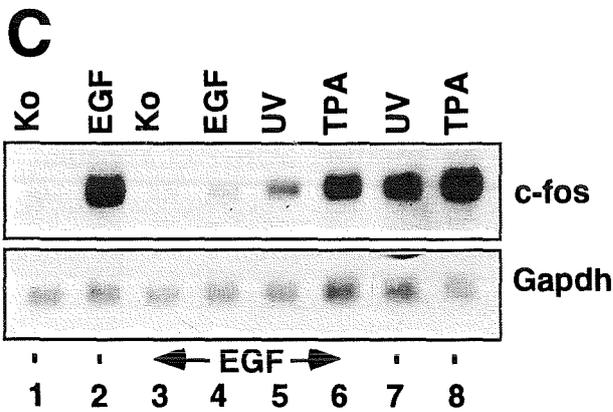
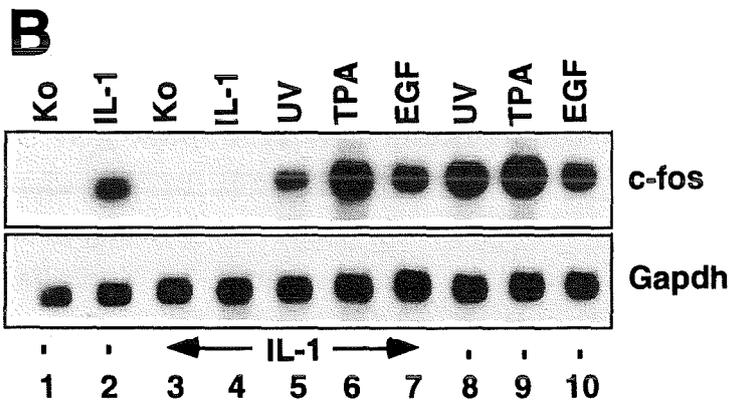
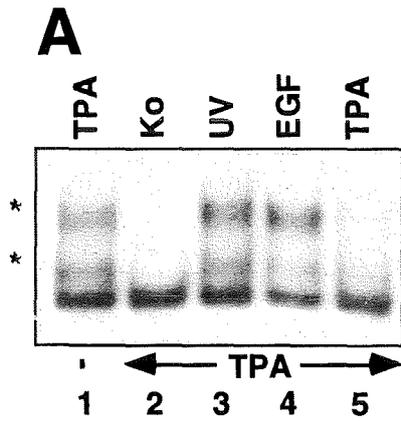
Eine Möglichkeit der transienten Inaktivierung rezeptor-abhängiger Signaltransduktion ist die Vorbehandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren. Der Bindung an den Rezeptor folgt die Internalisierung und in den meisten Fällen Degradation des Rezeptor-Liganden Komplex (Stoscheck und Carpenter, 1984; Downing et al., 1989). Die Zellen können erst dann wieder auf den gleichen Liganden reagieren, wenn die Rezeptoren resynthetisiert wurden. Es sollte also möglich sein, durch Vorbehandlung mit einem Wachstumsfaktor zu testen, ob UVC den Rezeptor zur Signaltransduktion benötigt. Dazu muß die zu messende Antwort der Zelle transient sein, um eine wiederholte Aktivierung testen zu können. Diese Voraussetzung erfüllt die c-fos m-RNA Akkumulation oder die Modifikation von Elk-1. Ich wählte Wachstumsfaktoren, die, ähnlich wie UVC, diese schnellen Reaktionen in HeLa Zellen hervorrufen. Interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) erfüllen diese Voraussetzungen und werden nach UVC-Bestrahlung von HeLa Zellen verstärkt synthetisiert und sezerniert (s. unten). (Im folgenden wird auch das Zytokin IL-1 $\alpha$  in dem Begriff Wachstumsfaktor miteingeschlossen werden!). Auch EGF ruft vergleichbare Reaktionen der Zelle hervor wie UVC und ein Ligand für den EGF-Rezeptor (TGF $\alpha$ ) wird ebenfalls nach UVC-Bestrahlung verstärkt synthetisiert (Ellem et al., 1988). Dagegen eigneten sich z. B. PDGF

oder Insulin nicht für diese Versuche, da sie in HeLa Zellen keine der genannten Reaktionen hervorrufen. Als Kontrolle behandelte ich die Zellen auch mit dem Phorbolster TPA vor. Dies sollte über Inaktivierung von PKC zur Hemmung einer nachfolgenden Stimulierung führen, die von funktioneller PKC abhängig ist.

In Abb. 6A ist zu sehen, daß eine 10-minütige Behandlung von HeLa Zellen mit TPA, ähnlich wie UVC, zur Ausbildung der bereits gezeigten induzierbaren Bindung von Elk-1 an das E74-Oligonukleotid führte (vgl. Abb. 4), die nach 24 h nicht mehr erkennbar war (Abb. 6A, Spuren 1 und 2). Eine wiederholte Stimulierung mit TPA nach 24 h war nicht mehr möglich (Spur 5). Hingegen war die Induktion der Komplexe durch UVC oder EGF immer noch effizient (Spuren 3 und 4). Dies zeigte, daß weder UVC noch EGF die durch TPA Behandlung inaktivierte Komponente (Proteinkinase C; s. Einleitung) benötigen.

*Abb. 6 Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren hemmt eine nachfolgende UVC-Antwort in HeLa Zellen*

- A. HeLa Zellen wurden für 24 h mit TPA (60 ng/ml in Hungermedium; s. auch Behandlung von Zellen) behandelt oder nicht (-), wie unterhalb der Abbildung gezeigt. Es folgte eine zweite Behandlung für weitere 10 min mit TPA, UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV) bzw. EGF (2 ng/ml) (s. oberhalb der Abbildung). Anschließend wurden Kernextrakte präpariert und die Ausbildung von Proteinkomplexen am E74-Oligonukleotid, wie in Abb. 4A beschrieben, analysiert. Sternchen kennzeichnen induzierte Protein-DNA Komplexe.
- B. HeLa Zellen wurden für 3 h mit IL-1 $\alpha$  (2 ng/ml; Fa. Brit. Biotechnol.) vorbehandelt (IL-1) oder nicht (-) (s. unterhalb der Abbildung). Anschließend wurden die Zellen für weitere 45 min mit IL-1 $\alpha$ , UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV), TPA (60 ng/ml) oder EGF (2 ng/ml) behandelt, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko) (s. oberhalb der Abbildung). Aus den Zellen wurde poly A<sup>+</sup> RNA isoliert und jeweils 4  $\mu$ g RNA pro Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Menge an c-fos- und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (Gapdh-) spezifischer RNA wurde durch Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markierten, spezifischen c-DNA Proben ermittelt (Northern Blot Analyse). Die Abbildung zeigt Autoradiographien der hybridisierten Filter (16 h für c-fos; 4 h für Gapdh).
- C. Das Experiment wurde genau wie in B beschrieben durchgeführt, nur daß EGF (2 ng/ml) zur Vorbehandlung der Zellen verwendet wurde (Beschriftung der Abbildung wie in B).
- D. Das Experiment wurde genau wie in B beschrieben durchgeführt, nur daß eine Mischung aus IL-1 $\alpha$  (2 ng/ml; Fa. Brit. Biotechnol.), EGF (2 ng/ml) und bFGF (10 ng/ml) zur Vorbehandlung der Zellen verwendet wurde ( $\Sigma$ ) (Beschriftung der Abbildung wie in B).
- E. Densitometrische Auswertung der Experimente in B, C und D. Die c-fos-spezifischen Signale wurden an unterschiedliche Mengen aufgetrennter m-RNA angeglichen (gemessen anhand der Gapdh-spezifischen Signale). Die Menge an c-fos-spezifischer m-RNA in UVC-stimulierten Zellen (ohne Wachstumsfaktorvorbehandlung) wurde als 1.0 gewählt.



Im folgenden wurden HeLa Zellen mit den oben genannten Wachstumsfaktoren vorbehandelt und nach drei Stunden die Fähigkeit, auf UVC-Bestrahlung mit der Expression des c-fos Gens zu reagieren, getestet (die Bestimmung der Menge c-fos-spezifischer m-RNA erlaubte eine bessere quantitative Auswertung als z. B. die Bestimmung der Phosphorylierung von Elk-1).

Eine Auswahl der Experimente ist in Abb. 6B - E dargestellt: Nach Behandlung von HeLa Zellen mit IL-1 $\alpha$  war innerhalb von 45 min die Menge an c-fos-spezifischer m-RNA maximal, und innerhalb von 3 h auf Kontrollniveau abgesunken (s. Abb. 6B, Spuren 1, 2 und 3). Eine wiederholte Stimulierung durch IL-1 $\alpha$  nach der drei-stündigen Vorbehandlung war nicht möglich (Spur 4); der IL-1 $\alpha$ -spezifische Signaltransduktionsweg war also vollkommen refraktär. Die Wirkung von TPA- oder EGF zum selben Zeitpunkt war jedoch genauso effizient wie ohne IL-1 $\alpha$ -Vorbehandlung (vgl. Spuren 6 und 7 mit 9 und 10). Entscheidend war jedoch, daß die UVC-induzierte c-fos m-RNA Akkumulation nach einer IL-1 $\alpha$  Vorbehandlung um mehr als 50% reduziert war im Vergleich zur Situation ohne Vorbehandlung (vgl. Spuren 5 und 8 und quantitative Auswertung in E). Das bedeutete, daß IL-1 $\alpha$  und UVC gemeinsame Komponenten der Signaltransduktion zum c-fos Gen benützen, die von TPA oder EGF nicht benötigt werden (höchstwahrscheinlich der IL-1-Rezeptor).

Ähnliche Resultate wurden nach Vorbehandlung von HeLa Zellen mit bFGF (Daten nicht gezeigt) und EGF erzielt (Abb. 6C). Vergleichbar mit IL-1 $\alpha$  bewirkte EGF eine schnelle und transiente Akkumulation c-fos-spezifischer m-RNA (Spuren 1, 2 und 3). Eine erneute Stimulierung mit EGF nach 3 h war unmöglich (Spur 4). Wiederum war die UVC-induzierte c-fos-Genexpression, nach der EGF-Vorbehandlung halbmaximal gehemmt (vgl. Spuren 5 und 7). Unter denselben Bedingungen war jedoch auch die TPA-induzierte c-fos Expression gehemmt (Spuren 6 und 8). Dieser Effekt von EGF auf phorbolster-induzierte Genexpression dürfte auf der EGF-abhängigen Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  am EGF-Rezeptor beruhen, die ihrerseits zur Aktivierung der Proteinkinase C führen kann (Cochet et al., 1984; Margolis et al., 1989). Wie bereits gezeigt wurde, bestand jedoch kein Hinweis darauf, daß auch UVC die Proteinkinase C benötigt (Abb. 6A). Die EGF-induzierte Hemmung der UVC-Antwort beruhte demnach sehr wahrscheinlich auf einem anderen Mechanismus (s. unten).

Diese Experimente deuteten darauf hin, daß UVC über mehrere verschiedene wachstumsfaktor-spezifische Komponenten signalisiert. Daher wurde getestet, ob eine kombinierte Vorbehandlung mit IL-1 $\alpha$ , bFGF und EGF zu einer noch effizienteren Hemmung der UV-Antwort in HeLa Zellen führt, als die einzelnen Faktoren. Dies war tatsächlich auch der Fall! Bemerkenswerterweise wurde die UVC-induzierte c-fos Expression durch die Wachstumsfaktor-Vorbehandlung zu 90% gehemmt (Abb. 6D, Bahnen 4 und 7 und quantitative Auswertung in Abb. 6E). Die TPA-induzierte c-fos-Genexpression war im selben Maß gehemmt, wie durch EGF alleine (vgl. Bahnen 5 und 8 und s. C); dieser Effekt dürfte also alleine auf EGF im Wachstumsfaktorgemisch zurückzuführen sein (s. oben).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Vorbehandlung von HeLa Zellen mit Wachstumsfaktoren UVC-induzierte Signaltransduktion hemmt. Für zwei Faktoren (IL-1 $\alpha$  und EGF) wurde gezeigt, daß diese sich gegenseitig nicht beeinflussen (Abb. 6B), obwohl sie identische Reaktionen der Zelle hervorrufen (Expression des c-fos Gens; Aktivierung von MAP Kinasen, Modifikation von c-Jun; s. auch weiter unten). Das läßt darauf schließen, daß die Komponenten, die durch die Vorbehandlung mit den Faktoren inaktiviert werden, am Beginn beider Signalwege liegen, bevor diese konvergieren. Aufgrund der bekannten Tatsache, daß Liganden zur transienten Inaktivierung ihrer Rezeptoren führen können (s. Einleitung), kann postuliert werden, daß Wachstumsfaktor-Rezeptoren zur Initiation UVC-abhängiger Signaltransduktion notwendig sind.

#### IL-1 $\alpha$ - und UVC-induzierte Phosphorylierung von c-Jun ist identisch

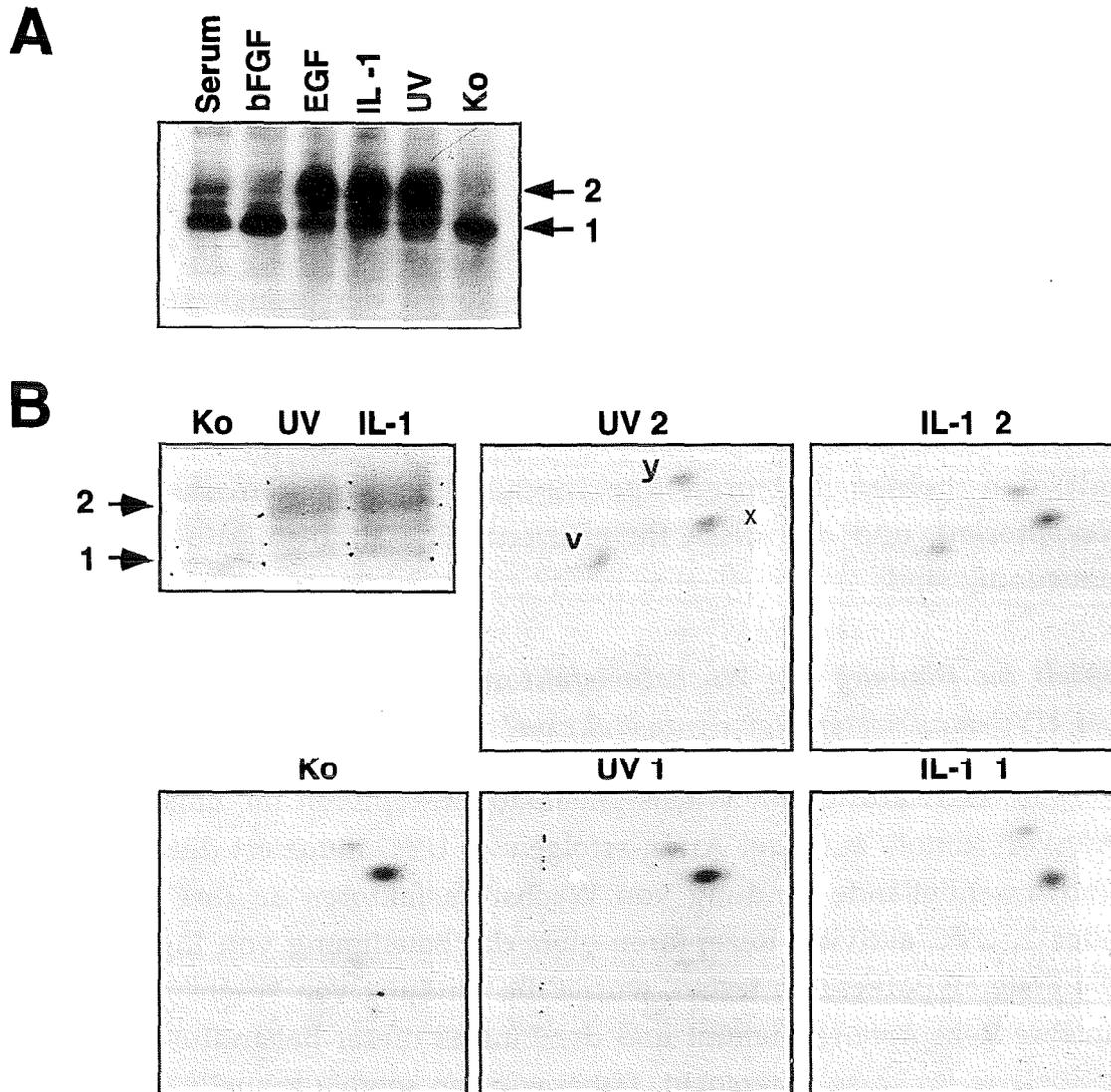
Sollten die Signaltransduktionswege der oben genannten Wachstumsfaktoren wirklich identisch zu UVC sein, müßten diese Reaktionen der Zelle, die spezifisch für UVC sind, hervorrufen können. Hierfür untersuchte ich die Phosphorylierungen am c-Jun-Protein (vgl. Abb. 1). Zur Erinnerung: UVC-Bestrahlung induziert zusätzliche Phosphorylierungen am c-Jun, die weder in HeLa noch in F9 Zellen durch Phorbolster hervorgerufen werden.

