



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5873

**Spezifische Funktionen  
von cFos bei der zellulären  
Antwort auf UV-Strahlung  
und bei der Genregulation  
durch extrazelluläre Stimuli**

**B. Baumann**  
Institut für Genetik

Mai 1997

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte  
FZKA 5873

**Spezifische Funktionen von cFos  
bei der zellulären Antwort  
auf UV-Strahlung und bei der  
Genregulation durch extrazelluläre Stimuli**

**Bernd Baumann**

**Institut für Genetik**

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1997

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

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH**  
**Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Transkriptionsfaktor AP-1 spielt eine essentielle Rolle bei der Umsetzung extrazellulärer Signale in Veränderungen der Genexpression. AP-1 steht als Überbegriff für eine heterogene Gruppe dimerer Proteinkomplexe, deren Unterheiten sich aus den Produkten der *jun*, *fos* und CREB/ATF Genfamilien zusammensetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die spezifische Funktion einer AP-1 Komponente, cFos, bei der AP-1 abhängigen Genexpression und bei der zellulären Antwort auf UV-Strahlung bestimmt.

Die Analyse der TPA-induzierten Expression bekannter AP-1 abhängiger Gene in Zellen ohne funktionelles cFos Protein ermöglichte es drei Klassen von Zielgenen zu identifizieren. Eine Klasse von Zielgenen repräsentiert die 92 kD-Typ IV Kollagenase, deren Expression durch die Abwesenheit von cFos verstärkt wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression der interstitiellen Kollagenase in *c-fos* *-/-* Zellen sowohl basal als auch nach TPA-Induktion signifikant reduziert, während andere Gene (CD44, Stromelysin-1 und -2), im Vergleich zu Wildtyp Zellen, keine Veränderungen im Expressionsmuster aufweisen. Durch *in vivo* und *in vitro* DNA-Bindungsstudien wurde als molekularer Mechanismus dieser differentiellen Expression von Zielgenen in cFos defizienten Zellen Unterschiede in der funktionellen Kompensation des Fehlens von cFos durch das FosB Protein nachgewiesen.

Die Unterschiede in der Expression von AP-1 regulierten Genen, die durch eine Reduktion der DNA-Bindungsaktivität von AP-1 verursacht werden, sind sehr wahrscheinlich für die UV-Hypersensitivität von *c-fos* *-/-* Zellen verantwortlich. Die fehlende Induktion des UV-induzierten extrazellulären Faktors EPIF trägt nicht zu dieser Hypersensitivität bei. Durch die Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese nach UV-Induktion konnten Veränderungen in der Effizienz der DNA-Reparatur in *c-fos* *-/-* Zellen als Ursache für die UV-Hypersensitivität ebenfalls ausgeschlossen werden. Vielmehr kommt es in cFos defizienten Zellen nach UV-Bestrahlung zu einer verstärkten Rate an Apoptose. Diese Daten weisen cFos als kausalen Regulator von solchen zellulären Programmen der Genexpression aus, die unabhängig von der DNA-Reparatur die Überlebensfähigkeit von Zellen gegenüber den zytotoxischen Effekten von UV-Strahlung steuern.

## **Abstract**

### **Specific functions of cFos in the cellular response to UV-irradiation and gene regulation by extracellular stimuli**

The transcription factor AP-1 plays an essential role in the mediation of extracellular signals by changing expression of specific genes. The term AP-1 describes a heterogeneous group of dimeric protein complexes that are composed of the products of the *jun*, *fos* and CREB/ATF gene families. In the study presented here, the specific function of one of the AP-1 components, cFos, was investigated in the AP-1 dependent gene expression by extracellular signals and in the cellular response following UV-irradiation.

The analysis of TPA-induced expression of known AP-1 dependent genes in cells lacking functional cFos protein revealed three classes of target genes. One class of target genes represents the 92 kD-type IV collagenase whose expression is increased due to the lack of cFos. In contrast, both basal and TPA-induced levels of the interstitial collagenase is significantly reduced in *c-fos* *-/-* cells, while expression of other genes (CD44, stromelysin-1 and -2) is not affected differences compared to wild type cells. Using *in vivo* and *in vitro* DNA binding studies the molecular mechanism of these differences in target gene expression in *c-fos* *-/-* cells was shown to be due to differences in the functional compensation of the lack of cFos by the FosB protein.

The differences in expression of AP-1 regulated genes that are caused by a reduction of DNA binding activity of AP-1 are most likely responsible for the UV-hypersensitivity of *c-fos* *-/-* cells. The lack of induction of the UV-inducible extracellular factor EPIF is not involved in the generation of the UV-hypersensitivity. Changes in the efficiency of DNA repair in *c-fos* *-/-* cells was ruled out as a cause for the hypersensitivity by measuring unscheduled DNA synthesis following UV-induction. Rather, in cFos deficient cells an increased rate of apoptosis after UV-irradiation was observed. These data demonstrate that cFos is a causal regulator of cellular programs of gene expression which regulate the survival of cells as a response to the cytotoxic effects of UV-irradiation, independently of DNA repair.

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

## ZUSAMMENFASSUNG

## ABSTRACT

## ABKÜRZUNGEN

<b>EINLEITUNG</b> .....	1
Der Transkriptionsfaktor AP-1.....	1
Regulation der AP-1 Aktivität.....	4
Trankriptionelle Aktivierung der <i>jun</i> und <i>fos</i> Gene.....	4
Post-translationale Regulation der AP-1 Aktivität .....	6
Protein-Protein Interaktionen von AP-1 .....	8
Die Funktion von AP-1 bei der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und der UV-Antwort .....	10
Fragestellung .....	12
<b>ERGEBNISSE</b> .....	14
Überexpression der einzelnen Jun Proteine und einer auf die AP-1 Aktivität transdominant negativ wirkenden Jun Mutante in stabilen Zelllinien.....	18
Funktionelle Analyse der etablierten stabilen Zelllinien: Transkriptionelle Regulation von AP-1 Zielgenen .....	20
Charakterisierung der AP-1 abhängigen Genregulation in Zellen ohne funktionellem cFos Protein .....	23
Die <i>in vivo</i> Proteinbindung am Kollagenase I Promotor ist in <i>c-fos</i> <i>-/-</i> Zellen unverändert.....	29
Partner-spezifische Unterschiede in der Bindung von Jun/Fos Komplexen an TRE-Sequenzen <i>in vitro</i> .....	33
Basale und TPA induzierte Expression von Kollagenase I in <i>c-fos</i> <i>-/-</i> Zellen wird durch Glucocorticoide gehemmt.....	44
Der Verlust von cFos führt zur verstärkten Expression der 92-kD Typ IV Kollagenase .....	45
cFos ist eine essentielle Komponente in der UV-Anwort von Säugetierzellen .....	49
Die UV-induzierte Expression von AP-1 abhängigen Zielgenen und die DNA-Bindung von AP-1 ist in <i>c-fos</i> <i>-/-</i> Zellen reduziert.....	60

<i>c-fos</i> <sup>-/-</sup> Zellen weisen eine erhöhte basale p53 Expression und eine verringerte UV-induzierte Stabilisierung von p53 auf .....	67
<b>DISKUSSION</b> .....	70
Die Funktion von cJun und cFos in der Regulation von AP-1 abhängigen Zielgenen .....	71
Die Rolle von cFos bei der UV-Antwort und der UV-induzierten Expression AP-1 abhängiger Zielgene.....	80
<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b> .....	86
Inhaltsverzeichnis .....	86
Material.....	88
Methoden .....	94
<b>LITERATUR</b> .....	110



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Rinder Serumalbumin
c	zellulär
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol-Transferase
Cd	Cadmiumchlorid
cDNA	"copy"-Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cpm	"counts per minute"
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dI/dC	Desoxyinosin-5'-Phosphat/Desoxycytidin-5'-Phosphat
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	"Enhanced Chemoluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-Bis (2-Aminoethylether)-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
EPIF	Extrazellulärer Proteinsynthese induzierender Faktor
f.c.	Endkonzentration
FCS	Foetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerretich Peroxidase
Il-1α	Interleukin-1α
J	Joule
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter

m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	millimolar
MOPS	3-N-Morphlinopropansulfonsäure
mRNA	"messenger" RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x (in nm)
Ø	Durchmesser
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	"Platelet Derived Growth Factor"
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure)
PIS	Prä-Immuneserum
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDV	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tk	Thymidinkinase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TM	Trockenmilch
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit/Enzymeinheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
vgl.	vergleiche

## **EINLEITUNG**

Eines der wichtigsten molekularbiologischen Grundkonzepte ist das der differentiellen Genregulation, die es einem multizellulären Organismus erlaubt, in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen, räumlich und zeitlich differenziert die Expression seiner Gene zu steuern. Die differentielle Genregulation kommt bei komplexen physiologischen Prozessen wie Entwicklung, Differenzierung und Wachstum, aber auch bei pathologischen Vorgängen wie Zelltransformation zum Tragen. Prinzipiell findet Genregulation in der Zelle auf verschiedenen Ebenen statt: Bei der Initiation, Elongation und Termination der Transkription; bei der Prozessierung des primären Transkripts; beim Transport und bei der Stabilität der mRNA; auf der Ebene der Translation und der post-translationalen Aktivitätskontrolle des Genprodukts. Die Schlüsselrolle bei der Regulation der meisten Gene nimmt jedoch die Aktivierung und Repression der Transkription ein. Dieser Regulationsmechanismus wird von extrazellulären Signalen wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder Hormonen gesteuert, wobei diese aber nicht direkt mit der DNA interagieren, sondern Signaltransduktionskaskaden in den Zellkern initiieren. Am Endpunkt von Signaltransduktionsketten, die von aktivierten Komponenten an der Zellmembran oder im Zytoplasma ausgehen, stehen nukleäre Transkriptionsfaktoren, die die Transkription bestimmter Zielgene aktivieren oder reprimieren.