Tatsächlich führte die Behandlung von HeLa Zellen mit IL-1 $\alpha$  und EGF zu der sehr effizienten Modifikation von c-Jun, die ununterscheidbar von derjenigen durch UVC war (s. Abb. 7 und vgl. mit Abb. 1A und B). Die

Behandlung mit beiden Wachstumsfaktoren resultierte in der charakteristischen Verlangsamung des c-Jun-Proteins in der Elektrophorese, die indikativ für zusätzliche Phosphorylierungen am c-Jun-Protein ist (vgl. Abb. 1). Die zwei-dimensionale Phosphopeptidkartierung bestätigte die Übereinstimmung in der Phosphorylierung an den Peptiden "x", "y" und "v" nach UVC- und IL-1 $\alpha$ -Behandlung von HeLa Zellen (Abb. 7B). Die Phosphorylierung der Peptide "x" und "y" durch die Behandlung der Zellen war jedoch weniger prägnant als in Abb. 1 gezeigt (allerdings handelte es sich dort um F9 Zellen). Das Verhältnis der Phosphorylierung von "x" und "y" zu "a", "b" und "c" war in stimulierten Zellen größer, als in kontrollbehandelten Zellen. Dies hatte, analog zu Abb. 1B, eine erhöhte Phosphorylierung im Bereich der Transaktivierungsdomänen im Vergleich zur DNA-Bindedomäne zur Folge. Die Analyse der retardierten Banden ("UV 2", "IL-1 2") zeigte eindeutig zusätzliche Phosphorylierung eines Peptids, das (willkürlich) mit "v" bezeichnet wurde.

*Abb. 7 Modifikation von c-Jun durch Wachstumsfaktoren und UVC*

- A. HeLa Zellen wurden für 3 h mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat (12MBq/ml; 370 TBq/mmol) und  $^{35}\text{S}$ -Methionin (3.7 MBq/ml; 370 TBq/mmol) simultan markiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit UVC (30 J/m $^2$ ; UV), IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml; Fa. Brit. Biotechnol.), EGF (10 ng/ml), bFGF (50 ng/ml) und FCS (20%; Serum) bzw. die Kontrollbehandlung (Ko) für weitere 20 min. c-Jun-Protein wurde durch Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Antikörper c-jun/AP-1 (Ab-1) (0.5  $\mu\text{g}$ /Probe) isoliert, mittels SDS-PAGE (10% AA-Bis) aufgetrennt, auf NZ-Membran übertragen (Western Blot) und durch Autoradiographie (16 h) sichtbar gemacht. Die Pfeile kennzeichnen unterschiedlich modifizierte Formen des c-Jun-Proteins.



- B. HeLa Zellen wurden für 2,5 h mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat (18,5 MBq/ml; 370 TBq/mmol) in Kultur markiert und anschließend einer Behandlung mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV) bzw. IL-1 $\alpha$  (30 ng/ml; Fa. Biogen) für weitere 20 min unterzogen. c-Jun-Protein wurde wie in A. beschrieben isoliert und auf NZ-Membran übertragen. Die Autoradiographie der NZ-Membran (16 h) ist links oben zu sehen. Die mit den Pfeilen (1, 2) gekennzeichneten Proteine wurden mit Trypsin gespalten, die resultierenden Peptide zwei-dimensional aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (2 Wochen; zwischen 30 und 130 Cherenkow-cpm  $^{32}\text{P}$  wurden pro Probe aufgetrennt).

c-Jun aus bFGF- oder Serum-behandelten (und TPA-behandelten, Daten nicht gezeigt) HeLa Zellen zeigte kein oder nur sehr schwach verändertes Laufverhalten in der Elektrophorese (Abb. 7A), obwohl die verwendeten Konzentrationen ausreichend für effiziente Geninduktion waren (s. Abb 6 und Daten nicht gezeigt).

Diese Experimente machen deutlich, daß zumindest zwei Wachstumsfaktoren, IL-1 $\alpha$  und EGF, identische Reaktionen wie UVC in HeLa Zellen hervorrufen können. Trotz der Ähnlichkeiten der Signaltransduktionen beider Faktoren beeinflussen diese sich gegenseitig nicht in den Refraktori-tätsexperimenten (Abb. 6). Beide hemmen aber eine nachfolgende UVC-Antwort (Abb. 6). Dies unterstützt die Hypothese, daß die Vorbehandlung mit den beiden Faktoren spezifische Komponenten inhibiert (die Rezeptoren), und daß diese für effiziente Signaltransduktion nach UVC notwendig sind.

### *Spielt die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren eine Rolle bei UVC-induzierter Signaltransduktion?*

Eine Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren im Zuge der UVC-Antwort könnte auf zwei Arten erfolgen: 1. UVC induziert die Freisetzung und anschließende Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren oder 2. UVC aktiviert Rezeptoren ohne die Beteiligung von Liganden. Um die erste Hypothese zu testen, wurde die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren gehemmt und der Einfluß dieser Behandlung auf UVC-induzierte Prozesse untersucht. Dabei wurden sowohl schnelle (c-fos/c-jun-Genexpression, Modifikation von Transkriptionsfaktoren), als auch späte Reaktionen (Expression des Kollagenasegens) auf UVC-Bestrahlung gemessen.

### *IL-1 $\alpha$ und bFGF sind funktionelle Komponenten der UVC-induzierten Kollagenase-Genexpression in HeLa Zellen*

IL-1 $\alpha$  und bFGF sind UVC-induzierbare Wachstumsfaktoren in HeLa Zellen und können mehrere Stunden nach UVC-Bestrahlung im Zellkulturmedium nachgewiesen werden (Krämer et al., 1993). Beide Wachstumsfaktoren sind dafür verantwortlich, daß die Behandlung von Fibroblasten mit konditioniertem Zellkulturmedium, das 48 h nach UVC-

Bestrahlung von Zellen gewonnen wurde, Expression des Kollagenasegens (und anderer Gene) bewirkt (Schorpp et al., 1984; Rotem et al., 1987; Krämer et al., 1993).

Um zu überprüfen, ob die sezernierten Faktoren IL-1 $\alpha$  und bFGF an dieser Genexpression auch funktionell beteiligt sind, untersuchte ich die Wirkung neutralisierender Antikörper gegen beide Faktoren auf die UVC-induzierte Kollagenaseexpression (Abb. 8). Unmittelbar nach UVC-Bestrahlung von HeLa Zellen setzte ich dem Zellkulturmedium Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  und bFGF zu. Durch diese Behandlung wurde die Menge der UVC-induzierten, kollagenase-spezifischen m-RNA um 70% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert (s. Abb. 8A, Spuren 2 und 3 und quantitative Auswertung in C). Dieser Effekt trat nicht auf, wenn dem Medium statt der Antikörper unspezifisches Kaninchenserum zugesetzt wurde (Abb. 8A, Spur 4). Erwartungsgemäß hemmten die Antikörper die Expression des Kollagenasegens nach Behandlung der Zellen mit IL-1 $\alpha$  und bFGF vollständig (vgl. Spuren 5 und 6 und quantitative Auswertung in Abb. 8C).

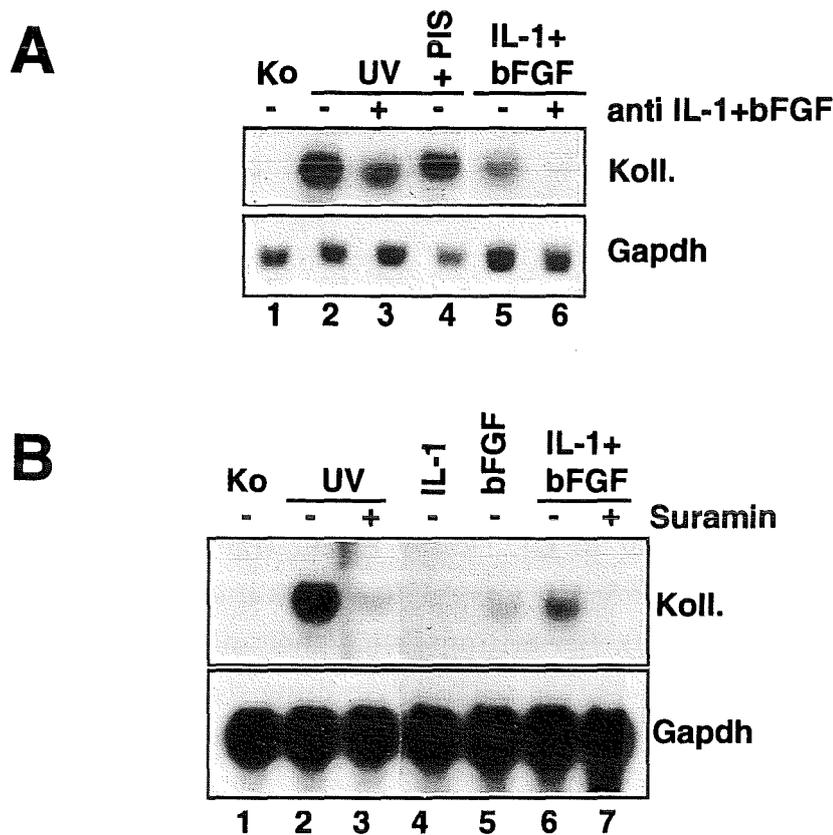


Abb. 8 IL-1 $\alpha$  und bFGF sind funktionelle Komponenten der "späten" UVC-Antwort in HeLa Zellen

- A. HeLa Zellen wurden mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt (UV) bzw. einer Kontrollbehandlung unterzogen (andere). Das ursprüngliche Zellkulturmedium (s. Kapitel Behandlung von Zellen) wurde anschließend gegen DMEM + 50  $\mu$ g/ml Rinder-Serumalbumin (BSA) ausgetauscht. Wo gekennzeichnet (+) wurden dem Medium Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  (2.5  $\mu$ l/ml Antiserum; Fa. Biogen) und gegen bFGF (20  $\mu$ g/ml) (anti IL-1 + bFGF) bzw. Präimmenserum aus Kaninchen (2.5  $\mu$ l/ml; PIS) zugesetzt. Gleich anschließend wurde, wo angegeben, den Schalen IL-1 $\alpha$  (30 ng/ml; Fa. Biogen) und bFGF (0.5 ng/ml) zugegeben (IL-1 + bFGF). 24 h (Ko, UV) bzw. 8 h (IL-1 + bFGF) nach den Behandlungen wurde die Menge an Kollagenase- (Koll.) und Gapdh-spezifischer m-RNA durch Northern Blot Analyse bestimmt. Die Dauer der Autoradiographien betragen 24 h (Kollagenase) bzw. 5 h (Gapdh).
- B. HeLa Zellen wurden mit UVC bestrahlt (30 J/m<sup>2</sup>; UV) bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (andere). Das ursprüngliche Zellkulturmedium (s. Kapitel Behandlung von Zellen) wurde anschließend gegen DMEM + 50  $\mu$ g/ml Rinder-Serumalbumin (BSA) ausgetauscht und mit Suramin (0.3 mM) versetzt (+) oder nicht (-). Anschließend wurde dem Medium, wie in der Abbildung gezeigt, IL-1 $\alpha$  (30 ng/ml; Fa. Biogen; IL-1), bFGF (2.5 ng/ml) oder beide Faktoren zusammen zugesetzt. 24 h (Ko, UV) bzw. 8 h (andere) nach den Behandlungen wurde die Menge an Kollagenase- und Gapdh-spezifischer m-RNA durch Northern Blot Analyse bestimmt (wie in A).

Parallel dazu wurde die Wirkung des generellen Rezeptorinhibitors Suramin auf die UVC-induzierte Kollagenaseexpression getestet. Suramin lagert sich an Proteine der Zelloberfläche an und verhindert dadurch die Bindung von Liganden an ihre Rezeptoren (Betsholtz et al., 1986). Die unmittelbare Zugabe von Suramin zum Zellkulturmedium nach UVC-Bestrahlung verhinderte die Kollagenase-Genexpression sehr effizient (s. Abb. 8B). Dieser Effekt wurde auch in Fibroblasten beobachtet (Krämer et al., 1993). Erwartungsgemäß hemmte Suramin auch die Wirkung von IL-1 $\alpha$  und bFGF (Abb. 8B, Spuren 6 + 7). Interessanterweise war die Akkumulation der kollagenase-spezifischen m-RNA durch IL-1 $\alpha$  und bFGF zusammen deutlich höher als durch die beiden Faktoren allein (Abb. 8B, Spuren 4, 5 und 6). Beide wirken also synergistisch auf die Expression des Kollagenasegens.

C

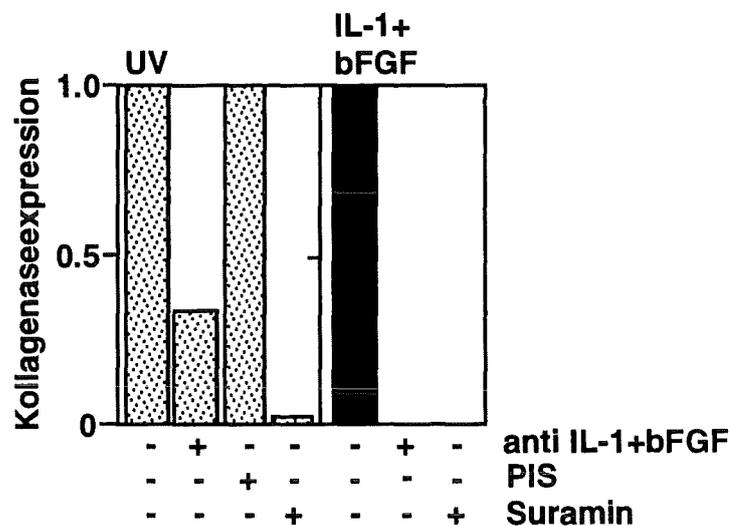


Abb. 8 IL-1 $\alpha$  und bFGF sind funktionelle Komponenten der "späten" UVC-Antwort in HeLa Zellen

C. Densitometrische Auswertung der Experimente in A und B. Die UVC-induzierte Expression der Kollagenase (ohne Inhibitoren) wurde als 1.0 gewählt.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß die Wachstumsfaktoren IL-1 $\alpha$  und bFGF (oder einer davon) eine entscheidende Rolle bei der UVC-induzierten Expression des Kollagenasegens spielen. Suramin hemmt die UVC-induzierte Expression des Kollagenasegens besser als die neutralisierenden Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  und bFGF. Dies läßt den Schluß zu, daß neben IL-1 $\alpha$  und bFGF auch andere Wachstumsfaktoren an diesem Prozeß beteiligt sind.

IL-1 $\alpha$ , bFGF und EGF sind keine funktionellen Komponenten der schnellen UVC-induzierten Genexpression

In einem ähnlichen Ansatz wie oben wurde getestet, ob Wachstumsfaktoren an der frühen UVC-induzierten Genexpression beteiligt sind. Auf Grund der Hinweise, daß in HeLa Zellen neben IL-1 $\alpha$  und bFGF auch andere Wachstumsfaktoren an der UVC-induzierten Signaltransduktion beteiligt sein könnten (s. oben), wurde EGF als zusätzlicher Stimulus in diese Untersuchungen mit eingeschlossen. Die Experimente in Abb. 6 hatten eine Beteiligung des EGF-Rezeptors an der frühen Genexpression nahegelegt. Im Gegensatz zu EGF reagieren HeLa Zellen nicht auf den "Platelet Derived Growth Factor (PDGF)" oder Insulin mit der Expression des c-fos Gens (Daten nicht gezeigt), sodaß diese Faktoren nicht berücksichtigt wurden.

HeLa Zellen wurden mit einem Gemisch aus inhibitorischen Antikörpern gegen den extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors und gegen bFGF sowie IL-1-Rezeptor-Antagonist für 45 min vorbehandelt (Abb. 9). Der natürlich vorkommende IL-1-Rezeptor Antagonist bindet an den IL-1-Rezeptor, aktiviert diesen aber nicht (Hannum et al., 1990). Die Vorbehandlung verhinderte effizient die c-fos-Expression nach Zugabe der Liganden EGF, IL-1 $\alpha$  und bFGF. Hingegen wurde die UVC-induzierte c-fos Expression dadurch nicht beeinflusst.

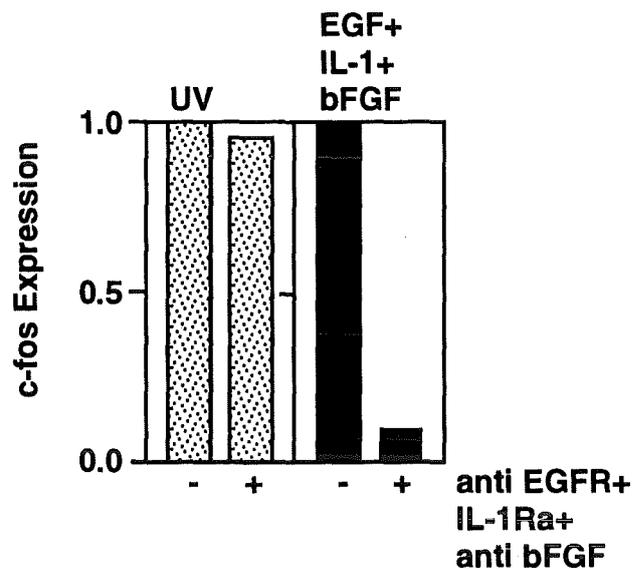


Abb. 9 Sezernierte Wachstumsfaktoren sind nicht an der schnellen Genexpression nach UVC-Bestrahlung beteiligt

HeLa Zellen wurden für 60 min mit einem Gemisch aus neutralisierenden, monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor (Klon 528 (Ab-1); 0.5 µg/ml), aus Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (2 µg/ml) und aus neutralisierenden, polyclonalen Antikörpern gegen bFGF (20 µg/ml) vorbehandelt (+ anti EGFR + IL-1 Ra + anti bFGF). Anschließend wurden die Zellen mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>) behandelt (UV) bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen und für weitere 45 min im ursprünglichen Zellkulturmedium weiterinkubiert. Parallelansätze wurden mit einer Mischung aus EGF (1 ng/ml), IL-1α (1 ng/ml; Fa. Brit. Biotechnol.) und bFGF (5 ng/ml) stimuliert (EGF + IL-1 + bFGF) und ebenfalls für 45 min weiterinkubiert. Anschließend wurde aus den Proben m-RNA isoliert und die Menge an c-fos bzw. Gapdh-spezifischer m-RNA durch Northern Blot Analyse ermittelt (wie in Abb. 6B) und densitometrisch ausgewertet. Die Menge an c-fos-spezifischer m-RNA in UVC- bzw. Wachstumsfaktor-behandelten Zellen (ohne Vorbehandlung) wurde als 1.0 gewählt.

Dieses Experiment macht deutlich, daß die UVC-induzierte, schnelle Genexpression (im Gegensatz zur Kollagenase-Genexpression) nicht über die Freisetzung und anschließende Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren vermittelt wird. Die sehr schnelle Kinetik dieses Prozesses spricht ebenfalls gegen diese Hypothese.

Suramin hemmt schnelle UVC-induzierte Prozesse

Trotz der Nicht-Hemmbarkeit schneller Genexpression durch die neutralisierenden Agenzien, die die Bindung von Liganden verhindern, testete ich auch die Wirkung des Rezeptor-Inhibitors Suramin auf die schnellen Reaktionen der Zelle nach UVC-Bestrahlung. Alle bisher beschriebenen schnellen Endpunkte wurden in diese Untersuchungen eingeschlossen: Expression von c-fos und c-jun, Modifikation von c-Jun und Elk-1. HeLa Zellen wurden mit dem Inhibitor vorbehandelt und anschließend die Reaktionen auf Wachstumsfaktoren, UVC oder Phorbolster untersucht.

Abb. 10A zeigt, daß erwartungsgemäß die IL-1 $\alpha$ -induzierte Expression der Gene c-fos und c-jun durch Suramin deutlich gehemmt wurde (vgl. Spuren 6 und 7). Im Gegensatz zu den neutralisierenden Antikörpern (Abb. 9) wurde jedoch auch die Wirkung von UVC in vergleichbar effizienter Weise wie IL-1 $\alpha$  durch Suramin gehemmt (vgl. Spuren 2 und 3). In beiden Fällen mußten die Zellen für 30 - 45 min mit Suramin vorbehandelt werden, um eine effiziente Hemmung zu erzielen. Unter diesen Bedingungen kam es zu keiner unspezifischen Schädigung der Zellen; die Expression von c-fos und c-jun durch Behandlung der Zellen mit TPA wurde unter denselben Bedingungen durch Suramin nicht beeinflußt (vgl. Spuren 4 und 5). Auch eine 40-stündige Behandlung von Fibroblasten mit Suramin hatte keine toxischen Nebenwirkungen für die Zellen (Krämer et al., 1993).

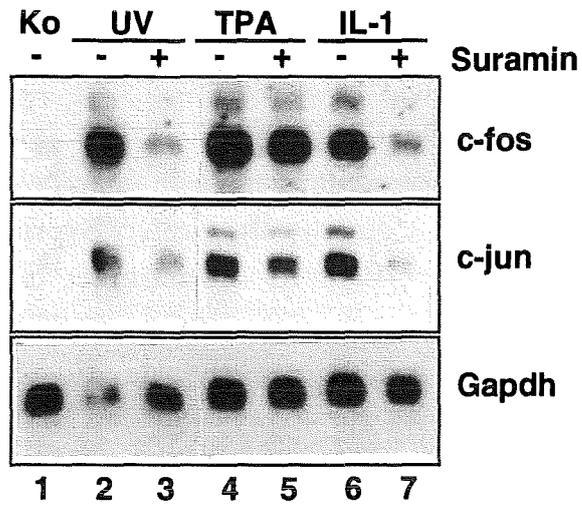
Ein ähnliches Verhalten wurde auch auf der Ebene der Modifikation von Transkriptionsfaktoren beobachtet. Die UVC-induzierte Modifikation von c-Jun, erkennbar an der verzögerten Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese (vgl. Abb. 1 und 6), wurde durch Suramin nahezu vollständig gehemmt (Abb. 10B). Ebenso war das Erscheinen der UVC-induzierten TCF-Komplexe am E74-Oligonukleotid (vgl. Abb. 4 und 5) durch Suramin gehemmt (Abb. 9C). Auch hier hatte Suramin keinen Einfluß auf die Wirkung von TPA.

Da der Wirkungsmechanismus des Suramins nicht vollständig geklärt ist und auch eine intrazelluläre Wirkungsweise postuliert wurde (Huang und Huang, 1988), wurde der Einfluß von Suramin auf die c-fos-Genexpression nach Aktivierung der Src-Protein-Tyrosinkinase getestet. Im Gegensatz zu Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. EGF- oder bFGF-Rezeptoren, besitzen

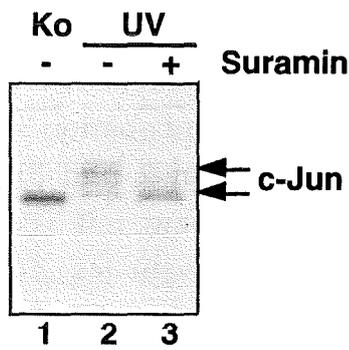
Vertreter der Src-Tyrosinkinasefamilie keine extrazelluläre Ligandenbindedomäne. Da sie jedoch über eine aminoternale Fettsäuremodifikation in Membranen verankert sind (s. Übersichtsartikel Parsons und Weber, 1989), stellen sie eine geeignete Quelle für intrazelluläre Initiation von Signaltransduktion, die von der Innenseite der Plasmamembran herrührt, dar.

Rat-1 Zellen, die stabil mit einem retroviralen Expressionvektor für ein temperatur-sensitives v-Src-Protein transfiziert sind (Rat-1/LA29; Wasilenko et al., 1990), wurden von der restriktiven (39°C) zur permissiven (35°C) Temperatur transferiert. Dies aktivierte die temperatur-sensitive v-Src-Tyrosinkinase und führte zur Expression des c-fos Gens nach 45 min (s. Abb. 10D, Spuren 1 und 2). Unter den selben Behandlungsbedingungen zeigten Rat-1 Zellen, die kein v-Src Gen enthielten, keine Akkumulation c-fos- oder c-jun-spezifischer m-RNA, was einen allgemeinen Einfluß des Temperaturwechsels auf die Genexpression ausschloß (Daten nicht gezeigt). Die durch den Temperaturwechsel von Rat-1/LA29 Zellen induzierte Expression des c-fos Gens, wurde durch eine Vorinkubation mit Suramin (wie oben) nicht beeinflußt (Abb. 10D, vgl. Spuren 2 und 3). Im selben Experiment wurden die Zellen mit UVC bestrahlt bzw. mit TPA behandelt und für weitere 45 min bei der restriktiven Temperatur inkubiert. Ähnlich wie in HeLa Zellen hemmte die Suramin-Vorbehandlung auch in Rat-1/LA29 Zellen die UVC-induzierte c-fos-Genexpression deutlich (vgl. Spuren 4 und 5). Die (relativ schwache) Induktion der c-fos Expression durch TPA hingegen wurde durch Suramin nicht beeinflußt (vgl. Spuren 6 und 7).

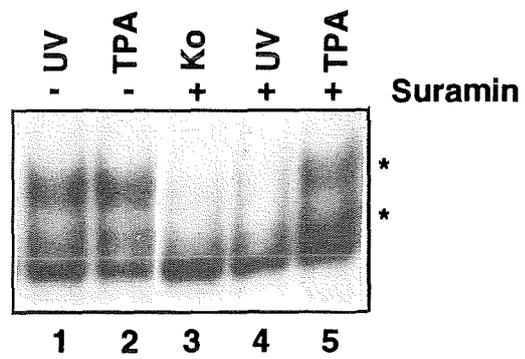
**A**



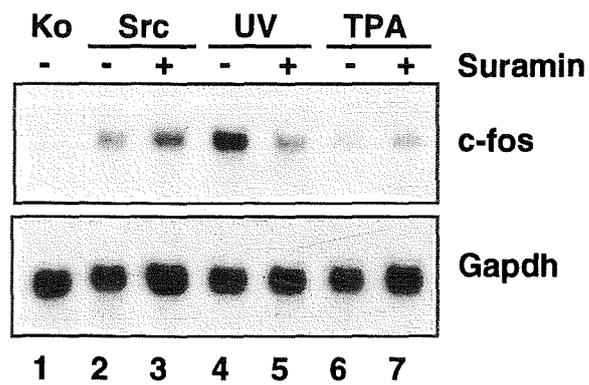
**B**



**C**



**D**



Diese Experimente zeigen, daß die schnelle UVC-induzierte Expression der Gene c-fos und c-jun sensitiv gegenüber Suraminbehandlung ist. Signale, die an der Innenseite der Zellmembran generiert werden (Proteinkinasen C, v-Src-Tyrosinkinase), werden durch Suramin nicht beeinträchtigt. Suramin wirkt also mit größter Wahrscheinlichkeit auf Rezeptoren, die in die Zellmembran integriert sind und nicht auf Signal-komponenten innerhalb der Zelle. Da kein Hinweis auf die Beteiligung von Ligandenbindung an Rezeptoren während der schnellen UVC-induzierten Prozesse gefunden werden konnte (s. oben), deuten diese Ergebnisse auf eine liganden-unabhängige Wirkung von UVC auf Rezeptoren hin. Diese ist jedoch durch Suramin hemmbar.

*Abb. 10 Suramin hemmt schnelle UVC-induzierte Prozesse*

- A. HeLa Zellen wurden für 45 min mit Suramin (0.3 mM, im Zellkulturmedium) vorbehandelt (+) oder nicht (-). Anschließend wurden die Zellen mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV), TPA (60 ng/ml) und IL-1 $\alpha$  (2 ng/ml; Fa. Brit. Biotechnol.; IL-1) stimuliert bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko). Nach weiteren 45 min wurde die Menge an c-fos-, c-jun und Gapdh-spezifischer m-RNA mittels Northern Blot Analyse bestimmt.
- B. HeLa Zellen wurden für 3.5 h mit <sup>35</sup>S-Methionin (0.37 MBq/ml; 370 TBq/mmol) in Kultur markiert und für 15 min mit Suramin (0.3 mM, im Markierungsmedium) vorbehandelt (+) oder nicht (-). Anschließend wurden die Zellen mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>) behandelt (UV) oder der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko) und für weitere 20 min im Markierungsmedium weiterinkubiert. c-Jun-Protein wurde durch Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Antikörper c-jun/AP-1 (Ab-1) (0.5  $\mu$ g/Probe) isoliert, mittels SDS-PAGE (10% AA-Bis) aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die Expositionsdauer des getrockneten Gels betrug 24 h. Pfeile kennzeichnen unterschiedliche Modifikationsformen des c-Jun-Proteins.
- C. HeLa Zellen wurden mit Suramin vorbehandelt (+/-) und mit UVC und TPA stimuliert, wie in A beschrieben. 10 min nach den Behandlungen wurden Kern-extrakte aus den Zellen präpariert und die Bildung von Protein-DNA Komplexen am E74-Oligonukleotid wie in Abb. 4A beschrieben, analysiert.
- D. Rat-1/LA29 Zellen wurden für 40 h bei 37°C und für weiter 24 h bei 39.5°C inkubiert. Die Zellen wurden für 45 min mit Suramin (0.3 mM, im Zellkulturmedium) vorbehandelt (+) oder nicht (-). Zur Induktion der Src-Tyrosinkinase-aktivität wurden die Zellen von 39.5°C zu 35.5°C transferiert (Src). Parallelansätze wurden mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV) bzw. TPA (60 ng/ml) behandelt, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen und bei 39.5°C weiterinkubiert. 45 min nach den Stimulierungen wurde die Menge an c-fos und Gapdh-spezifischer m-RNA durch Northern Blot Analyse ermittelt.

### *Werden Wachstumsfaktorrezeptoren durch UVC funktionell aktiviert?*

Die bisherigen Experimente hatten aufgrund mehrerer indirekter Evidenzen eine Beteiligung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren an der UVC-Antwort nahegelegt. Es galt nun zu zeigen, daß ein funktioneller Rezeptor wirklich notwendig für UVC-induzierte Genexpression ist. Ich konzentrierte mich dabei auf den EGF-Rezeptor, da er einer der best untersuchten Rezeptoren ist. Wie bereits erwähnt, eigneten sich weder der PDGF- noch der Insulin-Rezeptor für diese Untersuchungen, da HeLa Zellen diese Rezeptoren vermutlich nicht exprimieren. Geeignete Hilfsmittel zur Untersuchung der IL-1- oder der FGF-Rezeptoren standen mir nicht zur Verfügung.

### *Der EGF-Rezeptor ist eine funktionelle Komponente UVC-abhängiger Signaltransduktion*

Um spezifisch mit der Aktivierung des endogenen EGF-Rezeptors in HeLa Zellen zu interferieren, bediente ich mich einer dominant-negativen Mutante des Rezeptors. Eine Deletion von 533 AS entfernt die Autophosphorylierungsstellen und die Tyrosinkinasedomäne vom C-Terminus des Proteins (Livneh et al., 1986). Der Rezeptor besitzt jedoch immer noch die Fähigkeit, in die Zellmembran zu integrieren und mit sich selbst bzw. mit endogenen Rezeptoren (inaktive) Homo- bzw. Heterodimere zu bilden (Kashles et al., 1991). Wenn im Überschuß exprimiert, bilden sich hauptsächlich inaktive Heterodimere und der endogene Rezeptor kann keine funktionsfähigen Homodimere bilden; der verkürzte Rezeptor wirkt also dominant-negativ (Kashles et al., 1991; Redemann et al., 1992).

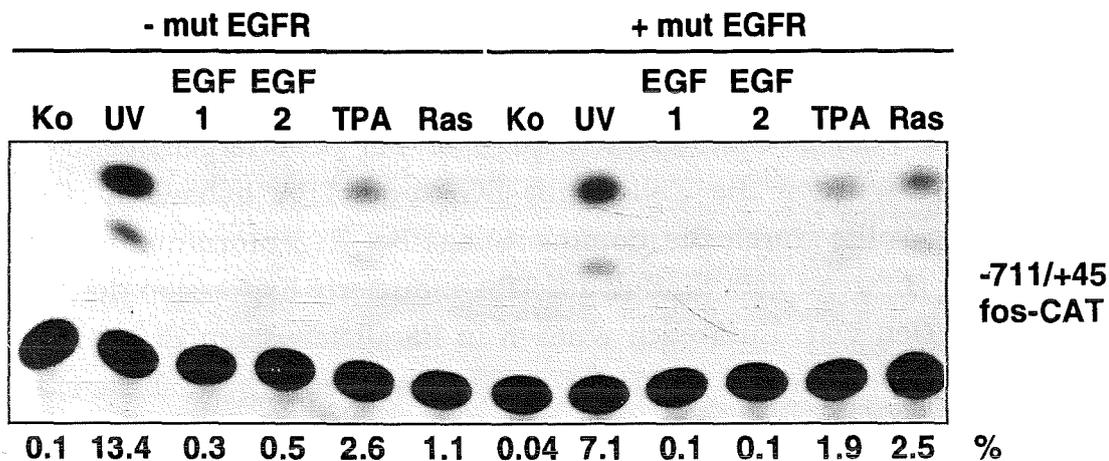
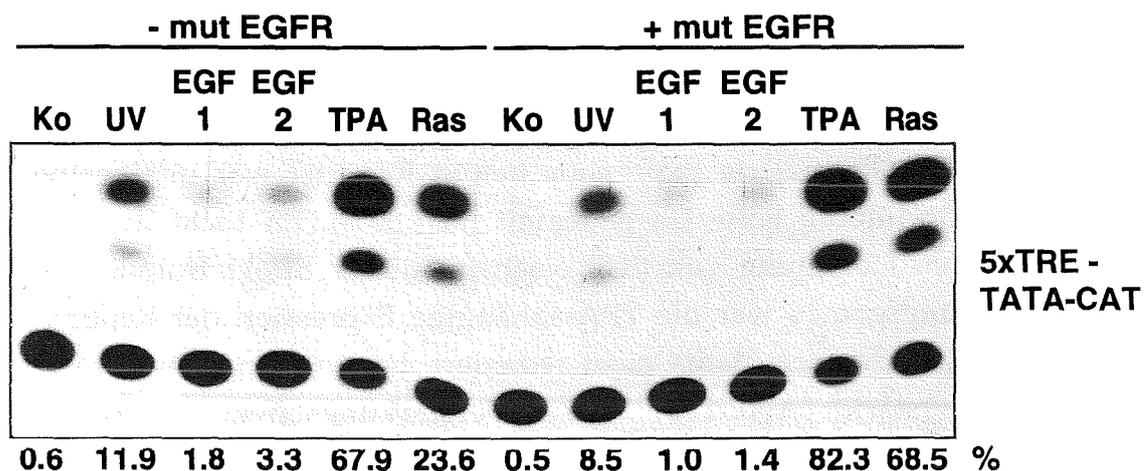
**A****B**

Abb. 11 Eine dominant-negative Mutante des EGF-Rezeptors hemmt UVC-induzierte Genexpression

- A. HeLa Zellen wurden mit 4  $\mu\text{g}$  pro Petrischale ( $\varnothing$  9 cm) Reporterplasmid (-711/+45-fos-CAT) transient transfiziert (DEAE-Dextran Methode). Zusätzlich wurden je 10  $\mu\text{g}$  des Expressionplasmids pRK5-HerNA8 (+ mut EGFR) bzw. des entsprechenden "leeren" Expressionplasmids pRK5-0 (- mut EGFR) kotransfiziert. Wo gekennzeichnet, erhielten die Zellen zusätzlich je 1  $\mu\text{g}$  des Expressionplasmids RSV-H-ras (Leu 61) (Ras); alle anderen Ansätze erhielten je 1  $\mu\text{g}$  des entsprechenden "leeren" Expressionplasmids RSV-H20. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit UVC (30 J/m<sup>2</sup>; UV), EGF (1 bzw. 2 ng/ml; EGF 1/2) oder TPA (60 ng/ml) behandelt, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (andere). Nach weiteren 24 h erfolgte die Bestimmung der Aktivität des CAT-Reporterenzym. Unterhalb der Abbildung sind die Umsetzungen von Chloramphenicol in azetyliertes Chloramphenicol in % angegeben.
- B. Der Versuchsaufbau war identisch zu A; als Reporterplasmid wurde das 5xTRE-TATA-CAT Plasmid verwendet.