### **Der Transkriptionsfaktor AP-1**

Einer der wichtigsten Vertreter von Transkriptionsfaktoren, die extrazelluläre Signale in Veränderungen der Genexpression umsetzen, ist das Aktivator-Protein 1 (AP-1; Lee et al., 1987a, b; Angel et al., 1987b). AP-1 reguliert die Genexpression nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Hormonen, UV-Strahlung, chemischen Karzinogenen und Tumor Promotoren (Angel und Karin, 1991). Weiterhin führt die erhöhte Expression onkogener "Versionen" von Komponenten der Signalketten, an deren Ende AP-1 liegt, wie z.B. Src, Ras, Raf oder Mos zur Aktivierung von AP-1 (Herrlich und Ponta, 1989; Angel und Karin, 1991). AP-1 verändert die Transkription von Zielgenen durch Bindung an ein DNA-Motiv mit der Konsensus-Sequenz 5'-T<sup>T</sup>/G A<sup>G</sup>/C TCA-3', die als TRE (TPA responsive element) bezeichnet wird (Angel et al., 1987a, b). Das TRE-Motiv kommt, mit Abweichungen in den flankierenden Sequenzen, im Promotorbereich zahlreicher Gene vor. *In vitro* Mutagenese potentieller TREs im Promotorkontext und Analyse der transkriptionellen Aktivität in transienten Transfektions-

experimenten ermöglichten es bisher mehr als zwanzig verschiedene Gene mit funktionellem TRE zu identifizieren (Busslinger und Bergers, 1994). Diese Gene kodieren hauptsächlich für Wachstumsfaktoren, Hormone, Metalloproteasen, Transkriptionsfaktoren oder Zelltyp spezifische Genprodukte, z.B. Kollagenase (Angel et al., 1987a, b), Stromelysin (Kerr et al., 1988), Urokinase (Nerlov et al., 1991), Plasminogen-Aktivator (Medcalf et al., 1990), TGF- $\beta$ 1 (Kim et al., 1990), NGF (Hengerer et al., 1990), Osteocalcin (Schüle et al., 1990a), Metallothionein (Lee et al., 1987a, b), CD44 (Hofman et al., 1993), *c-jun* (Angel et al., 1988b) und *fra-1* (Bergers et al., 1995).

AP-1 ist der Sammelbegriff für Proteindimere, deren Untereinheiten sich aus den Produkten der *jun* (*c-jun*, *junB*, *junD*), *fos* (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*) und CREB/ATF (ATF-2, ATF-a) Genfamilien zusammensetzen (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988a; Bos et al., 1988; Hirai et al., 1989; Ryder et al., 1989; Rauscher et al., 1988a, b; Zerial et al., 1989; Cohen et al., 1989; Matsui et al., 1990; Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991). Die strukturelle Organisation der Jun, Fos und CREB/ATF Proteine zeichnet sich durch eine stark konservierte Abfolge von ca. 60 Aminosäuren aus, die als bZIP-Region bezeichnet wird (Landschulz et al., 1988). Charakteristisch für diese Region sind zwei unabhängig voneinander agierende Proteindomänen, die als "basische Region" und "Leuzin-Zipper" klassifiziert werden. Die basische Region ist durch eine Anhäufung von basischen Aminosäuren (12-14 AS) gekennzeichnet (Vogt und Bos, 1990) und ist für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung durch ionische Wechselwirkungen verantwortlich. Unabdingbare Voraussetzung für die DNA-Bindung von AP-1 ist jedoch die Dimerisierung, die durch den Leuzin-Zipper vermittelt wird (Kouzarides und Ziff, 1988; Sassone-Corsi et al., 1988b; Gentz et al., 1989; Turner und Tjian, 1989; Neuberger et al., 1989). Der Leuzin-Zipper ist ein Strukturmotiv, das eine  $\alpha$ -helikale Anordnung aufweist und bei dem jede siebte Aminosäure ein Leuzin ist (Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989a, b). Die an einer Seite der  $\alpha$ -Helix exponierten Leuzin-Seitenketten und zusätzliche hydrophobe Aminosäuren zwischen den Leuzinen bewirken eine stark hydrophobe Oberfläche, über die die Dimerisierung erfolgt. Dieser Typ von Dimerisierung ist als *coiled-coil* Wechselwirkung bei paralleler Orientierung der Partner definiert.

Die Spezifität der Dimerbildung zwischen Proteinen mit Leuzin-Zipper wird über ein komplexes Netzwerk von ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der *coiled-coil* Konfiguration bestimmt (Schürmann et al., 1991; O'Shea et al., 1992; Glover und Harrison, 1995). Elektrostatische Abstoßungskräfte verhindern z.B. die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren innerhalb der Fos-

Familie, während Jun/Fos Heterodimere elektrostatisch stabilisiert werden. Sowohl Jun als auch CREB/ATF Proteine sind in der Lage Homodimere zu bilden. Diese Dimere sind jedoch deutlich weniger stabil als Jun/Fos Heterodimere. Weiterhin bilden Mitglieder der Jun und CREB/ATF Protein-Familie Heterodimere aus, wobei diese bevorzugt an das CRE-Sequenzmotiv (cAMP responsive element) binden, das ein zusätzliches Basenpaar (5'-TGACGTCA-3') im Vergleich zum TRE aufweist (Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991; van Dam et al., 1993; Chatton et al., 1994). Auf Grund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Jun, Fos und CREB/ATF-2 Proteinen ergeben sich theoretisch mehr als hundert verschiedene Kombinationen für die Dimerisierung. Ob diese große Anzahl von AP-1 Isoformen auch *in vivo* vorliegt, ist nicht bekannt. Auf Grund der geringen Unterschiede in der DNA-Sequenzspezifität, und vor allem hinsichtlich klarer Unterschiede in den Transaktivierungseigenschaften zwischen den verschiedenen AP-1 Komponenten (Deng und Karin, 1993; Ryseck und Bravo, 1991; Hai und Curran, 1991; Chiu et al., 1989; Hirai et al., 1989; Deutsch et al., 1988) ist anzunehmen, daß einzelnen Dimer-Kombinationen eine spezifische Rolle bei der Regulation von AP-1 abhängigen Prozessen zukommt.

Entsprechend der Funktion als Transkriptionsfaktor besitzen Jun, Fos und CREB/ATF Proteine ein weiteres Strukturmotiv (Transaktivierungsdomäne, TAD), das für die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen erforderlich ist. Am besten untersucht ist hierbei die TAD der Jun-Proteine. Sie befindet sich am N-Terminus und wird in drei Sub-Domänen unterteilt, die durch eine Anhäufung negativ geladener Aminosäuren charakterisiert sind (Angel et al., 1989; Hirai et al., 1990). Diese Domänen sind notwendig, um den Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie herzustellen und eine effiziente Transkription zu initiieren. Die Interaktion von Jun mit der basalen Transkriptionsmaschinerie ist nicht direkt, sondern wird über einen Koaktivator vermittelt (Oehler und Angel, 1992; Bannister et al., 1995).

Im Gegensatz zur TAD der Jun-Proteine ist die Transaktivierungsdomäne der Fos und CREB/ATF Proteine bisher weniger präzise bestimmt worden. Durch Deletionsanalysen wurde gezeigt, daß ein N-terminaler Bereich von ATF-2 essentiell für die Transaktivierungsfunktion des Proteins ist (Livingstone et al., 1995; Gupta et al., 1995). In allen vier Fos-Proteinen wurde in direkter Nachbarschaft (N-terminal) von der bZIP-Region eine Transaktivierungsdomäne identifiziert, die durch negativ geladene Aminosäuren gekennzeichnet ist (Abate et al., 1991; Lucibello et al., 1991). In der N-terminalen Hälfte von cFos wurde eine weitere Domäne nachgewiesen, die für die Transaktivierung wichtig ist (Lucibello

et al., 1991). Zusätzlich liegen im C-Terminus von cFos zwei TAD vor, die starke Homologien zu den Transaktivierungsdomänen der Jun-Proteine aufweisen (Sutherland et al., 1992). In FosB fehlen diese Domänen. FosB enthält jedoch eine Prolin-reiche Domäne mit Transaktivierungspotential im C-Terminus (Mermod et al., 1989; Wisdom et al., 1992).