Das Expressionsplasmid für den mutierten EGF-Rezeptor wurde transient mit zwei unterschiedlichen UVC-induzierbaren Reporterplasmiden (-711/+45-fos-CAT, 5xTRE-TATA-CAT; s. Tabelle 1) kotransfiziert und der Einfluß auf die UVC-induzierte Expression der Reportergene gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit EGF und TPA behandelt. Die EGF-Wirkung sollte durch die dominant-negative Rezeptormutante verringert werden, während kein Einfluß auf TPA-induzierte Expression des Reporters zu erwarten war. Zusätzlich wurden in Parallelansätzen Zellen mit einem Expressionplasmid für aktiviertes Ras (Ha-ras (Leu 61); s. Tabelle 1) kotransfiziert. Auch ein Ras-abhängiges Signal sollte durch Inhibition des EGF-Rezeptors nicht gehemmt werden, da das Ras-Protein in der Signaltransduktion "unterhalb" des Rezeptors wirkt.

Die EGF-induzierte CAT-Genexpression wurde durch die dominant-negative Rezeptormutante um ca. 50% gehemmt (Abb. 11B). Dieser Effekt war nur bei nicht sättigenden EGF Konzentrationen zu beobachten (1 - 2 ng/ml), die jedoch die Reportergene nur schwach induzierten.

Die UVC-induzierte Expression beider Reporter war in Gegenwart der Rezeptormutante teilweise gehemmt (30 - 50%). Im Licht der nicht vollständigen Hemmung von EGF erscheint dieser Effekt trotzdem effizient! Erwartungsgemäß war die TPA-abhängige Expression der Reporter durch die EGF-Rezeptormutante nicht reduziert, bzw. in manchen Experimenten auch verstärkt (Abb. 11B). Dieser Verstärkungseffekt war für die Ras-induzierte Expression der Reporter sogar noch deutlicher und konnte reproduzierbar beobachtet werden (Abb. 11A und B). Der dominant-negative EGF-Rezeptor hatte auch keinen Effekt auf das RSV-CAT Reporterplasmid (Daten nicht gezeigt). Das Expressionsplasmid für aktiviertes Ras wird durch den RSV-LTR reguliert, so daß ausgeschlossen werden konnte, daß die erhöhte Expression der Reporter auf gesteigerte Mengen von aktiviertem Ras-Protein zurückzuführen waren (Daten nicht gezeigt). Obwohl der Mechanismus der Verstärkung der Reporterexpression durch die Rezeptormutante unklar war, unterstützten diese Befunde die Signifikanz der teilweisen Hemmung von UVC und EGF im selben Experiment und schlossen gleichzeitig eine unspezifische Konkurrenz anderer Signalkomponenten durch den dominant-negativen EGF-Rezeptor aus.

Diese Experimente zeigen, daß der EGF-Rezeptor für UVC-abhängige Expression von Genen in HeLa Zellen notwendig ist.

### UVC-Bestrahlung führt zur Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors

Bindung von EGF an den Rezeptor führt zur Dimerisierung und dadurch zur Aktivierung der Tyrosinkinasefunktion des Rezeptors (s. Einleitung). Die Rezeptormoleküle phosphorylieren sich daraufhin gegenseitig an mehreren Tyrosinresten im zytoplasmatischen Teil. Messung von Tyrosinphosphorylierung kann daher als erster Hinweis auf eine funktionelle Aktivierung des EGF-Rezeptors dienen.

Um zu prüfen, ob der EGF-Rezeptor durch UVC-Bestrahlung funktionell aktiviert wird, wurde dieser mittels Immunpräzipitation zu verschiedenen Zeitpunkten nach UVC-Bestrahlung aus HeLa Zellen isoliert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Membran übertragen (Western Blot) und mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen phosphoryliertes Tyrosin gerichtet sind, hybridisiert. Um mit dieser Methode die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors nachweisen zu können, muß der Großteil der Rezeptormoleküle im phosphorylierten Zustand vorliegen (s. unten). Daher wurden auch höhere Dosen an UVC bzw. EGF getestet, als für die effiziente Expression von c-fos notwendig sind (vgl. Abb. 6).

Abb. 12 zeigt, daß innerhalb von Sekunden nach UVC-Bestrahlung mit  $50 \text{ J/m}^2$  Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptor nachweisbar war. Dieser Vorgang war relativ schwach und transient.

*Abb. 12 Schnelle und durch Suramin hemmbare Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors*

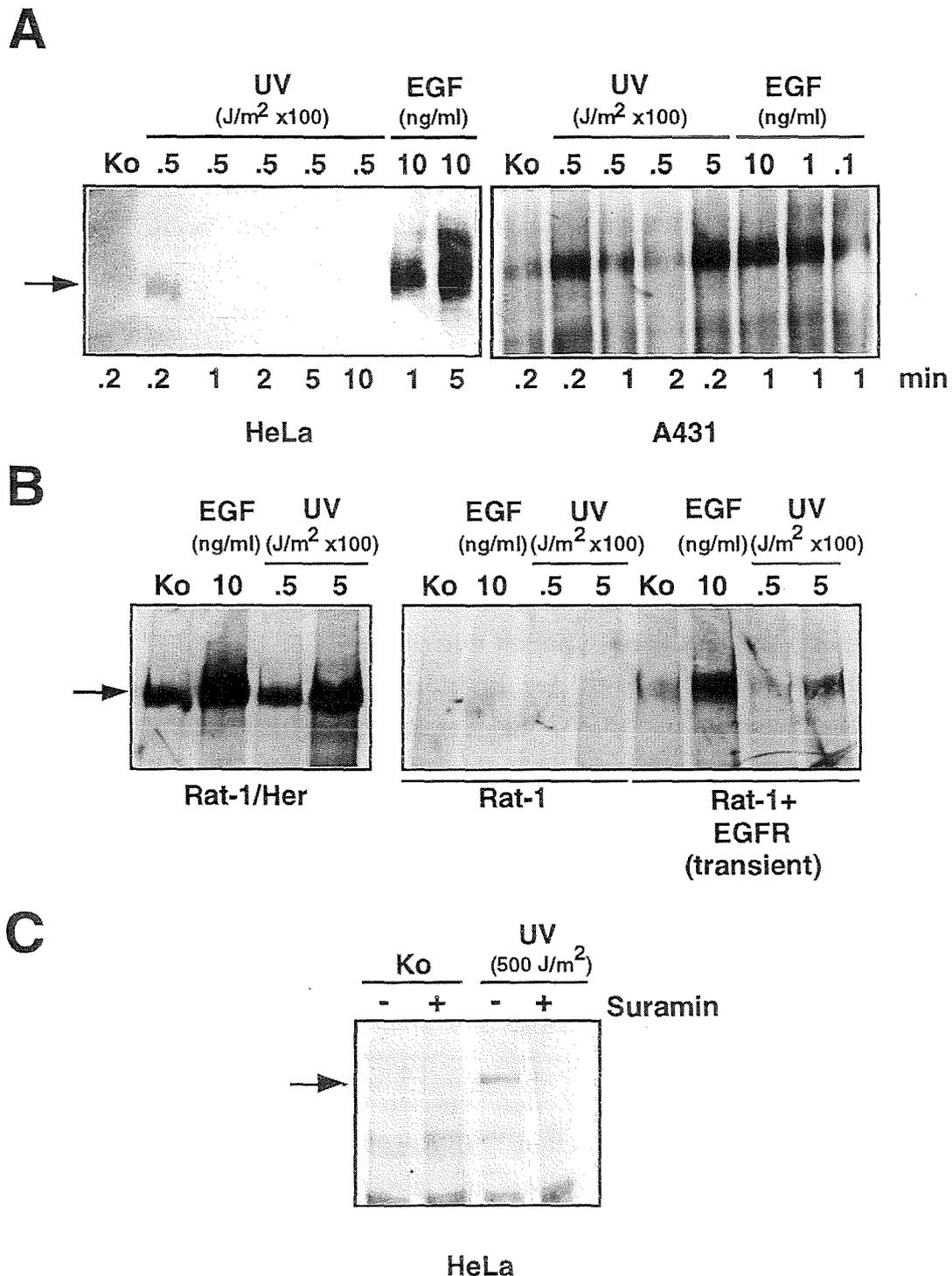
A. (links) HeLa Zellen wurden mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM, im Zellkulturmedium) für 60 min vorbehandelt und anschließend mit UVC (UV) oder EGF, wie oberhalb der Abb. erläutert, behandelt, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten (s. unterhalb der Abbildung) wurden die Zellen zur Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors geerntet. Der EGF-Rezeptor wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Klon 528 (Ab-1) isoliert, die präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE (7.5% AA-Bis) aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot). Die Membran wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (Klon PT-66) hybridisiert und spezifisch gebundene Antikörper durch die "Enhanced Chemolumineszenz (ECL)" Methode sichtbar gemacht (s. Material und Methoden).

(rechts) A431 Zellen wurden für 60 min mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM, im Zellkulturmedium) vorbehandelt und anschließend mit UVC (UV) oder EGF, wie oberhalb der Abbildung erläutert, stimuliert, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten (s. unterhalb der Abbildung) wurde der EGF-Rezeptor durch Immunpräzipitation isoliert und dessen Gehalt an Tyrosinphosphat, wie in A beschrieben, bestimmt.

B. (links) Rat-1/Her Zellen (Rat-1 Zellen, die den menschlichen EGF-Rezeptor stabil exprimieren, Wasilenko et al., 1991) wurden für 3 h in Zellkulturmedium ohne FCS "gehungert" und für 30 min mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM, im selben Zellkulturmedium) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit EGF bzw. UVC (UV) stimuliert, wie in der Abbildung erläutert, und nach 60 sek der EGF-Rezeptor durch Immunpräzipitation isoliert. Die Bestimmung der Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors erfolgte wie in A beschrieben.

(rechts) Rat-1 Zellen wurden mit je 5  $\mu\text{g}$ /Petrischale ( $\varnothing$  9 cm) des Expressionsplasmids pRK5-Herc transient transfiziert (modifizierte Kalziumphosphat Methode) (Rat-1 + EGFR (transient)) oder nicht (Rat-1). 16 h nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch serum-freies Medium ersetzt, die Zellen für weitere 3 h "gehungert" und für 30 min mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM, im Medium) vorbehandelt. Die Behandlung der Zellen und die Analyse des EGF-Rezeptors erfolgte wie bei Rat-1/Her Zellen (links).

C. HeLa Zellen wurden für 30 min mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM, im Zellkulturmedium) und, wo gekennzeichnet, mit Suramin (0.3 mM) vorbehandelt (+/- Suramin). Anschließend wurden die Zellen mit UVC (500  $\text{J}/\text{m}^2$ ; UV) behandelt, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen und nach 60 sek der EGF-Rezeptor durch Immunpräzipitation isoliert. Die Analyse des EGF-Rezeptors erfolgte wie oben beschrieben. Pfeile kennzeichnen die Lokalisation des EGF-Rezeptors.



Die Behandlung mit einer EGF-Dosis, die c-fos Genexpression vergleichbar effizient induziert wie 30 J/m<sup>2</sup> UVC (1 - 2 ng/ml) war in HeLa Zellen nicht ausreichend, um nachweisbare Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors hervorzurufen (Daten nicht gezeigt). 10 ng/ml EGF

hingegen induzierten eine starke und anhaltende Phosphorylierung des Rezeptors (Abb. 12A). Um die Halbwertszeit der Tyrosinphosphate zu erhöhen, wurden alle Zellen für 30 - 60 min mit dem tyrosin-spezifischen Phosphatase-Inhibitor Natrium-Vanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) vorbehandelt.

In einem ähnlichen Experiment wurde gezeigt, daß auch in A431 Zellen (eine menschliche epidermale Karzinomzelllinie, die sehr hohe Mengen an EGF-Rezeptor expremiert; Ullrich et al., 1984), der EGF-Rezeptor durch UVC-Bestrahlung an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Abb. 12A, rechte Hälfte). Auch hier war die Phosphorylierung transient. Interessanterweise war eine 10-fach höhere Dosis an UVC ( $500 \text{ J/m}^2$ ) ein noch effizienterer Induktor der Phosphorylierung des Rezeptors, deren Ausmaß mit der durch  $10 \text{ ng/ml}$  EGF induzierten vergleichbar war. Dieser Dosiseffekt konnte auch in HeLa Zellen und in Rat-1 Zellen, die den menschlichen EGF-Rezeptor stabil expremierten (Rat-1/Her; s. Abb. 12B) beobachtet werden. Es zeigte sich also, daß der EGF-Rezeptor durch UVC dosisabhängig an Tyrosinresten phosphoryliert werden kann, ähnlich wie durch EGF.

Es wurde beobachtet, daß das Phänomen der raschen Dephosphorylierung des Rezeptors nach UVC von der Rückgabe des Zellkulturmediums nach der Bestrahlung abhing (die Zellen wurden ohne Flüssigkeit bestrahlt und anschließend im Medium für 1 - 10 min inkubiert). Zellen, die durch Kulturmedium hindurch bestrahlt wurden, zeigten stabile Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors (Daten nicht gezeigt und s. unten).

Die beobachtete Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung konnte auch mit transient expremiertem menschlichen EGF-Rezeptor in Rat-1 Zellen beobachtet werden. Dies war wichtig, um zur näheren Analyse der UVC-induzierten Phosphorylierungen mutierte EGF-Rezeptormoleküle analysieren zu können. Rat-1 Zellen wurden transient mit einem Expressionsplasmid für den menschlichen EGF-Rezeptor transfiziert. Die Immunpräzipitation des Rezeptors erfolgte mit einem Antikörper, der spezifisch den menschlichen Rezeptor erkennt. Somit war es möglich, die Phosphorylierung des menschlichen Rezeptors, unabhängig von endogenen Rattenrezeptoren, zu analysieren (Abb. 12B, rechte Hälfte). Rat-1 Zellen, die mit dem "leeren" Expressionvektor transfiziert worden waren, zeigten weder nach Behandlung mit UVC, noch mit EGF, Tyrosinphosphat-spezifische Signale nach Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors (Abb. 12B, Rat-1). Erst nach Transfektion des Expressionsplasmids für den Rezeptor, war EGF- und

UVC-induzierbare Tyrosinphosphorylierungen zu erkennen (Abb. 12B, Rat-1 + EGFR (transient)).

Auf Grund der Hemmbarkeit der schnellen UVC-Antwort durch Suramin, aber nicht durch spezifische Inhibitoren sezernierter Wachstumsfaktoren, war postuliert worden, daß UVC Rezeptoren direkt und ligandenunabhängig anregen kann (s. oben). Suramin müßte demnach mit der aktiven Konformation des Rezeptors interferieren können (z. B. durch Anlagerung). Um diese Hypothese zu untermauern, wurde der Einfluß von Suramin auf die UVC-induzierte EGF-Rezeptorphosphorylierung getestet.

HeLa Zellen wurden unter denselben Bedingungen, wie in Abb. 10 beschrieben, mit Suramin vorbehandelt, mit UVC bestrahlt (500 J/m<sup>2</sup>) und der EGF-Rezeptor unmittelbar danach isoliert. Tatsächlich verhinderte die Vorbehandlung mit Suramin die UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors.

Dieses Experiment zeigt, daß Suramin 1. tatsächlich auf der Ebene der Rezeptoren wirksam ist und 2. dadurch die direkte Wirkung von UVC auf den EGF-Rezeptor verhindern kann.

#### Tyrosinphosphorylierungen im Zellextrakt UVC-bestrahlter HeLa Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob die UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors auch zur funktionierenden Signaltransduktion in der Zelle führt. Die Experimente mit der dominant-negativen EGF-Rezeptormutante hatten dieses ja schon nahegelegt (vgl. Abb. 11). Die Aktivierung der Tyrosinkinasefunktion des EGF-Rezeptors führt, neben der Autophosphorylierung, zur Phosphorylierung von zytoplasmatischen Substratproteinen. Daher wurde das Muster der durch EGF induzierten Tyrosinphosphorylierungen im Zellextrakt mit denen durch UVC induzierten verglichen.

Gleiche Mengen derselben HeLa-Zellextrakte, die zur Gewinnung des EGF-Rezeptors durch Immunpräzipitation gewonnen wurden (Abb. 12A, linke Hälfte), wurden durch Elektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen, und mit dem tyrosinphosphat-spezifischen Antikörper hybridisiert. In Abb. 13 ist zu sehen, daß das Muster der induzierten Tyrosinphosphorylierungen im Zellextrakt nach UVC- und EGF-Behandlung identisch waren (Pfeile!).

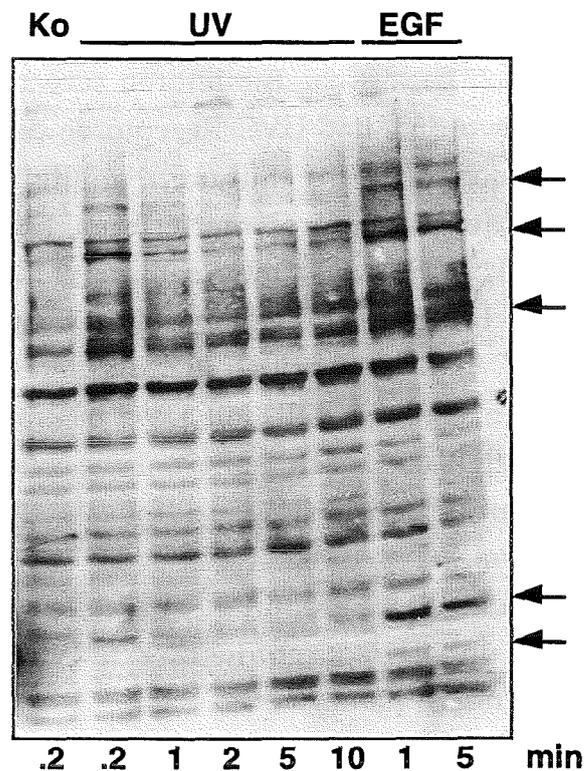


Abb. 13 Tyrosinphosphorylierung im Ganzzelextrakt UVC- und EGF-behandelter HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM, im Zellkulturmedium) für 60 min vorbehandelt und anschließend mit UVC ( $50 \text{ J/m}^2$ ; UV) oder EGF (10 ng/ml) behandelt, bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten (s. unterhalb der Abbildung) wurden die Zellen zur Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors geerntet (s. Abb. 12A). Gleiche Mengen Zell-extraktprotein wurden mittels SDS-PAGE (7.5% AA-Bis) aufgetrennt. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot) und mit einem monoklonalen Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste (Klon PT-66) hybridisiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch die "Enhanced Chemolumineszenz (ECL)" Methode sichtbar gemacht (s. Material und Methoden). Pfeile kennzeichnen Proteine, die nach Stimulierung verstärkte Tyrosinphosphorylierung zeigen.

Dies war ein weiterer deutlicher Hinweis dafür, daß UVC und EGF identische Signaltransduktion in HeLa Zellen bewirken. Zusammen mit den Daten über UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors und der Hemmbarkeit von UVC-Signaltransduktion durch eine dominant-negative EGF-Rezeptormutante, erhärteten sich die Hinweise, daß UVC über Aktivierung der Tyrosinkinasefunktion des EGF-Rezeptors Signaltransduktion initiiert.

### *Werden auch andere Wachstumsfaktorrezeptoren durch UVC aktiviert?*

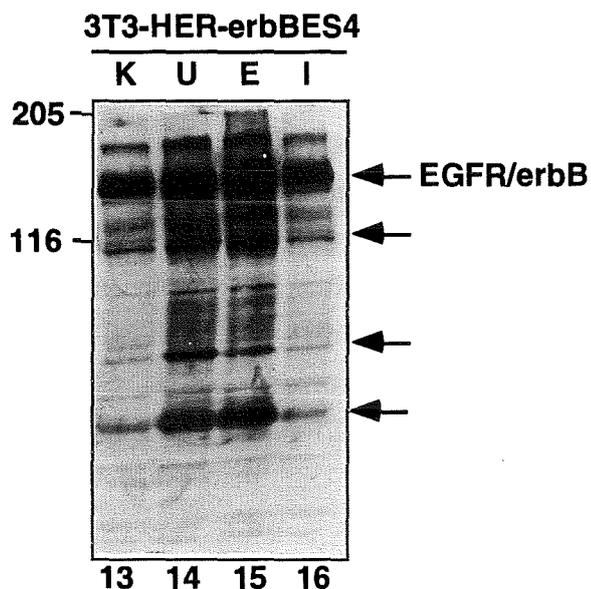
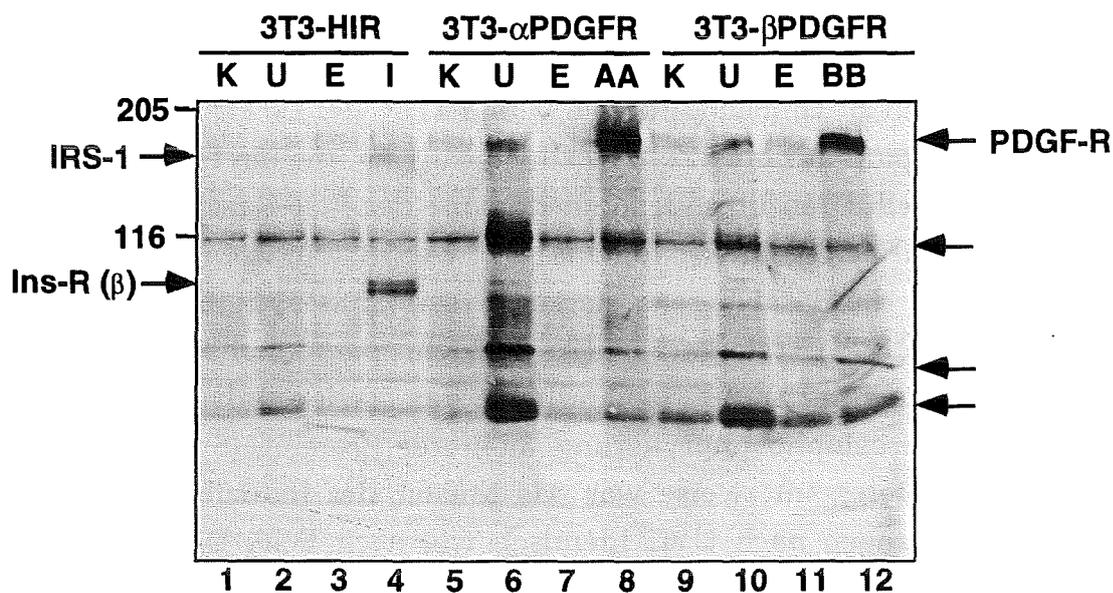
Wie spezifisch ist die Antwort von Rezeptoren auf Bestrahlung von Zellen mit UVC? Gibt es auch Rezeptoren, die nicht durch UVC aktiviert werden? Kann man aus dem Vergleich verschiedener Rezeptoren Hinweise auf strukturelle Motive gewinnen, die auf UVC "reagieren"? Die Refraktivitätsexperimente in Abb. 6 hatten die Möglichkeit bereits angedeutet, daß mehrere verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren an der UVC-Antwort beteiligt sein könnten. Der Hypothese folgend, daß UVC vermutlich je nach Expressionsmuster einer Zelle, verschiedene Rezeptoren aktivieren kann, untersuchte ich NIH-3T3 Maus-Fibroblasten, die verschiedene menschliche Rezeptor-Tyrosinkinasen stabil überexprimieren, auf UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung im Zellextrakt. Als Kontrolle wurden die Zellen jeweils mit dem Wachstumsfaktor stimuliert, dessen Rezeptor überexprimiert wurde, bzw. auch mit einem anderen.

NIH-3T3 Zellen, die den humanen Insulin-Rezeptor überexprimieren (Abb. 14; 3T3-HIR), zeigten nach Behandlung mit Insulin, im Vergleich zu kontroll-behandelten Zellen, eine zusätzliche, stark tyrosinphosphorylierte Bande bei ca. 90 kD (vgl. Spuren 1 und 4 in Abb. 14). Weder EGF-, noch UVC-Behandlung der Zellen führten zur Tyrosinphosphorylierung dieses Proteins (Spuren 2 und 3). UVC-Bestrahlung verstärkte jedoch leicht die Phosphorylierung von drei anderen Proteinen (116 kD und zwei Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten). Die nach Insulin-Behandlung verstärkt tyrosinphosphorylierte Bande stellte mit größter Wahrscheinlichkeit die  $\beta$ -Kette des Insulin-Rezeptors dar (Fantl et al., 1993). Zusätzlich konnte man nach Behandlung mit Insulin das tyrosinphosphorylierte Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa erkennen (White, 1994).

NIH-3T3 Zellen, die den  $\alpha$ -Rezeptor für den "Platelet Derived Growth Factor (PDGF)" überexprimieren, reagierten auf Behandlung mit PDGF-AA mit einer starken Tyrosinphosphorylierung des PDGF-Rezeptors (190 kD) und anderer Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten (vgl. Spuren 5 und 8 und s. Pfeile in Abb. 14). Diese Proteine besaßen dieselbe elektrophoretische Mobilität wie jene, die in Insulin-Rezeptor-überexprimierenden Zellen durch UVC verstärkt tyrosinphosphoryliert wurden. Diese wurden in den PDGF-Rezeptor-überexprimierenden Zellen durch UVC jedoch deutlich stärker tyrosinphosphoryliert (vgl. Spuren 2 und 6). Dies war jedoch nicht auf eine basal erhöhte Tyrosinphosphorylierung im Zellextrakt zurückzuführen (vgl. Spuren 1 und 5).

*Abb. 14 Tyrosinphosphorylierungen in Zellextrakten von 3T3-Fibroblasten, die verschiedene Rezeptoren überexprimieren*

NIH-3T3 Fibroblasten, die entweder den Insulinrezeptor (3T3-HIR), den  $\alpha$ PDGF-Rezeptor (3T3- $\alpha$ PDGFR), den  $\beta$ PDGF-Rezeptor (3T3- $\beta$ PDGFR) oder ein Hybrid aus dem EGF-Rezeptor und dem erb-B-Onkogen (3T3-HER-erbBES4) stabil überexprimieren, wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium gegen DMEM (ohne FCS, ohne Phenolrot) ausgetauscht und die Zellen für 5 h weiterinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit UVC (600 J/m<sup>2</sup>; durch das Medium hindurch; U), EGF (20 ng/ml; E), Insulin (500 ng/ml; I), PDGF-AA (50 ng/ml; AA) oder PDGF-BB (50 ng/ml; BB) bzw. die Kontrollbehandlung (Ko) für jeweils 2 min. Die Zellen wurden sofort auf Eis mit PBS (0°C) gewaschen und in SDS-PAGE-Probenpuffer lysiert. Gleiche Mengen an Lysat wurden mittels SDS-PAGE (7.5% AA-Bis) aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und mit einem tyrosinphosphat-spezifischen Antikörper hybridisiert. Die spezifischen Signale wurden durch die ECL-Methode sichtbar gemacht (vgl. Abb. 12A). Die Pfeile kennzeichnen Proteine, die nach Behandlung der Zellen verstärkt tyrosinphosphoryliert sind. Soweit bekannt, wurde die Identität der Proteine angegeben (s. auch Text); Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1), Insulin-Rezeptor  $\beta$ -Kette (Ins-R ( $\beta$ )), PDGF-Rezeptor (PDGF-R), EGF-Rezeptor/erbB-Hybrid (EGFR/erbB). Am linken Rand sind die Molekulargewichte von Standardproteinen angegeben.



Obwohl UVC- und PDGF-AA-Behandlung zur Tyrosinphosphorylierung offensichtlich identischer Proteine führten, waren deutliche quantitative Unterschiede zu erkennen. Während PDGF-AA den Rezeptor stärker phosphorylierte als die übrigen Proteine im Extrakt, verhielt es sich mit UVC umgekehrt (vgl. Spuren 6 und 8). Die selben Effekte wie durch Überexpression des  $\alpha$ PDGF-Rezeptors wurden auch durch Überexpression des  $\beta$ PDGF-Rezeptors beobachtet (Abb. 14, Spuren 9 - 12).

Offensichtlich exprimieren NIH-3T3 Zellen keine (oder nicht genügend) EGF-Rezeptoren, um Tyrosinphosphorylierungen nach Behandlung mit EGF nachweisen zu können (Spuren 3, 7 und 11).

Zusätzlich stand mir eine Zelllinie zur Verfügung, die ein Hybridmolekül aus der extrazellulären Ligandenbindedomäne des EGF-Rezeptors und der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des v-erbB Onkogens exprimiert. Dadurch wird die basal bereits starke Tyrosinkinaseaktivität des v-erbB Proteins durch EGF steigerbar (A. Ullrich, persönliche Mitteilung). Tatsächlich resultierte die Behandlung der Zellen mit EGF in der verstärkten Tyrosinphosphorylierung mehrerer Proteine (Spuren 13 und 15, Pfeile!). Interessanterweise war das Muster der induzierten Tyrosinphosphorylierungen nach UVC identisch wie nach EGF. Dies zeigt, daß auch Hybridmoleküle aus verschiedenen Rezeptoren durch UVC adressierbar sind und eröffnet experimentelle Möglichkeiten zur Identifizierung struktureller Motive, die kritisch für die Wirkung von UVC auf Rezeptoren ist.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß nach Überexpression der Rezeptoren für PDGF und EGF/v-erbB, verstärkte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Zellextrakt nach Bestrahlung mit UVC erkennbar ist. Der Insulin-Rezeptor, der zu einer anderen Klasse von Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört als der EGF- und der PDGF-Rezeptor, scheint durch UVC nicht betroffen zu sein. Ob dies tatsächlich der Fall ist, muß in weiteren Experimenten gesichert werden. Vorläufig nehme ich die Befunde als Hinweis, daß die unterschiedliche Rezeptorstruktur die Aktivierbarkeit durch UVC bestimmt.

## Diskussion

### *Proteinkinasen, die durch UVC-Bestrahlung aktiviert werden*

Die schnelle Expression der Gene *c-fos* und *c-jun* nach UVC-Bestrahlung von Zellen wird über posttranslationelle Modifikation von Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die Analyse der Transkriptionsfaktoren *c-Jun* und Elk-1 zeigte veränderte Phosphorylierungen innerhalb von 20 min nach Bestrahlung. Durch Etablierung eines transienten Expressionssystems war es gelungen, die Phosphoakzeptorstellen im *c-Jun*-Protein zu lokalisieren (Ser 63 und Ser 73). Zusätzliche Phosphorylierungen, die nur nach UVC-Bestrahlung, nicht aber nach TPA-Behandlung zu sehen waren, wurden auf einen Bereich von drei Aminosäuren zwischen den Positionen 89 und 91 eingegrenzt (Abb. 1 und 2).

Während der Durchführung dieser Versuche wurden verschiedene Kinasen identifiziert, die *in vitro* an *c-Jun* binden und Ser 63 und Ser 73 phosphorylieren können: ERK1 und ERK2 (s. Einleitung) (Pulverer et al., 1991), JNK1 und JNK2 ("Jun N-terminal Kinase 1/2") (Hibi et al., 1993) und 4 Vertreter der SAP Kinasen ("Stress Activated Protein Kinases; SAPK") (Kyriakis et al., 1994). Diese Kinasen werden aufgrund von Sequenzhomologien und ähnlichen Regulationsmechanismen in der Familie der MAP-Kinasen zusammengefaßt. Alle sind durch UVC-Bestrahlung aktivierbar (Radler-Pohl et al., 1993; Derijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994, Milne et al., 1994). Es wird postuliert, daß in HeLa Zellen v. a. JNK1 und 2 für die Phosphorylierung von *c-Jun* an Ser 63 und Ser 73 nach UVC-Bestrahlung verantwortlich sind (Hibi et al., 1993). Dies erscheint plausibel auf Grund der widersprüchlichen Beobachtung, daß TPA ein potenterer Aktivator von ERK1/2 als UVC ist, jedoch UVC ein besserer Induktor für *c-Jun* Phosphorylierung ist (Radler-Pohl et al., 1993; s. a. Abb. 1). Gereinigte JNK-Proteine können *in vitro* *c-Jun* an Stellen phosphorylieren, die ähnlich sind, wie jene zusätzlichen Phosphorylierungen, die nach UVC-Bestrahlung von HeLa bzw. F9 Zellen beobachtet werden können (Hibi et al., 1993 und Abb. 1 und 2). Übereinstimmend mit den Ergebnissen in Abb. 2 dieser Arbeit, vermuten die Autoren dieses Artikels ebenfalls die Lokalisation dieser Phosphoakzeptorstellen um Position 90 des *c-Jun*-Proteins.