### **Regulation der AP-1 Aktivität**

Die AP-1 Aktivität wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert: Transkriptionelle Regulation der *jun* und *fos* Gene, Transport der abgeleiteten Proteine in den Zellkern, Modulation der DNA-Bindungsaffinität und Transaktivierungskapazität der AP-1 Proteine durch postranslationale Modifikationen, Interaktionen mit anderen zellulären oder viralen Proteinen, mRNA-Stabilität und Proteindegradation.

### **Transkriptionelle Aktivierung der *jun* und *fos* Gene**

Die *jun* und *fos* Gene gehören der Klasse der sehr frühen Gene an, die durch eine schnelle und transiente Aktivierung der Transkription nach Induktion mit externen Stimuli charakterisiert sind. Die Aktivierung der Transkription kann ohne Neusynthese von Proteinen erfolgen (Greenberg und Ziff, 1984; Angel et al., 1988b; Ryseck et al., 1988; Lamph et al., 1988), was darauf schließen läßt, daß die Induktion dieser Gene durch post-translationale Modifikationen von bereits in der Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren erfolgt. Wachstumsfaktoren, Cytokine, Tumorpromotoren, Karzinogene und Expression verschiedener Onkogene induzieren innerhalb von 15 Minuten die Transkription von *c-jun*, *junB* und in weit geringerem Ausmaß von *junD*. Die verstärkte Transkription dieser Gene kehrt danach innerhalb von zwei bis drei Stunden wieder auf Basalwerte zurück (Ryder et al., 1989; Hirai et al., 1989; Angel und Karin, 1991). In Abhängigkeit vom extrazellulären Signal kommt es sowohl bei der absoluten Induktionsstärke als auch in der Induktionskinetik zu Abweichungen. Zum Beispiel führt eine Induktion mit TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$  zu einer langanhaltenden *c-jun* Expression (Brenner et al., 1989; Kim et al., 1990; Pertovaara et al., 1989).

Die Transkription der *fos* Gene wird durch das gleiche Set an extrazellulären Signalen, wie bereits für die *jun* Gene beschrieben, aktiviert. Es treten jedoch signifikante Unterschiede in der Induktionskinetik der verschiedenen *fos* Gene auf (Angel und Karin, 1991; Schuermann, 1994). Während *c-fos* und *fosB* sehr schnell (in weniger als 15 Minuten) durch TPA oder Serum induziert werden, erfolgt die transkriptionelle Aktivierung von *fra-1* und *fra-2* erst nach 30 Minuten und bleibt

bis zu drei Stunden bestehen. Die aktivierte Transkription von *c-fos* ist transient und erreicht innerhalb 90 Minuten wieder Basalwerte. Im Unterschied dazu wird die *fosB* Induktion innerhalb von zwei bis drei Stunden abgeschaltet. Da die Promotoraktivitäten der *jun* und *fos* Gene unabhängig von *de novo* Proteinbiosynthese reguliert werden, ist es allgemein anerkannt, daß Transkriptionsfaktoren, die schon in nicht-stimulierten Zellen vorliegen, durch post-translationale Modifikationen aktiviert werden und es dadurch zur transkriptionellen Aktivierung der entsprechenden Zielgene kommt. Obwohl alle *jun* und *fos* Gene zur Klasse der frühen Gene zählen, kommt es in Abhängigkeit vom extrazellulären Signal zu einer differentiellen Expression dieser Gene, da in deren Promotorsequenzen unterschiedliche, für die Aktivität des Promotors notwendige *cis*-Elemente vorliegen.

Die an die *cis*-Elemente des *c-jun* und *c-fos* Gens bindenden Transkriptionsfaktoren und ihre Funktion bei der transkriptionellen Aktivierung sind detailliert untersucht worden. Zwei Sequenzmotive (Jun1 und Jun2) im *c-jun* Promotor, die Ähnlichkeit mit der AP-1 Bindungsstelle haben, erwiesen sich als essentielle *cis*-Elemente für die transkriptionelle Aktivierung durch TPA und UV-Strahlung (Angel et al., 1988b; Stein et al., 1992; Herr et al., 1994). An diese Sequenzmotive, die im Vergleich zum TRE ein zusätzliches Basenpaar in der Mitte der Kernsequenz haben, binden präferentiell cJun/ATF-2 Heterodimere (van Dam et al., 1993; Herr et al., 1994). Durch *in vivo footprint* Experimente konnte nachgewiesen werden, daß im nicht stimulierten Zustand mehrere *cis*-Elemente (Jun1, Jun2, NF-Jun, SP-1, FP) im *c-jun* Promotor eine konstitutive Proteinbesetzung aufweisen und sich diese nach TPA- oder UV-Induktion nicht ändert (Rozek und Pfeifer, 1993; Hagmeyer et al., 1993; Herr et al., 1994). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß post-translationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen), die an Promotor-gebundenen cJun/ATF Komplexen angreifen, sowohl die Aktivierung als auch die nachfolgende Abschaltung der *c-jun* Transkription (nach TPA und UV-Strahlung) regulieren (Mechta und Yaniv, 1994).

Eine vergleichbare Situation liegt am *c-fos* Promotor vor, bei dem das SRE-Sequenzmotiv (SRE, serum responsive element) essentiell für die transkriptionelle Aktivierung durch TPA und UV-Strahlung ist (Büscher et al., 1988). An das SRE-Element bindet ein ternärer Komplex, der aus einem SRF-Dimer (SRF, serum response factor) und p62 TCF (TCF, ternary complex factor) besteht (Treisman, 1987; Shaw et al., 1989). Während aller Aktivitätszustände des *c-fos* Promotors bleibt die Proteinbesetzung am SRE unverändert bestehen (Herrera et al., 1989; König, 1991). Auch die Aktivität des *c-fos* Promotors scheint über post-translationale Modifikationen, die an TCF und SRF Proteinen angreifen, reguliert

zu werden (Nordheim et al., 1994). Da auch die *junB*, *fosB* und *fra-2* Promotoren ein SRE-Element besitzen und die transkriptionelle Aktivierung dieser Gene unabhängig von Protein-Neusynthese ist, kann man annehmen, daß diese SRE-Elemente eine vergleichbare Funktion wie das SRE im *c-fos* Promotor einnehmen.

Obwohl die SRE und AP-1 ähnlichen Sequenzmotive eine Schlüsselrolle bei der schnellen transkriptionellen Aktivierung der *jun* und *fos* Gene nach TPA oder UV-Induktion spielen, können andere *cis*-Elemente in den jeweiligen Promotoren die Basalaktivität modulieren und/oder die Induktion kooperativ beeinflussen. Zum Beispiel führt eine selektive Mutation der SP-1, NF-Jun und CTF Elemente im *c-jun* Promotor zu einer Verringerung der basalen und der induzierten (TPA, UV) Promotoraktivität (Unlap et al., 1992; van Dam et al., 1993; Herr, 1995).

### **Post-translationale Regulation der AP-1 Aktivität**

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind die bekanntesten post-translationalen Modifikationen zur Aktivitätskontrolle von Proteinen (Hunter und Karin, 1992). Auf Grund der Phosphorylierung von Serinen und Threoninen (Serine in Position 243 und 249; Threonine in Position 231 und 239) innerhalb der DNA-Bindungsdomäne weist cJun in nicht-stimulierten Zellen eine geringe DNA-Bindungsaffinität auf (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Diese Phosphorylierungen werden vermutlich durch Caseinkinase II (CKII) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) vermittelt (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Eine negative Regulation der DNA-Bindung durch GSK3 wurde auch für JunB und JunD beschrieben (de Groot et al., 1993; Nikolakaki et al., 1993). Die Behandlung von Zellen mit TPA und UV-Strahlung führt zu einer Hypophosphorylierung der cJun DNA-Bindungsdomäne und damit zu einer Verstärkung der DNA-Bindung (Boyle et al., 1991; Devary et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Nach Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstellen für GSK3 und CKII in der DNA-Bindungsdomäne von cJun, weist dieses Protein, im Vergleich zum Wildtyp Protein, ein höheres Transaktivierungspotential auf, da wahrscheinlich die DNA-Bindungsaffinität nicht mehr durch Phosphorylierungen negativ reguliert werden kann (Hagmeyer et al., 1993). Ob die Verstärkung der DNA-Bindung nach TPA- oder UV-Induktion auf einer Aktivierung spezifischer Phosphatasen oder Inaktivierung von GSK3 und CKII beruht, ist bisher nicht geklärt.