Mehrere Evidenzen weisen darauf hin, daß Elk-1 in vivo durch die ERK-Proteine phosphoryliert wird (Gille et al., 1992; Janknecht et al., 1993; Marais et al., 1993; Rao und Reddy, 1994). Die Kinetik der UVC-induzierten ERK-Aktivierung ist identisch mit der Phosphorylierung von Elk-1 (Sachsenmaier et al., 1994b). Tatsächlich hemmt eine dominant-negativ wirkende Mutante von ERK2 sowohl UVC-, als auch TPA-abhängige Signaltransduktion mit ähnlicher Effizienz, wenn als Endpunkt die Transkription des c-fos Promoters gemessen wird (Sachsenmaier et al., 1994b). Dies könnte bedeuten, daß ERK-Proteine sowohl an der UVC- als auch an der TPA-induzierten Expression des c-fos Gens beteiligt sind, JNK-Proteine jedoch spezifisch an der Phosphorylierung von c-Jun nach UVC-Bestrahlung. Die dominant-negative ERK2-Mutante führt, wenn über-exprimiert, vermutlich zur kompetitiven Inhibition regulatorischer Kinasen (Robbins et al., 1993). Auf Grund der ähnlichen Regulationsmechanismen aller genannten Kinasen durch Thr/Tyr-Phosphorylierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß diese Mutante mehrere Kinasen gleichzeitig hemmt.

Es zeigt sich also, daß mehrere Kinasen in der Zelle vorhanden sind, die c-Jun und Elk-1 phosphorylieren können. Diese werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli aktiviert. Feine Unterschiede in der Aktivierbarkeit und Substratspezifität könnten sich in größeren Unterschieden in der genetischen Antwort auf diese Stimuli niederschlagen.

Vertreter der beschriebenen Kinasen phosphorylieren nicht "nur" Transkriptionsfaktoren: ERKs phosphorylieren andere Kinasen, Phospholipasen oder Rezeptoren (s. Übersichtsartikel Davis, 1993) und führen somit potentiell zur Initiation (oder Hemmung) sekundärer Signaltransduktionswege.

Die Rolle von Phosphatasen an der Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren ist bislang weniger gut untersucht als die von Proteinkinasen. Die UVC-induzierte Dephosphorylierung im Bereich der DNA-Bindedomäne von c-Jun könnte entweder auf Aktivierung einer Phosphatase oder auf Hemmung einer konstitutiven Kinase zurückzuführen sein. Lin et al. (1992) publizierten Evidenzen, daß Kaseinkinase II (CK II) in vivo c-Jun an den inhibitorischen Stellen in der basischen Region phosphoryliert und daß Inhibition von CK II zur Aktivierung der Trans-

aktivierungsfähigkeit von c-Jun führt. UVC müßte demnach zur Hemmung von CK II führen.

### *UVC induziert Ras abhängige Signaltransduktion*

Das Muster der Phosphorylierungen am c-Jun Protein nach UVC-Bestrahlung entspricht dem nach Überexpression von aktiviertem Ras (Smeal et al., 1992 und Abb. 1). Dies spricht für eine Beteiligung des Ras-Proteins an der UVC-Antwort. In dieser Arbeit und durch Experimente in unserer und anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, daß Raf Kinase und Ras durch UVC-Bestrahlung von Zellen aktiviert werden (Devary et al., 1992; Blattner et al., 1994) und daß diese auch notwendig für UVC-induzierte Signaltransduktion sind (Devary et al., 1992; 1993; Radler-Pohl et al., 1993a; Herrlich et al., 1994; Sachsenmaier et al., 1994a und Tabelle 1 in dieser Arbeit). Die Hemmbarkeit UVC-abhängiger Signaltransduktion durch eine dominant-negative Ras Mutante zeigt, daß auch das Ras Protein nicht direkt von UVC aktiviert wird, sondern daß Signaltransduktion involviert ist. Das mutierte Protein (Ser 17 -> Asn) bindet vermutlich einen Austauschfaktor, der für die Beladung von Ras mit GTP notwendig ist (Feig und Cooper, 1988; Medema et al., 1991). Dadurch steht dieser Faktor dem endogenen Ras nicht mehr zur Verfügung. UVC muß also zur Aktivierung dieses Austauschfaktors führen. Durch Studien zum Mechanismus wachstumsfaktor-abhängiger Ras Aktivierung weiß man, daß der Austauschfaktor Sos ("Son of Sevenless") über Adaptorproteine an aktivierte Rezeptoren bindet (Buday und Downward, 1993; Li et al., 1994). Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung von aktivierten Rezeptoren an der UVC-Antwort in Säugerzellen.

### *UVC wirkt auf Wachstumsfaktorrezeptoren*

Die Experimente in Abb. 6 zeigen, daß eine Vorbehandlung von HeLa Zellen mit einem Gemisch aus EGF, IL-1 $\alpha$  und bFGF zur nahezu vollständigen Hemmung einer nachfolgenden UVC-Antwort führt. Dieser Befund kann als liganden-induzierte Inaktivierung der entsprechenden Rezeptoren interpretiert werden (Stoscheck und Carpenter, 1984; Downing et al., 1989). Diese würden für eine nachfolgende Stimulierung durch UVC nicht mehr zur Verfügung stehen. Andere Erklärungen sind jedoch denk-

bar: Komponenten "unterhalb" der aktivierten Rezeptoren könnten durch die Vorbehandlung refraktär werden. Trotzdem müßten diese Komponenten spezifisch für die jeweiligen Wachstumsfaktoren sein, da sich die Faktoren gegenseitig nicht beeinflussen (s. Abb. 6). Die Faktoren, wenn einzeln verwendet, hemmen UVC-induzierte Genexpression nur teilweise; umgekehrt hemmt eine Vorbehandlung mit UVC alle Faktoren (Daten nicht gezeigt, und Sachsenmaier et al., 1994b). Dies deutet darauf hin, daß UVC nicht spezifisch einen Rezeptor aktiviert, sondern mehrere Rezeptoren, die alle zur UVC-induzierten Genexpression beitragen.

Die schnelle Expression des c-fos Gens erfolgt unabhängig von extrazellulär wirkenden Liganden: Neutralisierende Antikörper, die die Bindung von EGF, IL-1 $\alpha$  und bFGF an ihre Rezeptoren verhindern, haben keinen Einfluß auf die Genexpression (s. Abb. 9). Gleichzeitig verhindern diese aber die späte Expression des Kollagenasegens, die offensichtlich auf Bindung sezernierter Liganden an ihre Rezeptoren beruht (s. Abb. 8 und weiter unten).

Der generelle Rezeptorinhibitor Suramin hemmt sowohl die schnelle als auch die späte UVC-induzierte Genexpression (s. Abb 8 und 10). Suramin ist ein geladenes, polyzyklisches Molekül, das sich unspezifisch an Proteine der Zelloberfläche anlagert (Basu und Modak, 1985). Man nimmt an, daß es nicht membrangängig ist; Internalisierung könnte jedoch über Endozytose von Oberflächenproteinen erfolgen. Suramin hemmt die Bindung von Wachstumsfaktoren und verdrängt auch bereits gebundene Liganden von ihren Rezeptoren (Betsholtz et al., 1986). Aufgrund der Anlagerung mehrerer Suraminmoleküle könnte eine Konformationsänderung eines Rezeptors, die durch UVC-Bestrahlung hervorgerufen wird, verhindert werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Suramin den aktiven Zustand von Rezeptoren, die intrazellulär von Liganden gebunden wurden, verhindern kann. Beispiele dafür wurden beschrieben, wenn Ligand und Rezeptor, auf Grund mißgeleiteter Sezernierungsmechanismen, im selben Kompartiment der Zelle vorliegen (Huang und Huang, 1988; Yayon und Klagsbrun, 1990). UVC müßte demnach zur schnellen Freisetzung von gespeicherten Liganden innerhalb der Zelle führen, die daraufhin ihren Rezeptor binden und zur Membran dirigiert werden. Da effiziente rezeptor-abhängige Signaltransduktion von mehreren Komponenten abhängt, die in korrekter Weise an der Plasmamembran

lokalisiert sein müssen (s. Einleitung), würde ein liganden-beladener Rezeptor erst nach Integration in die Membran funktionell aktiv sein (Heldin und Westermark, 1990). Dieser Vorgang könnte durch Suramin, aber nicht durch neutralisierende Antikörper im Zellkulturmedium, hemmbar sein, da Suramin auch bereits gebundene Liganden vom Rezeptor verdrängen kann (Betsholz et al., 1986).

UVC-Bestrahlung ruft die sehr schnelle Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyrosinresten hervor (Abb. 12). Dieser Vorgang ist ebenfalls durch Suramin hemmbar, während Signaltransduktion durch eine aktivierte Src-Tyrosinkinase durch Suramin nicht beeinflusst wird (Abb. 10). Auch langanhaltende Effekte, wie die Transformation von Zellen durch das src- oder ras-Onkogen werden durch Suramin nicht beeinflusst, im Gegensatz zur v-sis-induzierten Transformation (v-sis bindet an den PDGF-Rezeptor) (Betsholz et al., 1986). Diese Befunde zeigen eindeutig, daß Suramin auf membranständige Rezeptoren, aber nicht auf Signaltransduktionskomponenten an der Innenseite der Plasmamembran wirkt. Auch phorbolster-abhängige Prozesse werden durch Suramin nicht gehemmt. Das deutet darauf hin, daß Phorbolster auch in Gegenwart von Suramin durch die Plasmamembran in die Zelle gelangen und zytoplasmatische Proteinkinasen (PKC) effizient aktivieren können.

Diese Befunde zeigen allerdings auch, daß die Hemmbarkeit eines Prozesses durch Suramin, keine eindeutige Aussage über die Beteiligung von sezernierten Wachstumsfaktoren zuläßt. Im Gegensatz zur schnellen c-fos Genexpression, wird die UVC-induzierte Kollagenase Genexpression in HeLa Zellen sowohl durch Suramin, als auch durch neutralisierende Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  und bFGF im Zellkulturmedium deutlich gehemmt (s. Abb 8). Die Kinetiken der Freisetzung beider Faktoren sind deutlich schneller als die der Kollagenaseexpression nach UVC (Krämer et al., 1993). Diese Befunde legen nahe, daß die Freisetzung und Bindung von Wachstumsfaktoren eine funktionelle Rolle bei der späten, jedoch nicht bei der frühen Genexpression nach UVC-Bestrahlung spielt.

### *Der EGF-Rezeptor als Vermittler UVC-induzierter Signaltransduktion*

Um die funktionelle Aktivierung eines Wachstumsfaktor-Rezeptors durch UVC zu überprüfen, wurden zwei Strategien eingeschlagen: 1. Hemmung der Aktivität eines endogenen Rezeptors und Beobachtung der

Auswirkungen auf nachfolgende UVC-abhängige Signaltransduktion und

2. Messung des Modifikationszustandes eines Rezeptors. Für beide Ansätze wurde der EGF-Rezeptor gewählt, da er einer der am besten untersuchten Rezeptor-Tyrosinkinasen ist und da die nötigen Reagenzien zu seiner Analyse zur Verfügung stehen.

Die Koexpression einer dominant-negativ wirkenden EGF Rezeptor-mutante hemmt die Expression von Reportergenkonstrukten nach Behandlung der Zellen mit UVC oder EGF (Abb. 11). Dies spricht für eine funktionelle Aktivierung des Rezeptors durch UVC. Allerdings kann man auf Grund der Dauer des Versuchs (die Reporterexpression wird 24 h nach UVC-Bestrahlung gemessen) nicht ausschließen, daß sezernierte Faktoren, die an den EGF-Rezeptor binden (EGF oder TGF $\alpha$ ), zur Expression des Reporters beitragen. Deshalb wurde die schnelle Wirkung von UVC auf den Rezeptor selbst untersucht.

Wie in der Einleitung erwähnt, resultiert die Aktivierung des EGF-Rezeptors in der verstärkten Phosphorylierung an Tyrosinresten im intrazellulären Teil des Rezeptormoleküls. Die funktionelle Signifikanz dieser Phosphorylierungen wurde durch Messung EGF-induzierter Signaltransduktion durch Rezeptormoleküle, in denen einzelne oder mehrere Tyrosinreste mutiert wurden, gezeigt (s. Übersichtsartikel Schlessinger und Ullrich, 1992). UVC-Bestrahlung induziert die sehr schnelle Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors (Abb. 12) innerhalb von Sekunden. Die beobachtete transiente Kinetik der Rezeptorphosphorylierung scheint an der Durchführung des Experiments zu liegen und nicht der tatsächlichen Kinetik zu entsprechen. In den Experimenten in Abb. 12 wurden, wie in allen anderen gezeigt, die Zellen vor der UVC-Bestrahlung mit PBS gewaschen, ohne Flüssigkeit bestrahlt und anschließend wurde das ursprüngliche Zellkulturmedium zurückgegeben (außer den Zellen, die sofort geerntet wurden!). Später durchgeführte Experimente, in denen die UVC-Bestrahlung durch Zellkulturmedium ohne Farbstoffzusatz erfolgte, zeigen deutlich stabilere Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors (A. Knebel, unveröffentlichte Daten). Der Mechanismus der raschen Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Rückgabe des Zellkulturmediums erscheint umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, daß das Zellkulturmedium mit dem tyrosin-spezifischen Phosphatase-Inhibitor Vanadat versetzt war.

In zahlreichen Versuchen war es nicht möglich, UVC-induzierte EGF-Rezeptor Phosphorylierung in Abwesenheit von Vanadat zu messen. Dies könnte ein Hinweis auf die (gleichzeitige?) Aktivierung von tyrosin-spezifischen Phosphatasen durch UVC-Bestrahlung sein. Zahlreiche Vertreter dieser Enzyme wurden identifiziert und manche weisen, vergleichbar mit Rezeptor-Tyrosinkinasen, eine rezeptorähnliche Struktur mit Ligandenbindedomäne, Transmembranregion und intrazellulärer Phosphatasedomäne auf (Fischer et al., 1991). Ähnliche Mechanismen wie für die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, könnten auch für Rezeptor Tyrosinphosphatasen gelten. Dies würde implizieren, daß die UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors, die in Abwesenheit von Vanadat experimentell nicht nachweisbar ist, ausreicht, um Signaltransduktion zu initiieren.

Die UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors ist in allen untersuchten Zelllinien dosisabhängig - höhere Dosen an UVC führen zu effizienterer Rezeptorphosphorylierung. Höhere Dosen UVC ( $> 50 \text{ J/m}^2$ ) haben jedoch keine erhöhte Genexpression zur Folge (Devary et al., 1991). Am wahrscheinlichsten erscheint, daß durch die verstärkenden Eigenschaften von Signalkaskaden, quantitative Unterschiede "am Beginn" der Kaskade deutlicher ins Gewicht fallen als "am Ende". Die Aktivierung einiger weniger Rezeptormoleküle könnte ausreichen, um effiziente Signaltransduktion hervorzurufen. Darüberhinaus wirken die hohen Dosen UVC zellabtötend, sodaß keine physiologischen Reaktionen der Zellen mehr zu erwarten sind.

### *Mechanismen der direkten Aktivierung des EGF-Rezeptors durch UVC*

Folgende Mechanismen, wie UVC-Bestrahlung den EGF-Rezeptor aktivieren kann, sind denkbar: Dimerisierung des Rezeptors; andere, aktivierende Konformationsänderungen; indirekte Wirkung von aktivierenden oder hemmenden Komponenten (und sicher noch viele andere mehr).

### Dimerisierung

Aus der Literatur ist liganden-unabhängige Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors bekannt: Hyperosmotischer "Schock" von Zellen führt zur effizienten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors, allerdings ohne nachweisbare Dimerisierung des Rezeptors (Richter-King et al., 1989). Die Hemmbarkeit UVC-induzierter Genexpression durch eine dominant-negative EGF-Rezeptormutante, die ihre Wirkung nur durch Heterodimerbildung mit endogenem Rezeptor entfalten kann, weist jedoch auf Dimerisierung des EGF-Rezeptors nach UVC-Bestrahlung hin. Ein direkter Beweis der Bildung von Dimeren nach UVC-Bestrahlung steht jedoch noch aus. Transiente Expressionsstudien zeigen, daß die Koexpression der dominant-negativen Rezeptormutante sehr effizient die basale Tyrosinphosphorylierung des Wildtyp-Rezeptors verhindert, die weder durch UVC noch durch EGF gesteigert werden kann (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der Nichtnachweisbarkeit des Basalwertes kann man jedoch nicht ausschließen, daß UVC immer noch die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors steigert.

Geht man davon aus, daß Dimerisierung notwendig für erfolgreiche Initiation von Signaltransduktion durch Rezeptoren ist (Ullrich und Schlessinger, 1990), spricht die außerordentlich schnelle Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors nach UVC (und EGF, A. Knebel, unveröffentlicht) für eine enge, räumliche Nähe von Rezeptormolekülen vor der Aktivierung. Eine kleine Veränderung in der Konformation, entweder durch Bindung eines Liganden, oder durch Energieaufnahme nach Bestrahlung, könnte zur Ausbildung der aktiven Konformation führen. Diese wäre vermutlich nach UVC-Bestrahlung nicht stabil (außer es käme zur Ausbildung kovalenter Bindungen durch UVC-Bestrahlung), während Bindung des Liganden eine stabile Dimerbildung induziert, die erst nach Endozytose und Degradation in Lysosomen aufgehoben werden würde (Stoschek und Carpenter, 1984).