Obwohl die Fos-Proteine *in vitro* durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden können, scheint die post-translationale Phosphorylierung keinen Einfluß auf die DNA-Bindungsaffinität zu haben. Eine Ausnahme bilden Fra-1 und Fra-2, deren DNA-Bindung durch Phosphorylierung mit MAP-Kinase verstärkt werden



kann (Gruda et al., 1994). ATF-2 Proteine werden ebenfalls durch MAP-Kinase phosphoryliert, wodurch ihre DNA-Bindungsfähigkeit stark erhöht wird (Abdel-Hafiz et al., 1992).

Andererseits unterliegen Jun und Fos Proteine einem Regulationsmechanismus, der die DNA-Bindung durch Reduktion und Oxidation eines einzelnen Cysteins in der DNA-Bindungsdomäne kontrolliert (Abate et al., 1990). *In vitro* führt Oxidation zur Hemmung der DNA-Bindung, während Reduktionsmittel (z.B. DTT) oder ein zellulärer Faktor (Ref-1), der Redoxaktivitäten besitzt, die DNA-Bindung wieder herstellen kann (Xanthoudakis et al., 1992). Die alleinige Mutation des Cysteins (an Position 252) im cJun-Protein kann jedoch keine Redox-unabhängige Regulation der DNA-Bindung vermitteln. Dazu ist die zusätzliche Mutation einer der oben beschriebenen Phosphorylierungsstellen (Serin 243) in der DNA-Bindungsregion notwendig (Oehler et al., 1993; Morgan et al., 1993). Interessanterweise liegen im vJun Protein, dem viralen Gegenstück zu cJun, diese beiden Mutationen vor. Dadurch entzieht sich vJun den negativ wirkenden Regulationsmechanismen der DNA-Bindung und besitzt eine konstitutiv maximale Bindungsaktivität. Die entsprechende Cystein-Mutation im cFos-Protein ist ausreichend, um dessen DNA-Bindung zu verstärken und unter oxidativen Bedingungen die Hemmung der DNA-Bindung zu verhindern (Okuno et al., 1993).

Unabhängig von der Regulation der DNA-Bindung wird auch die Transaktivierungskapazität verschiedener Jun, Fos und CREB/ATF-2 Proteine durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung kontrolliert. Zum Beispiel führt die Behandlung von Zellen mit TPA, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, alkylierenden Agenzien oder UV-Strahlung zur Phosphorylierung zweier Serine (Position 63 und 73) in der Transaktivierungsdomäne von cJun, wodurch dessen transkriptionelle Aktivität stark erhöht wird (Pulverer et al., 1991; Devary et al., 1992, Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993; Sachsenmaier et al., 1994; van Dam et al., 1995; Wilhelm et al., 1995). Außerdem kann die Phosphorylierung der Serine durch verschiedene Onkogen-Produkte wie Ha-Ras, Raf und Src induziert werden (Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991, 1992). Verantwortlich dafür sind die Kinasen ERK1 und ERK2 (extracellular signal regulated protein kinase) sowie JNK1 und JNK2 (cJun N-terminal kinase), die zur Familie der MAP-Kinasen (mitogen activated protein Kinase) gehören (Pulverer et al., 1991, 1993; Hibi et al., 1993; Derijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994).

Im Gegensatz zu cJun kann das Transaktivierungspotential von JunB nach TPA-Induktion nicht durch Phosphorylierung gesteigert werden (Franklin et al., 1992). Dagegen führt die Behandlung von Zellen mit alkylierenden Agenzien und

UV-Strahlung (jedoch nicht TPA) zur Steigerung der Transaktivierungskapazität von ATF-2, indem es zur Phosphorylierung zweier Threonine (Threonin 69 und 71) innerhalb der TAD kommt, die von JNK1 und JNK2 vermittelt wird (Hibi et al., 1993; Kyriakis et al., 1994; van Dam et al., 1995; Livingstone et al., 1995; Gupta et al., 1995). Die gleichen Phosphorylierungen des ATF-2 Proteins werden auch von der p38 MAP-Kinase nach Stimulation mit UV-Strahlung,  $Il-1\alpha$  und  $TNF-\alpha$  ausgeführt (Raingeaud et al., 1995). Die transkriptionelle Aktivität von cFos wird durch Phosphorylierung eines Threonins im C-terminalen Bereich des Proteins verstärkt (Deng und Karin, 1994). Die dafür verantwortliche Kinase weist Homologien zu den MAP- und Jun-Kinasen auf und wird als Fos-regulierende Kinase (p88 FRK) bezeichnet. Die Phosphorylierungs-Aktivität von p88 FRK kann durch EGF und Ha-Ras induziert werden, während TPA und UV-Strahlung ohne Einfluß bleiben (Deng und Karin, 1994).

### **Protein-Protein Interaktionen von AP-1**

Auf Grund der differentiellen transkriptionellen Aktivierung der für AP-1 kodierenden Gene sind zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion unterschiedliche Populationen von dimeren Komplexen in der Zelle vorhanden. Zusätzlich unterliegen diese Proteine post-translationalen Modifikationen, die individuell verschiedene Auswirkungen auf die DNA-Bindungsaffinität und Transaktivierungskapazität der einzelnen Jun-, Fos- und CREB/ATF-2 Proteine haben. Deshalb hängt die transkriptionelle Aktivierung von AP-1 Zielgenen entscheidend davon ab, welche AP-1 Untereinheiten miteinander homo- bzw. heterodimerisieren, da die Kombination der Partner die DNA-Bindungsaffinität, Transaktivierungsfähigkeit und Sequenzspezifität der formierten AP-1 Komplexe bestimmt. So sind cJun-Homodimere effiziente Aktivatoren des menschlichen Kollagenase-Promotors, während JunB und JunD Homodimere, sowie cJun/JunB Heterodimere nur schwach transaktivieren (Chiu et al., 1989; Hirai et al., 1989, Deng und Karin, 1993). cJun/cFos Heterodimere zeigen eine verstärkte DNA-Bindung im Vergleich zu Jun/Jun Homodimeren und sind starke Transaktivatoren (Yang-Yen et al., 1990b; Ryseck und Bravo, 1991). In Bezug auf die Abhängigkeit der DNA-Sequenz-Spezifität von der Dimer-Zusammensetzung konnte nachgewiesen werden, daß cJun/ATF-2 Komplexe, im Gegensatz zu Jun/Fos Dimeren, bevorzugt an ein CRE-Sequenzmotiv binden (Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991).

Ein spezifisches Inhibitorprotein (IP-1), das die AP-1 DNA-Bindung durch direkte Wechselwirkung reguliert, wurde von Auwerx und Sassone-Corsi (1991,

1992) beschrieben. Der genaue molekulare Mechanismus ist nicht bekannt, jedoch führt die Behandlung von Zellen mit TPA zu einer bisher nicht verstandenen Inaktivierung von IP-1, was in einer effizienten DNA-Bindung von AP-1 resultiert. Desweiteren kann der muskelspezifische Transkriptionsfaktor MyoD mit cJun, JunB und cFos interagieren, wodurch wechselseitig die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen verhindert wird (Bengal et al., 1992; Li et al., 1992). Dagegen wurde eine synergistische Wechselwirkung zwischen AP-1 und dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B festgestellt (Stein et al., 1993). Während Überexpression von Jun und Fos die Transkription von NF $\kappa$ B-abhängigen Zielgenen verstärkt, werden umgekehrt AP-1 abhängige Promotoren durch Überexpression der p65-Untereinheit von NF $\kappa$ B aktiviert.

Ein intensiv untersuchter Mechanismus der Regulation der AP-1 Aktivität durch Protein-Protein Interaktion ist die Interferenz zwischen AP-1 und dem aktivierten Glucocorticoidrezeptor (GR). Die TPA induzierte Expression AP-1 abhängiger Zielgene (z.B. Kollagenase, Stromelysin) wird durch Glucocorticoide fast vollständig gehemmt und erfolgt über einen Mechanismus der den aktivierten GR und das TRE benötigt (Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990a; Schüle et al., 1990b). Der Glucocorticoidrezeptor reduziert die Transaktivierungsfähigkeit von AP-1, ohne jedoch die DNA-Bindung des AP-1 Komplexes aufzuheben, was nahelegt, daß die AP-1/GR-Interaktion eine effiziente Wechselwirkung mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verhindert (König et al., 1992). Interessanterweise scheint der GR zwischen verschiedenen Komponenten der AP-1 Familie unterscheiden zu können. So ist der GR in der Lage in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des AP-1 Komplexes die Transkription negativ (z.B. cJun/cFos) oder positiv (z.B. cJun/cJun) zu beeinflussen (Diamond et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995).

Im Gegensatz zur AP-1/GR-Interaktion, die keinen Einfluß auf die DNA-Bindung hat, basiert die reprimierende Wirkung des viralen E1A-Proteins auf AP-1 abhängige Zielgene wie z.B. Kollagenase, Stromelysin und CD 44 (Offringa et al., 1990; Frisch et al., 1990; Hofmann et al., 1993) darauf, daß die DNA-Bindung von AP-1 an das TRE durch einen indirekten Mechanismus verhindert wird (Hagmeyer et al., 1993).

## Die Funktion von AP-1 bei der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und der UV-Antwort

Die vorgestellten Regulationsmechanismen der AP-1 Aktivität einer Zelle sind die Grundlage für die postulierte Funktion von AP-1 bei der Regulation von sehr komplexen biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung oder Transformation (Angel und Karin, 1991). Der erste direkte Hinweis auf die Rolle von AP-1 bei der Zellproliferation war der Befund, daß Mikroinjektion von Jun-spezifischen Antikörpern oder TRE-enthaltenden Kompetitions-Oligonukleotiden die Zellzyklus-Progression verhindern und die DNA-Synthese hemmen (Kovary und Bravo, 1991a, b; Riabowol et al., 1992). Mikroinjektion von cFos-spezifischen Antikörpern allein hat keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. Eine Hemmung der DNA-Synthese kann nur durch Koinjektion von Antikörpern, die spezifisch für andere Fos Proteine sind, erreicht werden (Kovary und Bravo, 1991b). Dieser Befund macht deutlich, daß bei der Zellproliferation vor allem die Jun Proteine eine spezifische Funktion inne haben, während cFos entweder keine Funktion bei der Zellproliferation besitzt, oder daß eine funktionelle Kompensation durch andere Fos Proteine auftritt. Umgekehrt haben langanhaltende Überexpressionen bestimmter Jun und Fos Proteine eine unkontrollierte Proliferation zur Folge, die, in Abhängigkeit vom überexprimierten Protein, zur Zell-Transformation führt. So kann z.B. JunB, im Vergleich zu cJun (in Kooperation mit Ha-Ras), primäre Rattenembryonalzellen in einem weit geringeren Ausmaß transformieren und wirkt dem Transformationspotential von cJun entgegen (Schütte et al., 1989a, b). Die Fähigkeit von cJun Zellen zu transformieren scheint unabhängig von Fos zu sein (Schütte et al., 1989a, b). cFos und FosB weisen ein starkes Transformationspotential in etablierten Rattenfibroblasten auf, während Fra-1 und Fra-2 diese Zellen nicht transformieren können (Wisdom und Verma, 1993). Es ist jedoch unklar, welche Dimerpartner an der Zell-Transformation durch cFos und FosB beteiligt sind.

Bei der Entwicklung eines multizellulären Organismus differenzieren omnipotente Zellen zu Zelltypen, die spezifische biologische Funktionen erfüllen. Für diese Differenzierungsprozesse sind Veränderungen der Genexpression erforderlich, die durch Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Hinweise für eine regulatorische Funktion von AP-1 bei der Differenzierung wurden in Experimenten mit undifferenzierten F9 Teratokarzinom Zellen gefunden. *In vitro* Differenzierung von F9-Zellen durch Behandlung mit Retinsäure wird von einer verstärkten Expression von *c-jun* und *c-fos* begleitet und führt zur Expression von Genen, die als Marker der verschiedenen Stadien der Differenzierung von endodermalen Zellen

dienen (Müller und Wagner, 1984; Yang-Yen et al., 1990b; Auer et al., 1994). Durch Überexpression von cJun und cFos werden F9-Zellen zur Differenzierung und Expression der charakteristischen Markergene von endodermalen Zellen induziert (Müller und Wagner, 1984; Yang-Yen et al., 1990b).

Entscheidende Beweise für die zentrale Rolle von AP-1 bei zellulären Prozessen kommen von transgenen Mäusen, bei denen die verschiedene *jun* und *fos* Gene selektiv ausgeschaltet oder überexprimiert wurden. Mit Hilfe der "gene targeting" Technik war es möglich die chromosomalen Genloci von *c-jun*, *junB*, *junD*, *fosB*, *c-fos* und *fra-1* durch homologe Rekombination zu inaktivieren. Dabei wurde festgestellt, daß die Expression von *c-jun*, *junB* und *fra-1* während der murinen Embryonalentwicklung lebensnotwendig ist und keine gegenseitige Kompensation durch andere Mitglieder der AP-1 Familie auftritt (Johnson et al., 1993; Hilberg et al., 1993; M. Schorpp, persönliche Mitteilung; M. Schreiber, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu sind *junD*-negative Mäuse lebensfähig. Es liegen aber bisher keine Erkenntnisse vor, ob zu späteren Zeitpunkten nach der Geburt phänotypische Veränderungen auftreten (M. Yaniv, persönliche Mitteilung). *FosB* defiziente Mäuse sind ebenfalls lebensfähig und weisen keine postnatalen Entwicklungsstörungen auf (M. Schreiber, persönliche Mitteilung). Bei *c-fos* *-/-* Mäusen treten ab dem 10. Tag nach der Geburt gewebespezifische Defekte auf. Die Tiere haben ein verändertes Knochenwachstum und entwickeln eine schwere Osteopetrose, da es zu keiner terminalen Differenzierung der Osteoclasten kommt (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992; Grigoriadis et al., 1994).

Diese Befunde demonstrieren eindeutig, daß die Jun und Fos Proteine essentiell für bestimmte physiologische Prozesse sind und nur eine sehr partielle Redundanz zwischen einzelnen AP-1 Proteinen besteht. Die AP-1 Zielgene, die für Entwicklung, Proliferation, Differenzierung oder Transformation von Zellen verantwortlich sind, konnten bisher nicht identifiziert werden. Es muß aber angenommen werden, daß deren Expression von individuellen AP-1 Isoformen abhängt.

UV-Strahlung induziert in Säugetierzellen ein genetisches Programm, das unter dem Begriff "UV-Antwort" zusammengefaßt wird (Karin und Herrlich, 1989). Die UV-Antwort ähnelt stark den genetischen Reaktionen einer eukaryontischen Zelle auf andere DNA-schädigende Agenzien wie z.B. chemische Karzinogene oder ionisierende Strahlung. Im Gegensatz zur SOS-Antwort in Prokaryonten sind jedoch die wenigsten der UV-induzierbaren Genprodukte direkt an der Reparatur geschädigter DNA beteiligt (Herrlich et al., 1992). Trotzdem kann eine erhöhte Resistenz von Zellen gegenüber UV-Schädigung durch eine Vorbehandlung mit

niederen UV-Dosen induziert werden (Keyse, 1993). Es scheint also, daß auch die induzierbaren Genprodukte, die nicht unmittelbar in die Reparatur UV-geschädigter DNA involviert sind, zum Schutz der Zelle beitragen.

Zu den ersten Genen, die durch UV-Strahlung aktiviert werden, gehören *c-jun* und *c-fos* (Büscher et al., 1988; Stein et al., 1989; Devary et al., 1991). Die UV-induzierte Expression von *c-fos* und *c-jun* beruht zum einen auf einer Aktivierung von schon vorhandenen Proteinen durch post-translationale Modifikationen, zum anderen auf Protein-Neusynthese. Zusammen führt dies zu einer erhöhten AP-1 Aktivität und damit zur Expression von Zielgenen wie z.B. Kollagenase und Metallothionein (Angel et al., 1986, 1987a). Bisher sind jedoch keine AP-1 Zielgene bekannt, deren Produkte an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Metallothionein trägt jedoch zur Detoxifizierung von DNA-schädigenden Substanzen (chemische Karzinogene) bei und erzeugt bei Überexpression Resistenz gegenüber diesen Substanzen (Kelley et al., 1988; Kaina et al., 1990). Ob Überexpression von Metallothionein auch zur Resistenz gegenüber UV-Strahlung führt, wurde bisher nicht untersucht. Umgekehrt gibt es aber Hinweise darauf, daß AP-1 regulierte Genexpression zur Protektion gegenüber den toxischen Effekten von UV-Strahlung beiträgt. Zum Beispiel weisen HeLa Zellen, die mit Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt wurden (Hemmung der UV-induzierte Signaltransduktion, die zur Aktivierung von AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren führt), eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung auf (Devary et al., 1992). Desweiteren konnte bei verschiedenen Hefemutanten nachgewiesen werden, daß die GCN4 Funktion (eines der AP-1 homologen Proteine in Hefe) mit der Resistenz gegen UV-Strahlung korreliert (Engelberg et al., 1994).

## **Fragestellung**

Trotz struktureller Homologien gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß die einzelnen *Jun* und *Fos* Proteine unterschiedliche Funktionen bei der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung inne haben: Die transkriptionelle Aktivierung der *jun* und *fos* Gene verläuft infolge der verschieden aufgebauten Promotoren nicht koordiniert, sondern weist in Abhängigkeit vom extrazellulären Signal quantitative und qualitative Unterschiede auf. Die Transaktivierungskapazitäten der einzelnen AP-1 Proteine variieren sehr stark und können durch post-translationale Phosphorylierungen spezifisch reguliert werden. Die Konsequenz daraus ist, daß, abhängig von der basalen oder induzierten Expression der einzelnen Jun und Fos Proteine, die Gesamt-AP-1 Aktivität positiv oder negativ durch das Verhältnis der differentiell wirkenden Einzelkomponenten reguliert wird, d.h. die zu einem

gegebenen Zeitpunkt in der Zelle vorliegenden AP-1 Proteine und deren Dimerkombinationen bestimmen den aktuellen Aktivitätszustand von AP-1.