### Radikale

Behandlung von Zellen mit  $H_2O_2$  induziert ebenfalls die effiziente Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors (nicht gezeigte Daten in Zusammenarbeit mit A. Bonnet und A. Knebel). Dies könnte ein Hinweis auf die viel diskutierte Beteiligung von Sauerstoffradikalen an der UV-

Antwort sein. Vor allem dem langwelligen UVA-Anteil wird radikalbildende Eigenschaften zugesprochen. Aber auch kurzwelliges UVB und UVC kann die Bildung intrazellulärer Radikale fördern (A. Bonnet, unveröffentlicht), allerdings mit einer langsameren Kinetik, als die der Rezeptorphosphorylierung nach UVC-Bestrahlung. Devary et al. (1992) diskutieren eine funktionelle Rolle von Radikalen bei der UVC-induzierten Genexpression, aufgrund der Hemmbarkeit von c-jun Genexpression durch den "Radikal-Scavenger" N-Azetylcystein. Vermutlich bewirkt die Behandlung von Zellen mit N-Azetylcystein jedoch eine Veränderung des Redox-Zustands der Zelle und deshalb kann aus einer Hemmbarkeit eines Prozesses durch "Scavenger" die funktionelle Beteiligung induzierter Radikale nicht eindeutig gefolgert werden. Vielmehr könnte ein veränderter Radikalspiegel in der Zelle die Aktivität signalgebender Enzyme beeinflussen, ohne daß die Radikale selbst in den Prozeß der Signaltransduktion involviert sein müssen.

#### Andere Tyrosinkinasen

In derselben Veröffentlichung (Devary et al., 1992) wurde auch die Aktivierbarkeit von Src-Tyrosinkinase durch UVC gezeigt. Tatsächlich können Vertreter dieser Kinasen den EGF-Rezeptor an Tyrosinresten phosphorylieren (Wasilenko et al., 1991). Die beobachtete Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors durch UVC könnte also auf indirekter Phosphorylierung durch Src-Tyrosinkinase beruhen, und nicht auf Autophosphorylierung des Rezeptors. Dagegen sprechen folgende Befunde: Die Kinetik der UVC-induzierten EGF-Rezeptor Tyrosinphosphorylierung ist deutlich schneller als die der Aktivierung von Src-Kinasen durch UVC (vgl. Devary et al., 1992 und Abb. 12) (beide Vorgänge wurden in HeLa Zellen gemessen). Src-Kinasen können über direkte Interaktion mit Rezeptor Tyrosinkinase durch diese aktiviert werden (Courtneidge et al., 1993; Mori et al., 1993). Die UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors ist durch Suramin hemmbar (wie auch UVC-abhängige schnelle c-fos Expression), im Gegensatz zur c-fos Expression nach Aktivierung einer ts v-Src Tyrosinkinase (Abb. 10). Diese Befunde sprechen für eine rezeptor-abhängige Aktivierung von Src-Kinasen durch UVC. Dadurch läßt sich auch die Hemmbarkeit von UVC-induzierter Genexpression durch eine dominant-

negative Mutante von c-Src erklären (Devary et al., 1992; 1993). Da Src-Kinasen durch mehrere Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie auch durch Zytokinrezeptoren (ohne Tyrosinkinasenfunktion) aktiviert werden können, und aufgrund der offensichtlichen Aktivierung mehrerer Rezeptoren durch UVC (s. oben), ist es verständlich, daß die dominant-negative c-Src-Mutante UVC-induzierte Prozesse effizienter hemmt, als eine spezifische EGF-Rezeptor Mutante.

*Besteht ein Zusammenhang zwischen UVC-induzierter Schädigung von DNA und den Vorgängen in der Plasmamembran?*

In der Einleitung wurden bereits die Evidenzen angeführt, die eine funktionelle Beteiligung der UV-geschädigten DNA an der Genexpression nach Bestrahlung von Zellen nahelegen. Kurzwelliges UV wird in der Zelle außer von Nukleinsäuren von Aminosäuren, Lipiden und Kofaktoren absorbiert (Kochevar, 1990). Die sehr schnelle Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nach UVC-Bestrahlung erscheint auf den ersten Blick unvereinbar mit der Hypothese, daß DNA-Schädigung der Rezeptorphosphorylierung vorgeht. Wahrscheinlicher ist, daß UVC gleichzeitig auf verschiedene Kompartimente der Zelle wirkt, und daher auch mehrere Signaltansduktionswege gleichzeitig aktivieren kann. Ein "reverser" Signalfluß, der von der DNA zumindest in das Zytoplasma führt, ist jedoch plausibel und notwendig für die Zelle. Z. B. setzt der regulierte Eintritt einer Zelle in die Mitose das Vorhandensein eines diffundierbaren Signales voraus, das der Zelle mitteilt, ob das Genom vollständig repliziert bzw. repariert wurde. Durch Zellfusion mit einer "S-Phase Zelle" bzw. einer durch Strahlung geschädigten Zelle, kann die Mitose eines "G2-Zellkernes" verzögert werden (Alberts et al., 1989).

Einen völlig anderen Aspekt der Beziehung von zellmembranständigen Rezeptoren und DNA-Schädigung eröffnet folgender Befund: Ein hoher Prozentsatz von Mammatumoren weist Überexpression des HER2/neu-Protoonkogens auf. Dieses kodiert für einen Rezeptor aus der EGF-Rezeptorfamilie, dessen Ligand noch nicht eindeutig bekannt ist. Aus Erfahrung weiß man, daß die Wirkung der chemotherapeutischen Behandlung dieser Tumoren mit dem DNA-schädigenden Agens cis-Platin durch gleichzeitige Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen den HER2/neu Rezeptor potenziert wird. Durch Studien in Zellkultur konnte

nun gezeigt werden, daß dieser Effekt vermutlich auf der signifikanten Hemmung der durch cis-Platin induzierten DNA-Reparatur durch die Antikörper beruht (Pietras et al., 1994). Dieser Effekt war nur in Zellen zu beobachten, die auch den HER2/neu-Rezeptor exprimierten, so daß eine unspezifische Wirkung der Antikörper ausgeschlossen werden konnte. Es scheint also, daß die Kapazität einer Zelle, auf DNA-Schädigung zu reagieren, durchaus von Komponenten der Zellmembran beeinflußt werden kann.

### *Was ist die biologische Relevanz der hier gezeigten Befunde?*

Auf die möglichen biologischen Bedeutungen der durch UVC induzierten Genprodukte wurde bereits in der Einleitung eingegangen. Eine Diskussion der biologischen Relevanz der gezeigten Ergebnisse muß immer mit der eindeutigen Feststellung beginnen, daß das in dieser Arbeit verwendete UVC (260 nm) in der Natur nicht vorkommt. Trotzdem erscheint die Verwendung von UVC legitim. Aktionsspektren, die die Wirkung verschiedener Wellenlängen auf Genexpression, Erythembildung, Pigmentierung, DNA-Schädigung und Zellabtötung vergleichen, sind nahezu identisch. Alle zeigen ein Maximum bei Wellenlängen < 300 nm (Stein et al., 1989; Gilchrest, 1994). Die Expression der Gene c-fos und c-jun erfolgt sowohl nach Bestrahlung mit UVC als auch mit UVB, jedoch immer nach Dosen, die auch zur Abtötung von Zellen führt (Devary et al., 1991; Shah et al., 1993). Die zellabtötende Wirkung wird allgemein der Schädigung von DNA zugeschrieben, die nach UVC- und UVB-Bestrahlung von Zellen identisch ist (Pyrimidindimere).

Die Dosis an UVC, die in dieser Arbeit verwendet wurde (30 J/m<sup>2</sup>; außer in Abb. 12, 13 und 14) induziert vergleichbar viele Thyminindimere, wie nach einer ein-stündigen Exposition von Zellen in der Sonne in 2300 m Seehöhe (Klocker et al., 1984). Auch eine Bestrahlung menschlicher Haut mit dem Sonnenlicht nachempfundenen Strahlungsquellen, ruft deutliche Thymin-dimerbildung in den Keratinozyten, die unterhalb der Hornschicht liegen hervor (Young, 1994) und ein kausaler Zusammenhang zwischen der UV-Schädigung der DNA und biologischen Vorgängen im Organismus wie Immunsuppression und Pigmentierung wurde in vivo bestätigt (Kripke et al., 1992; Gilchrest, 1994).

Es zeigt sich also, daß die in Kultur gewonnen Erkenntnisse über die Wirkung von UV-Strahlung auf Zellen durchaus ihre Entsprechung im Organismus haben. Die hier gezeigten Daten eröffnen neue Aspekte, wie UV-Strahlung das genetische Programm einer Zelle beeinflussen kann. UV-Strahlung schädigt nicht nur das Erbgut sondern kann über die Aktivierung membranständiger Rezeptormoleküle Signaltransduktionsmechanismen in Gang setzen, die das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zelle beeinflussen können. Auch hier entscheidet vermutlich die Dosis über die positiven und negativen Eigenschaften von ultravioletter Strahlung.

## Literatur

Adler, V., Franklin, C. C. und Kraft, A. S. (1992). Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: Regulation by the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 5341-5345.

Aggeler, J., Frisch, S. M. und Werb, Z. (1984). Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts. *J. Cell Biol.* **98**: 1662-1671.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1989). The steps of the cell cycle and their causal connections. In "Molecular Biology of the Cell". Ed.) 728-738.

Ananthaswamy, H. N. und Pierceall, W. E. (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* **52**: 1119-1136.

Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2256-2266.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739.

Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W., Hunter, T. und Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171.

Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**: 875-885.

Angel, P., Smeal, T., Meek, J. und Karin, M. (1989). Jun and v-Jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol.* **1**: 35-43.

Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.

Ansel, J. C., Luger, T. A., Lowry, D., Perry, P., Roop, D. R. und Mountz, J. D. (1988). The expression and modulation of IL-1a in murine keratinocytes. *J. Immunol.* **140**: 2274-2278.

Auble, D. T. und Brinckerhoff, C. E. (1991). The AP-1 sequence is necessary but not sufficient for phorbol induction of collagenase in fibroblasts. *Biochemistry* **30**: 4629-4635.

Auer, H. P. (1994). Dissertation, Universität Karlsruhe

Auer, H. P., König, H., Litfin, M., Stein, B. und Rahmsdorf, H. J. (1994). Ultraviolet irradiation, although it activates the transcription factor AP-1 in F9 teratocarcinoma stem cells, does not induce the full complement of differentiation-associated genes. *Exp. Cell Res.* **214**: 131-138.

Basu, A. und Modak, M. J. (1985). Observations on the suramin-mediated inhibition of cellular and viral DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **128**: 1395-1404.

Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.-H. und Westermark, B. (1986). Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 6440-6444.

Binétruy, B., Smeal, T. und Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**: 122-127.

Blattner, C., Knebel, A., Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994). DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes. *Environm. Mol. Mutagen.* **24**: 3-10.

Boguski, M. S. und McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**: 643-654.

Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**: 4682-4689.

Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. und Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675.

Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H. K., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M. und Hunter, T. (1991a). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* **64**: 573-584.

Boyle, W. J., van der Geer, P. und Hunter, T. (1991b). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin layer cellulose plates. *Meth. Enzymol.* **201**: 110-140.

- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. und Pontén, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10124-10128.
- Bravo, R., Neubergh, M., Burckhardt, J., Almendral, J., Wallich, R. und Müller, R. (1987). Involvement of common and cell type-specific pathways in c-fos gene control: stable induction by cAMP in macrophages. *Cell* **48**: 251-260.
- Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. und Karin, M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* **337**: 661-663.
- Brown, S. B., Krause, D. und Ellem, K. A. (1993). Low fluences of ultraviolet irradiation stimulate HeLa cell surface aminopeptidase and candidate "TGF alpha ase" activity". *J. Cell. Biochem.* **51**: 102-115.
- Buday, L. und Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21<sup>ras</sup> through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**: 611-620.
- Burgering, B. M. T., Pronk, G. J., van Weeren, P. C., Chardin, P. und Bos, J. L. (1993). cAMP antagonizes p21<sup>ras</sup>-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.* **12**: 4211-4220.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988). Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**: 301-311.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2745-2752.
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. und Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**: 541-552.
- Cleaver, J. E. und Bootsma, D. (1975). Xeroderma pigmentosum: biochemical and genetic characteristics. *Annu. Rev. Genet.* **9**: 19-38.
- Cochet, C., Gill, G. N., J., M., Cooper, J. A. und Hunter, T. (1984). C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **259**: 2553-2558.

Conca, W., Auron, P. E., Aoun-Wathne, M., Bennett, N., Seckinger, P., Welgus, H. G., Goldring, S. R., Eisenberg, S. P., Dayer, J.-M., Krane, S. M. und Gehrke, L. (1991). An interleukin 1 $\beta$  point mutant demonstrates that jun/fos expression is not sufficient for fibroblast metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* **266**: 16265-16268.

Courtneidge, S. A., Dhand, R., Pilat, D., Twamley, G. M., Waterfield, M. D. und Roussel, M. F. (1993). Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *EMBO J.* **12**: 943-950.

Curran, T., Peters, G., van Beveren, C., Teich, N., und Verma, I. (1982). FBJ Murine Osteosarcoma Virus: Identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.* **44**, 674-682.

Curran, T. und Franza Jr., B. R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**: 395-397.

de Vries-Smits, A. M. M., Burgering, B. M. T., Leervers, S. J., Marshall, C. J. und Bos, J. L. (1992). Involvement of p21<sup>ras</sup> in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* **357**: 602-604.

Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davies, R. J. (1994). JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037.

Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. und Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2804-2811.

Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T. und Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* **71**: 1081-1091.

Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J. A. und Karin, M. (1993). NF-kB activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261**: 1442-1445.

Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A. und O'Connor, J. V. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.* **163**: 1433-1450.

Downing, J. R., Roussel, M. F. und Sherr, C. J. (1989). Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2890-2896.

Downward, J., Riehl, R., Wu, L. und Weinberg, R. A. (1990a). Identification of a nucleotide exchange-promoting factor for p21<sup>ras</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5998-6002.

- Downward, J., Graves, J. D., Warne, P. H., Rayter, S. und Cantrell, D. A. (1990b). Stimulation of p21<sup>ras</sup> upon T-cell activation. *Nature* **346**: 719-723.
- Drapkin, R., Sancar, A. und Reinberg, D. (1994). Where transcription meets repair. *Cell* **77**: 9-12.
- Edwards, D. R. und Mahadevan, L. C. (1992). Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J.* **11**: 2415-2424.
- Elledge, S. J. und Davis, R. W. (1989). DNA damage induction of ribonucleotid reductase. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4932-4940.
- Ellem, K. A. O., Cullinam, M., Baumann, K. C. und Dunstan, A. (1988). UVR induction of TGF $\alpha$  : a possible autocrine mechanism for the epidermal melanocytic response and for promotion of epidermal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **9**: 797-801.
- Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K. und Karin, M. (1994). The UV response involving Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* **77**: 381-390.
- Fantl, W. J., Johnson, D. E. und Williams, L. T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 453-481.
- Feig, L. A. und Cooper, G. M. (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Bio.* **8**: 3235-3243.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H. und Tonks, N. K. (1991). Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **257**: 401-406.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Saboutry, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucl. Acids Res.* **13**: 1431-1442.
- Franklin, C. C., Sanchez, V., Wagner, F., Woodgett, J. R. und Kraft, A. S. (1992). Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 7247-7251.
- Freeman, S. E., Hacham, H., Gange, R. W., Maytum, D. J., Sutherland, J. C. und Sutherland, B. M. (1989). Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5605-5609.

- Gack, S., Vallon, R., Schaper, J., Rütther, U. und Angel, P. (1994). Phenotypic alterations in Fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent Collagenase type I expression. *J. Biol. Chem.* **269**: 10363-10369.
- Gahring, L., Baltz, M., Pepys, M. B. und Daynes, R. (1984). Effect of ultraviolet radiation on production of epidermal cell thymocyte-activating factor/interleukin 1 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1198-1202.
- Garmyn, M., Yaar, M., Boileau, N., Backendorf, C. und Gilchrest, B. A. (1992). Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human keratinocytes to solar-simulated irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **99**: 743-748.
- Gebel, S. (1992). Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun: ein Schlüssel zum Verständnis der schnellen Induktion von Genen. *Dissertation, Universität Karlsruhe*
- Gilchrest, B. A. (1994). Normal skin responses to solar UV radiation: Erythema, pigmentation and photoaging. *Internatl. Symposium on Ozone - Sun - Cancer; molecular and cellular mechanisms; prevention*.
- Gilchrest, B. A., Garmyn, M. und Yaar, M. (1994). Aging and photoaging affect gene expression in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol.* **130**: 82-86.
- Gille, H., Sharrocks, A. D. und Shaw, P. (1992). Phosphorylation of p62<sup>TCF</sup> by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**: 414-417.
- Gilman, M. Z., Wilson, R. N. und Weinberg, R. A. (1986). Multiple protein-binding sites in the 5'-flanking region regulate c-fos expression. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 4305-4316.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. und Howard, B. H. (1982). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 6777-6781.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.
- Graham, R. und Gilman, M. (1991). Distinct protein targets for signals acting at the c-fos serum response element. *Science* **251**: 189-192.
- Greenberg, M. E. und Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* **311**: 433-438.

Greenberg, M. E., Hermanowski, A. L. und Ziff, E. B. (1986). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1050-1057.

Greenberg, M. E., Siegfried, Z. und Ziff, E. B. (1987). Mutation of the c-fos gene dyad symmetry element inhibits serum inducibility of transcription in vivo and the nuclear regulatory factor binding in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1217-1225.

Hagmeyer, B. M., König, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A. J., Herrlich, P. und Angel, P. (1993). Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.* **12**: 3559-3572.

Hall, E. J. (1993). Principles of carcinogenesis: Physical. In "Cancer: Principles & Practice of oncology". (V. T. DeVita et al., Ed.) Philadelphia, 220-221.

Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of E.coli. In "DNA cloning (D.M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford". Ed.) **1**: 109-135.

Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. G., Dripps, D. J., Heimdal, P. L., Armes, L. G., Sommer, A., Eisenberg, S. P. und Thompson, R. C. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343**: 336-340.

Heldin, C.-H. und Westermark, B. (1990). Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regulation* **1**: 555-566.

Herr, I., van Dam, H. und Angel, P. (1994). Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis* **15**: 1105-1113.

Herrera, R. E., Shaw, P. E. und Nordheim, A. (1989). Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature* **340**: 68-70.

Herrlich, P. und Ponta, H. (1989). "Nuclear" oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *TIG* **5**: 112-116.

Herrlich, P., Ponta, H., Stein, B., Gebel, S., König, H., Schönthal, A., Büscher, M. und Rahmsdorf, H. J. (1989). The role of fos in gene regulation. In "Activation of hormone and growth factor receptors. Molecular mechanisms and consequences". (M. N. Alexis und C. E. Sekeris, Ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 77-91.

Herrlich, P., Ponta, H. und Rahmsdorf, H. J. (1992). DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. of Physiol. Biochem. Pharmacol.* **119**: 187-223.

- Herrlich, P., Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Gebel, S., Blattner, C. und Rahmsdorf, H. J. (1994). The mammalian UV response, mechanism of DNA damage induced gene expression. *Advan. Enzyme Regul.* **34**: 381-395.
- Herschman, H. R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 281-319.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Development* **7**: 2135-2148.
- Hipskind, R. A., Rao, V. N., Mueller, C. G. F., Reddy, E. S. P. und Nordheim, A. (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* **354**: 531-534.
- Holbrook, N. J. und Fornace Jr., A. J. (1991). Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol.* **3**: 825-833.
- Hollander, M. C. und Fornace Jr., A. J. (1989). Induction of fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res.* **49**: 1687-1692.
- Howe, L. R., Leever, S., Gómez, N., Nakielny, S., Cohen, P. und Marshall, C. (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**: 335-342.
- Huang, S. S. und Huang, J. S. (1988). Rapid turnover of the platelet-derived growth factor receptor in sis-transformed cells and reversal by suramin. *J. Biol. Chem.* **263**: 12608-12618.
- Hunter, T. und Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 1311-1315.
- Hunter, T., Ling, N. und Cooper, J. A. (1984). Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* **311**: 480-483.
- Hunter, T. und Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387.
- Janknecht, R., Hipskind, R. A., Houthaeve, T., Nordheim, A. und Stunnenberg, H. G. (1992). Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *EMBO J.* **11**: 1045-1054.
- Janknecht, R. und Nordheim, A. (1992). Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3317-3324.

- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V. und Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.* **12**: 5097-5104.
- Jenuwein, T. und Müller, R. (1986). The fos oncogene and transformation. In "Oncogenes and growth control". (P. Kahn und T. Graf, Ed.) Berlin, Heidelberg, 278-283.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Anti-tumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**: 1189-1204.
- Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M. und Herrlich, P. (1990). Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2710-2714.
- Karin, M. und Herrlich, P. (1989). Cis- and trans-acting genetic elements responsible for induction of specific genes by tumor promoters, serum factors, and stress. In: "Genes and signal transduction in multistage carcinogenesis". Colburn, N.H. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York-Basel 415-440.
- Kashles, O., Yarden, Y., Fischer, R., Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1991). A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1454-1463.
- Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174.
- Keyse, S. M. (1993). The induction of gene expression in mammalian cells by radiation. *Sem. Cancer Biol.* **4**: 119-128.
- Klocker, H., Auer, B., Burtscher, H. J., Hirsch-Kauffmann, M. und Schweiger, M. (1984). A synthetic hapten for induction of thymine-dimer-specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* **142**: 313-316.
- Kochevar, I. (1990). UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochem. Photobiol.* **52**: 795-800.
- Köck, A., Scharz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C. und Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* **172**: 1609-1614.
- Kölch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmè, D. und Rapp, U. R. (1993). Protein kinase Ca activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-252.

- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1989). Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* **8**: 2559-2566.
- König, H. (1991). Cell-type specific multiprotein complex formation over the c-fos serum response element in vivo: ternary complex formation is not required for the induction of c-fos. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3607-3611.
- Kortenjann, M., Thomae, O. und Shaw, P. E. (1994). Inhibition of v-raf-dependent c-fos expression and transformation by a kinase-defective mutant of the mitogen-activated protein kinase Erk2. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4815-4824.
- Kraft, A. S., Anderson, W. B., Cooper, H. L. und Sando, J. J. (1982). Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *J. Biol. Chem.* **257**: 13193-13196.
- Krämer, M. (1991). Das Cytokin Interleukin-1 $\alpha$  und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor: Zwei neue Komponenten der UV-induzierten Signalkette in Säugerzellen. *Dissertation. Univ. Karlsruhe*,
- Krämer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., König, H., Loferer, H., Grunicke, H. H., Ponta, H., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1990). Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 303-313.
- Krämer, M., Sachsenmaier, C., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1993). UV-irradiation-induced interleukin-1 and basic fibroblast growth factor synthesis and release mediate part of the UV response. *J. Biol. Chem.* **268**: 6734-6741.
- Kripke, M. L. (1990). Photoimmunology. *Photochem. Photobiol.* **52**: 919-924.
- Kripke, M. L., Cox, P. A., Alas, L. G. und Yarosh, D. B. (1992). Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7516-7520.
- Kruijer, W., Cooper, J. A., Hunter, T. und Verma, I. M. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* **312**: 711-716.
- Kypta, R. M., Hemming, A. und Courtneidge, S. A. (1988). Identification and characterization of p59<sup>lyn</sup> (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **7**: 3837-3844.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. und Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**: 417-421.

- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-160.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leevers, S. J. und Marshall, C. J. (1992). Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21<sup>ras</sup> oncoprotein. *EMBO J.* **11**: 569-574.
- Leevers, S. L., Paterson, H. F. und Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**: 411-414.
- Lefevre, C., Imagawa, M., Dana, S., Grindlay, J., Bodner, M. und Karin, M. (1987). Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J.* **6**: 971-981.
- Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A. G., Kim, W. J. H., Cooper, J. A. und Schlessinger, J. (1994). A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 509-517.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. und Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **70**: 777-789.
- Lin, C. R., Chen, W. S., Lazar, C. S., Carpenter, C. D., Gill, G. N., Evans, R. M. und Rosenfeld, M. G. (1986). Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms. *Cell* **44**: 839-848.
- Livneh, E., Prywes, R., Kashles, O., Reiss, N., Sasson, I., Mory, Y., Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1986). Reconstitution of human epidermal growth factor receptors and its deletion mutants in cultured hamster cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 12490-12497.
- Longstreth, J. (1988). Cutaneous malignant melanoma and ultraviolet radiation: A review. *Cancer and Metastasis Rev.* **7**: 321-333.
- MacDonald, S. G., Crews, C. M., Wu, L., Driller, J., Clark, R., Erikson, R. L. und McCormick, F. (1993). Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6615-6620.
- Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. und Vogt, P. K. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 2848-2852.

Marais, R., Wynne, J. und Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**: 381-393.

Margolis, B., Rhee, S. G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. und Schlessinger, J. (1989). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signalling. *Cell* **57**: 1101-1107.

Margolis, B., Li, N., Koch, A., Mohammadi, M., Hurwitz, D. R., Zilberstein, A., Ullrich, A., Pawson, T. und Schlessinger, J. (1990). The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-g. *EMBO J.* **9**: 4375-4380.

Matrisian, L. M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG* **6**: 121-125.

Matthias, P., Müller, M. M., Schreiber, E., Rusconi, S. und Schaffner, W. (1989). Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. *Nucl. Acids Res.* **17**: 6418.

Medema, R. H., Wubbolts, R. und Bos, J. L. (1991). Two dominant inhibitory mutants of p21<sup>ras</sup> interfere with insulin-induced gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5963-5967.

Milne, D. M., Campbell, D. G., Caudwell, F. B. und Meek, D. W. (1994). Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **269**: 9253-9260.

Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Dérijard, B., Cobb, M., Davis, R. und Karin, M. (1994). c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6683-6688.

Miskin, R. und Ben-Ishai, R. (1981). Induction of plasminogen activator by UV light in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 6236-6240.

Mitchell, P. J. und Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.

Mori, S., Rönstrand, L., Yokote, K., Engström, A., Courtneidge, S. A., Claesson-Welsh, L. und Heldin, C.-H. (1993). Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF b-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* **12**: 2257-2264.

- Nakazawa, H., English, D., Randell, P. L., Nakazawa, K., Martel, N., Armstrong, B. K. und Yamasaki, H. (1994). UV and skin cancer: Specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 360-364.
- Nishikura, K. und Murray, J. M. (1987). Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 639-649.
- Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk-substrate interaction. *EMBO J.* **12**: 933-941.
- Ofir, R., Dwarki, V. J., Rashid, D. und Verma, I. M. (1990). Phosphorylation of the C-terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* **348**: 80-82.
- Parsons, T. und Weber, M. J. (1989). Genetics of src: structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **147**: 79-127.
- Pietras, R. J., Fendly, B. M., Chazin, V. R., Pegram, M. D., Howell, S. B. und Slamon, D. J. (1994). Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* **9**: 1829-1838.
- Piette, J. und Yaniv, M. (1987). Two different factors bind to the a-domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancers. *EMBO J.* **6**: 1331-1337.
- Pingout, V., Zinck, R., Hipskind, R. A., Janknecht, R. und Nordheim, A. (1994). Heterogeneity of ternary complex factors in HeLa cell nuclear extracts. *J. Biol. Chem.* in press.
- Ponta, H., Cato, A. B. C. und Herrlich, P. (1992). Interference of pathway specific transcription factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**: 255-261.
- Prywes, R. und Roeder, R. G. (1986). Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer. *Cell* **47**: 777-784.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**: 670-674.
- Quaite, F. E., Sutherland, B. M. und Sutherland, J. C. (1992). Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature* **358**: 576-578.

Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1993a). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* **12**: 1005-1012.

Radler-Pohl, A., Gebel, S., Sachsenmaier, C., König, H., Krämer, M., Oehler, T., Streile, M., Ponta, H., Rapp, U., Rahmsdorf, H., Cato, A. C. B., Angel, P. und Herrlich, P. (1993b). The activation and activity control of AP-1 (Fos/Jun). In "Annals of the New York Academy of Sciences. Meeting on "Zinc Finger Proteins in Oncogenesis: DNA binding and gene regulation". (G. A. M. Sluyser A.O. Brinkman, R.A. Blankenstein, Ed.) **684**: 127-148.

Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin M., Rütther, U. und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1643-1659.

Rahmsdorf, H. J., Gebel, S., Krämer, M., König, H., Lücke-Huhle, C., Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Stein, B., Auer, H.-P., Vanetti, M. und Herrlich, P. (1992). Ultraviolet irradiation and phorbol esters induce gene transcription by different mechanisms. In "Induced effects of genotoxic agents in eukaryotic cells". (T. G. Rossman, Ed.) Hemisphere Publishing Corporation, Washington, Philadelphia, London, 141-161.

Rao, V. N., Huebner, K., Isobe, M., Ar-Rushdi, A., Croce, C. M. und Reddy, E. S. P. (1989). elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science* **244**: 66-70.

Rao, V. N. und Reddy, E. S. P. (1992). A divergent ets-related protein, Elk-1, recognizes similar c-ets-1 proto-oncogene target sequences and acts as a transcriptional activator. *Oncogene* **7**: 65-70.

Rao, V. N. und Reddy, E. S. P. (1994). elk-1 proteins interact with MAP kinases. *Oncogene* **9**: 1855-1860.

Redemann, N., Holzmann, B., von Räden, T., Wagner, E. F., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992). Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 491-498.

Richter King, C., Borello, I., Porter, L., Comoglio, P. und Schlessinger, J. (1989). Ligand-independent tyrosine phosphorylation of EGF receptor and the erbB2/neu proto-oncogene product is induced by hyperosmotic shock. *Oncogene* **4**: 13-18.

Rivas, J. M. und Ullrich, S. E. (1992). Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for Keratinocyte-derived IL-10. *J. Immunol.* **149**: 3865-3871.

Rivera, V. M., Miranti, C. K., Misra, R. P., Ginty, D. D., Chen, R.-H., Blenis, J. und Greenberg, M. E. (1993). A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6260-6273.

Robbins, D. J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D. und Cobb, M. H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**: 5097-5106.

Roddey, P. K., Garmyn, M., Park, H. Y., Bhawan, J. und Gilchrest, B. A. (1994). Ultraviolet irradiation induces c-fos but not c-Ha-ras proto-oncogene expression in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **102**: 296-299.

Rotem, N., Axelrod, J. H. und Miskin, R. (1987). Induction of urokinase-type plasminogen activator by UV light in human fetal fibroblasts is mediated through a UV-induced secreted protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 622-631.

Rüther, U., Wagner, E. F. und Müller, R. (1985). Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **4**: 1775-1781.

Sachsenmaier, C. und Radler-Pohl, A. (1994). Regulation of the c-Jun activity by phosphorylation. In "The Fos/AP-1 book". (P. Herrlich und P. Angel, Ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 61-70.

Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Müller, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994a). Damage to DNA by UV light and activation of transcription factors. *Biochemical Pharmacology* **47**: 129-136.

Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994b). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UV response. *Cell* **78**: 963-972.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C. und Verma, I. M. (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* **334**: 314-319.

Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**: 383-391.

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *TIBS* **18**: 273-275.

Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. und Ponta, H. (1988). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* **54**: 325-334.

Schönthal, A., Büscher, M., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M. und Herrlich, P. (1989). The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* **4**: 629-636.

Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1984). UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* **37**: 861-868.

Shah, G., Ghosh, R., A., A. P. und Cerutti, P. A. (1993). Mechanism of induction of c-fos by ultraviolet B (290-320 nm) in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res.* **53**: 38-45.

Shaw, P. E., Schröter, H. und Nordheim, A. (1989). The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell* **56**: 563-572.

Smeal, T., Binétruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. und Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**: 494-496.

Smeal, T., Binétruy, B., Mercola, D., Grover-Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U. R. und Karin, M. (1992). Oncoprotein mediated signalling cascade stimulates cJun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3507-3513.

Songyang, Z., et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**: 767-778.

Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5169-5181.

Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der Eb, A. und Rahmsdorf, H. J. (1992). Ultraviolet-radiation induced c-jun gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem. Photobiol.* **55**: 409-415.

Stein, B., Baldwin, A. S., Ballard, D. W., Greene, W. C., Angel, P. und Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF-kB p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* **12**: 3879-3891.

Stoscheck, C. M. und Carpenter, G. (1984). Down regulation of epidermal growth factor receptors: Direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* **98**: 1048-1053.

Theill, L. E., Castrillo, J.-L., Wu, D. und Karin, M. (1989). Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. *Nature* **342**: 945-948.

Thomas, S. M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S. und Brugge, J. S. (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* **68**: 1031-1040.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.

Tratner, I., Ofir, R. und Verma, I. M. (1992). Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-Fos protein augments its transforming potential. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 998-1006.

Treisman, R. (1994). Ternary complex factors: Growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Op. Gen. Dev* **4**: 96-101.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D. und Seeburg, P. H. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**: 418-425.

Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.

Ullrich, S. E. (1994). Mechanism involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV irradiation. *J. Immunol.* **152**: 3410-3416.

Urbanski, A., Schwarz, T., Neuner, P., Krutman, J., Kirnbauer, R., Köck, A. und Luger, T. A. (1990). Ultraviolet light induces increased circulating interleukin 6 in humans. *J. Invest. Dermatol.* **94**: 808-815.

Urness, L. D. und Thummel, C. S. (1990). Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of the *Drosophila* ecdysone-inducible E74A protein. *Cell* **63**: 47-61.

van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. und Verma, I. M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell* **32**: 1241-1255.

van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. und van der Eb, A. J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* **12**: 479-487.

van den Berg, S., Kaina, B., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1991). Involvement of Fos in spontaneous and ultraviolet light induced genetic changes. *Molec. Carcinogenesis* **4**: 460-466.

van Straaten, F., Müller, R., Curran, T., Van Beveren, C. und Verma, I. M. (1983). Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 3183-3187.

Vogt, P. K. und Bos, T. J. (1990). Jun: Oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* **55**: 1-35.

Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. und Cooper, J. A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205-214.

Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J. und Cochran, B. H. (1990). The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J.* **9**: 4477-4484.

Wasilenko, W. J., Nori, M., Testerman, N. und Weber, M. J. (1990). Inhibition of epidermal growth factor receptor biosynthesis caused by the *src* oncogene product, pp60 v-*src*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1254-1258.

Wasilenko, W. J., Payne, D. M., Fitzgerald, D. L. und Weber, M. J. (1991). Phosphorylation and activation of epidermal growth factor receptors in cells transformed by the *src* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 309-321.

Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M. und Chambon, P. (1988). The yeast UAS<sub>G</sub> is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**: 169-178.

White, M. (1994). The IRS-1 signalling system. *Curr. Op. Gen. Dev.* **4**: 47-54.

Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M. und Blenis, J. (1992). Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP-kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**: 1041-1050.

Yayon, A. und Klagsbrun, M. (1990). Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: reversal by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 5346-5350.

Young, A. R. (1994). Cancer of the keratinocytic system. *Internatl. Symposium on Ozone - Sun - Cancer; molecular and cellular mechanisms; prevention*

Zinck, R., Hipskind, R. A., Pingoud, V. und Nordheim, A. (1993). c-fos transcriptional activation and repression correlate temporally with the phosphorylation status of TCF. *EMBO J.* **12**: 2377-2387.