Die Messung der Gesamt-AP-1 Aktivität, bzw. die Bestimmung der Expression einzelner *jun* und *fos* Gene läßt jedoch keinen Rückschluß auf die spezifische Funktion individueller Jun und Fos Proteine bei AP-1 abhängigen Prozessen zu. Erstrebenswert sind daher definierte zelluläre Systeme, in denen selektiv die Expression einer AP-1 Komponente kontrolliert werden kann, um deren Funktion bei der Regulation von Zielgenen zu bestimmen.

Daraus ergibt sich als zentrale Aufgabenstellung für diese Arbeit die Charakterisierung der spezifischen Funktion der Jun und Fos Proteine bei der Genregulation durch TPA und UV-Strahlung. Hierfür sollten zelluläre Systeme etabliert werden, die es erlauben, die Konsequenzen

- der Überexpression einzelner Jun Proteine
- der Inaktivierung der Gesamt-AP-1 Aktivität
- aus dem Verlust eines einzelnen Mitglieds der AP-1 Familie (*c-fos*) zu analysieren.

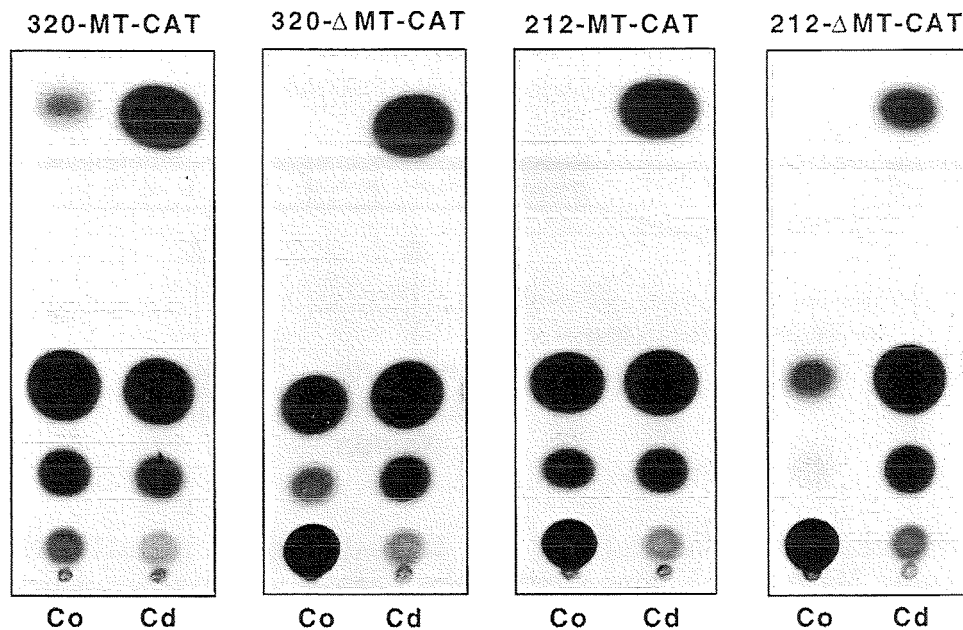
## ERGEBNISSE

Eine Möglichkeit, um die Funktion bestimmter Jun Proteine bei der Regulation von Zielgenen oder deren Einfluß auf zelluläre Prozesse wie Proliferation zu untersuchen, ist die ektopische Überexpression in Gewebekultur. Eine konstitutive Überexpression dieser Proteine z.B. durch Verwendung der Promotor/Enhancer Sequenzen des LTR des Rous Sarcoma Virus kann zu indirekten, die Genexpression verändernden Effekten führen, die eine eindeutige Interpretation der Funktion der überexprimierten Proteine unmöglich machen. Außerdem ist es bei einer konstitutiven Expression nicht möglich schnelle Effekte der exprimierten Proteine zu studieren. Deshalb habe ich für die Überexpression der verschiedenen Jun Proteine ein Expressionsvektorsystem gewählt, das unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht. Dabei wurde der Promotor des menschlichen Metallothionein IIa (MT IIa) Gens verwendet. Dieser läßt sich durch Schwermetallionen (z.B. Cadmium oder Zink) induzieren. Der MT IIa-Promotor sollte es zu jedem gegebenen Zeitpunkt erlauben die Expression exogener Jun Gene zu induzieren, ohne die Expression der endogenen Jun Gene direkt zu beeinflussen. Dadurch ist es möglich sowohl schnelle Antworten als auch Langzeiteffekte der exprimierten Proteine zu untersuchen.

Zunächst wurden in transienten Transfektionen verschiedene MT IIa-CAT Reporterkonstrukte (C. Jonat, unveröffentlicht) auf ihre basale Expression und Cadmium-Induzierbarkeit untersucht. Das Produkt des bakteriellen CAT-Indikatorgens (CAT, Chloramphenicol-Acetyltransferase) wurde durch einen Enzymtest nachgewiesen (Gorman et al., 1982). Dabei ist die Menge des umgesetzten Substrats proportional zur Menge des exprimierten CAT-Proteins und damit proportional zur Aktivität des Promotors. Das 320-MT-CAT Konstrukt läßt sich sehr effizient durch Cadmium induzieren (Abb. 1). Die Mutation der AP-1 Bindestelle im Promotor (320- $\Delta$ MT-CAT) bzw. eine weitere Deletion des Promotors (212-MT-CAT) reduziert die basale Aktivität, ohne die Induzierbarkeit durch Cadmium zu beeinflussen. Eine zusätzliche Mutation der AP-1 Bindestelle im verkürzten Promotor (212- $\Delta$ MT-CAT) bewirkt zwar eine weitere Reduktion der Basalaktivität, führt jedoch auch zu einer deutlichen Verringerung des induzierten Wertes. Daher wurde der Promotorbereich 320- $\Delta$ MT mit der mutierten AP-1 Bindestelle für die Klonierung der Expressionsvektoren für *c-jun*, *junB* und *junD* gewählt. Diese Mutante hat außerdem den Vorteil, daß die exogen exprimierten Jun Proteine keinen Einfluß auf die Aktivität des Promotors nehmen können. Die verschiedenen Expressionsvektoren sollten verwendet werden, um folgende Fragen



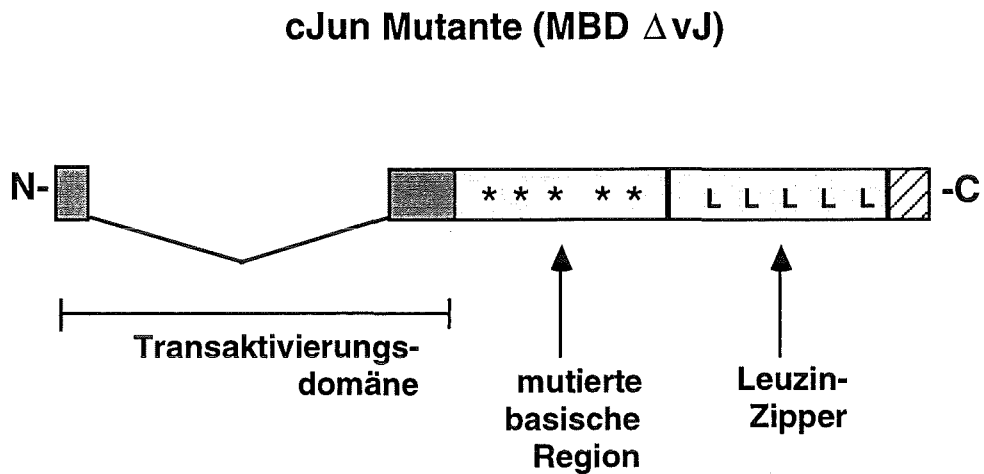
zu beantworten: Ist die Überexpression von cJun ausreichend das gleiche Genexpressionsmuster zu induzieren, das nach Behandlung mit TPA beobachtet wird ( z.B. Expression von Kollagenase, Metallothionein und anderer Gene, die eine AP-1 Bindungsstelle in ihrer Promotorsequenz aufweisen)? Kann die Überexpression von JunB oder JunD die Induktion der endogenen *c-jun* Transkription durch TPA blockieren?



**Abb. 1: Basale und Cadmium-induzierte Aktivität von Metallothionein IIa-Promotormutanten.** GM 637 Zellen wurden pro Petrischale (Ø 9cm) mit 5 µg der angegebenen Promotor-CAT-Plasmide transient transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Cadmiumchlorid (Cd, 5 mM f.c.) behandelt bzw. unbehandelt (Co) belassen. Nach weiteren 16 h wurden die Zellextrakte präpariert und die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt.

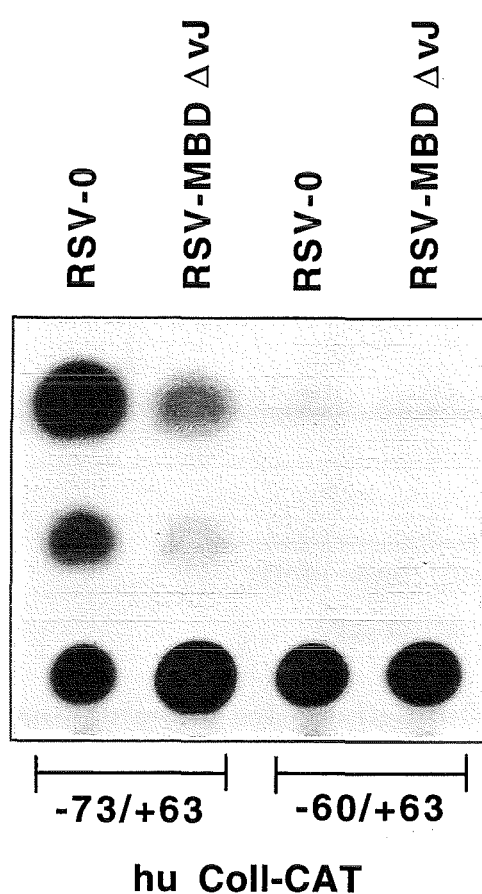
In einem weiteren Ansatz sollte die Gesamt-AP-1 Aktivität durch die Überexpression einer transdominant negativ wirkenden cJun Mutante (Stein et al., 1993) inaktiviert werden. Die hemmenden Eigenschaften dieser Jun Mutante (MBD ΔvJ) beruhen auf Punktmutationen in der basischen Region. Diese Mutante kann noch über die weiterhin funktionelle Leuzin-Zipper-Domäne mit anderen Proteinen dimerisieren, jedoch können die gebildeten Dimere nicht mehr an DNA binden. Dadurch werden alle Dimerpartner der Jun Mutante inaktiviert und die entsprechende AP-1 Aktivität dem Zellsystem entzogen. Außerdem weist das

MBD  $\Delta vJ$  Protein eine fast vollständige Deletion der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) auf, um die Bindung eines Koaktivators zu verhindern (Oehler et al, 1992), der bei Überexpression des Proteins ebenfalls dem Zellsystem entzogen würde. Der Aufbau der transdominant negativ wirkenden Jun Mutante ist Abb. 2 schematisch dargestellt.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der transdominant negativ wirkenden cJun Mutante MBD  $\Delta vJ$ .** N, amino-terminales Ende; C, carboxy-terminales Ende; L, Leuzin; \*, ausgetauschte Aminosäuren in der basischen Region, die zur Inaktivierung der DNA-Bindung führen.

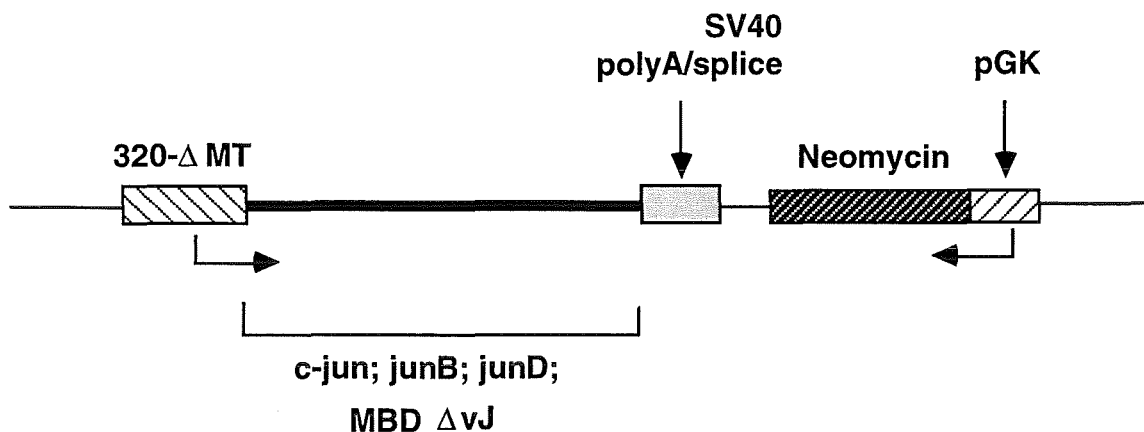
Transiente Transfektion eines Expressionsvektors, der für die Jun Mutante kodiert (RSV-MBD  $\Delta$ vJ), reduzierte, im Vergleich zum Kontrollvektor (RSV-0), deutlich die Expression eines kotransfizierten AP-1 Reporterkonstrukts (-73/+63 hu Coll-CAT; Abb. 3). Bei Kotransfektion des -60/+63 hu Coll-CAT Reporterplasmids, dem die AP-1 Bindestelle fehlt, konnte keine CAT-Aktivität gemessen werden. Dies bestätigte die AP-1 Aktivität inaktivierende Funktion des mutierten Proteins. Die Jun Mutante ist also geeignet, die Rolle von cJun bei der TPA-induzierten Expression von AP-1 abhängigen Genen (z.B. *c-jun*, Kollagenase) zu untersuchen.



**Abb. 3: Expression der transdominant negativ wirkenden Jun-Mutante hemmt die AP-1 abhängige Transaktivierung.** GM637 Zellen wurden pro Petrischale ( $\varnothing$  9cm) mit 2  $\mu$ g der Reporterplasmide -73/+63 bzw. -60/+63 hu Coll-CAT transient transfiziert. Zusätzlich wurden je 5  $\mu$ g des Expressionsvektors RSV-MBD  $\Delta$ vJ bzw. des entsprechenden Kontroll-Expressionsvektors RSV-0 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte präpariert und die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt.

## Überexpression der einzelnen Jun Proteine und einer auf die AP-1 Aktivität transdominant negativ wirkenden Jun Mutante in stabilen Zelllinien

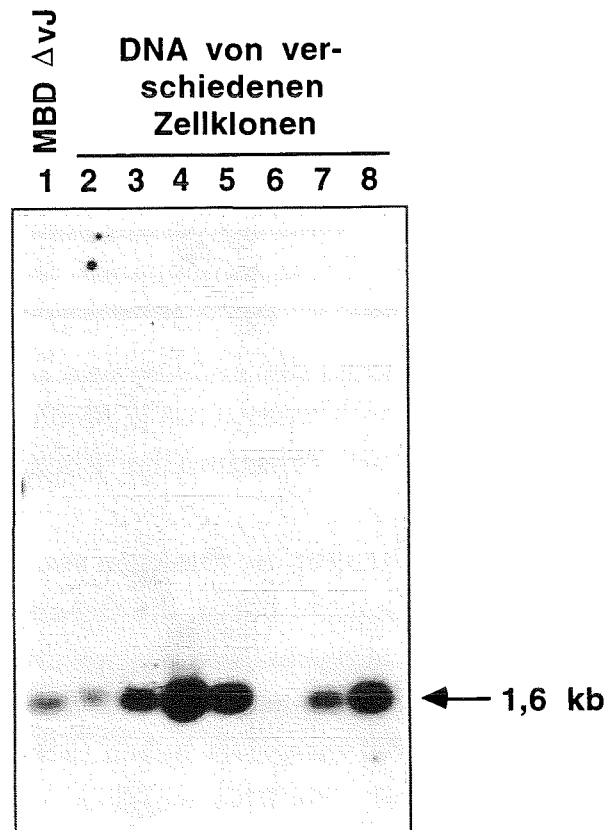
Zur Herstellung der verschiedenen induzierbaren Expressionsvektoren für die stabile Transfektion wurde in den Ausgangsvektor pUC18 das MT IIa Promotorfragment 320- $\Delta$ MT kloniert und 3' davon die für *c-jun*, *junB*, *junD* oder MBD  $\Delta$ vJ kodierende Sequenzen eingebracht. Zur Selektion positiver Klone wurde eine G418 (Geneticin) Resistenz vermittelnde pGK-Neomycin Kasette in gegenläufiger Orientierung in die Vektoren kloniert (Abb. 4). Als Kontrollvektor (K) diente ein Konstrukt, das nur das Promtorfragment und die pGK-Neomycin Kasette enthielt. Ein weiterer Kontrollvektor ( $\Delta$ ) enthielt die für MBD  $\Delta$ vJ kodierende Sequenz mit einer zusätzlichen Punktmutation in der Leuzin-Zipper-Domäne, so daß die Dimerisierungsfunktion ausgeschaltet ist.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Cadmium-induzierbaren Expressions-systems.** 320- $\Delta$ MT, Metallothionein IIa Promotorfragment von Position -320 bis +76 mit mutierter AP-1 Bindestelle; pGK, Promotor des Phosphoglycerat-Kinase Gens.

GM637 Zellen (menschliche Fibroblastenzelllinie) wurden mit den verschiedenen, linearisierten Plasmiden transfiziert. Nach 10 bis 14 Tagen wurden je Ansatz 20 bis 30 G418 resistente Kolonien isoliert und vermehrt. Durch Southern Blot Analyse wurde sowohl die vollständige Integration der Expressionsvektoren als auch deren Kopienzahl bestimmt (Abb. 5, MBD  $\Delta$ vJ Konstrukt; Daten nicht gezeigt). Dabei konnten für die MBD  $\Delta$ vJ, *c-jun*, *junB* und *junD* Expressionsvektoren sowie die beiden Kontrollen jeweils mehrere positive Zellklone nachgewiesen werden. Die Anzahl der integrierten Expressionsvektoren lag

zwischen einer und zehn Kopien. Die Zellklone mit der jeweils höchsten Kopienzahl wurden dann für die weitere funktionelle Untersuchung eingesetzt.



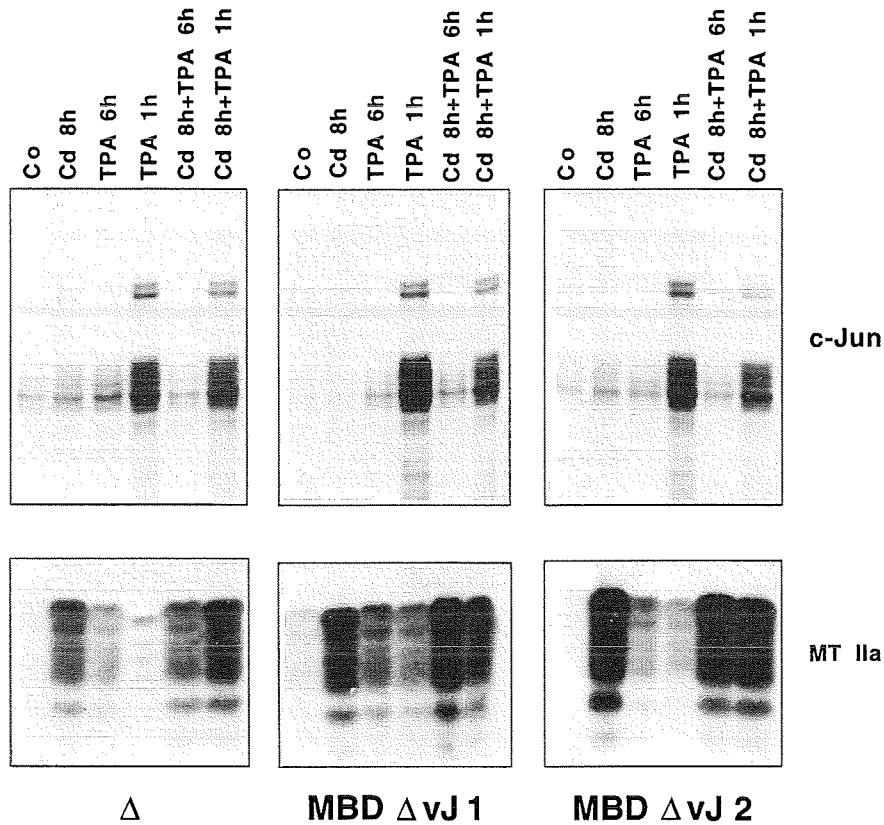
**Abb. 5: Vollständige Integration des Expressionsvektors MBD  $\Delta vJ$  in stabilen Zellklonen.** Je 30  $\mu\text{g}$  genomische DNA von unabhängigen stabilen Zellklonen (Spur 2 - 8), die mit dem MBD  $\Delta vJ$  Plasmid transfiziert waren, wurden nach der Restriktion mit Hind III in einem 0.8 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert (Southern Blot). 65 pg Hind III verdaute MBD  $\Delta vJ$  Plasmid-DNA (entspricht einer Kopie des Plasmids in 30  $\mu\text{g}$  genomischer DNA) wurden in Spur 1 aufgetragen. Eine radioaktiv markierte Sonde, die für das 3'-Ende der rekombinanten DNA codiert (SV 40 splice/polyA Stelle), wurde zur Hybridisierung der Membran verwendet. Die Lokalisation der spezifischen Bande (1.6 kb) ist durch einen Pfeil markiert.

## **Funktionelle Analyse der etablierten stabilen Zelllinien: Transkriptionelle Regulation von AP-1 Zielgenen**

Um zu untersuchen, ob Veränderungen in der Expression endogener AP-1 abhängiger Gene (z.B. Kollagenase, *c-jun*) durch die Expression von exogenem cJun, JunB und JunD auftreten, wurden die entsprechenden stabilen Zellklone mit Cadmium behandelt. Nachfolgend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA präpariert und durch RNase-Protektionsanalysen die Menge an exogen exprimierten Transkripten und die Expression endogener Gene bestimmt. Nach Cadmium-Induktion der stabilen Zellklone konnte jedoch kein Effekt auf die Expression von Genen wie z.B. Kollagenase und *c-jun* festgestellt werden. Auch Variation der Versuchsbedingungen, wie z.B. Veränderung der Dauer der Cadmiumbehandlung, Konzentration der eingesetzten Cadmiumchlorid-Lösung oder Synchronisieren der Zellen durch Kultivieren in Medium ohne FCS vor Beginn der Cadmiuminduktion, zeigte auf funktioneller Ebene keine Änderung der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Der zweite experimenteller Ansatz, die Funktion von AP-1 bei der Regulation von Zielgenen zu untersuchen, bestand darin, die Gesamt-AP-1 Aktivität durch Überexpression der Jun Mutante zu reprimieren. Dazu wurde eine Kontroll-Zellklon ( $\Delta$ ) und zwei Zellklone, die die Expressionskassette für das transdominant negativ wirkende Protein in ihrem Genom integriert haben (MBD  $\Delta vJ1$  und  $\Delta vJ2$ ), mit Cadmium und/oder TPA behandelt. Die RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung präpariert und die Menge der endogenen *c-jun* und Metallothionein IIa (MT IIa) Transkripte durch eine RNase-Protektionsanalyse bestimmt (Abb. 6). In den Kontrollzellen ( $\Delta$ , Jun Mutante ohne funktionellem Leuzin-Zipper) ist die Menge an MT IIa mRNA nach Induktion mit Cadmium (8 h) stark und nach TPA (6 h) in geringerem Maß erhöht. Wurden die Zellen neben Cadmium zusätzlich für eine bzw. sechs Stunden mit TPA behandelt, trat ebenfalls eine starke MT IIa Expression auf. Eine Stunde nach der TPA-Behandlung war nur eine schwache Induktion nachweisbar. Vergleichbare Induktionswerte von MT IIa wurden auch in den MBD  $\Delta vJ1$  und MBD  $\Delta vJ2$  Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu war in diesen Zellen die TPA-induzierte (1 h) Menge an endogener *c-jun* mRNA nach Expression der Jun Mutante durch Cadmium reduziert. In der Kontroll-Zelllinie blieb dagegen die TPA-induzierte Transkriptmenge von *c-jun* nahezu unbeeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, daß schon in der Zelle vorliegende AP-1 Komplexe, die nach post-translationaler

Aktivierung durch TPA die Induktion der *c-jun* Transkription vermitteln, durch die Cadmium-induzierte Expression von MBD  $\Delta vJ$  teilweise gehemmt werden können.



**Abb. 6: Cadmium-induzierte Expression der MBD  $\Delta vJ$  Mutante hemmt die TPA-stimulierte Expression von *c-jun* in stabilen Zelllinien.** Eine Kontrollzelllinie ( $\Delta$ ) und zwei Zelllinien mit vollständig integrierten MBD  $\Delta vJ$  Plasmid (MBD  $\Delta vJ$  1 und 2) wurden mit Cadmiumchlorid (Cd, 5  $\mu$ M f.c.) und/oder TPA (100 ng/ml) behandelt. Co, unbehandelte Zellen; Cd 8h, Zellen, die für 8h mit Cadmiumchlorid behandelt wurden; TPA 6h (1h), Zellen, die für 6h bzw. 1h mit TPA behandelt wurden; Cd 8h + TPA 6h (Cd 8h + TPA 1h), Zellen die gleichzeitig für 8h mit Cadmiumchlorid und für 6h bzw. 1h mit TPA behandelt wurden (d.h. 2h bzw. 7h Cadmiumchlorid, dann Zugabe von TPA). Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA präpariert, mit je 20  $\mu$ g eine RNase-Protektions-Analyse durchgeführt und die entstandenen geschützten RNA-Fragmente in einem 6%igen Sequenziergel aufgetrennt. *c-Jun*, Fragmente der *c-jun*-spezifischen RNA-Sonde, die von den endogenen *c-jun* Transkripten geschützt werden; MT IIa, Fragmente der MT IIa-spezifischen RNA-Sonde, die von den endogenen MT IIa Transkripten geschützt werden. Anmerkung: Das Auftreten von multiplen geschützten Fragmenten (*c-Jun*, MT IIa) ist auf alternative Initiationsstellen der Transkription zurückzuführen.

Zusammenfassend lassen die erzielten Resultate darauf schließen, daß die Expression der verschiedenen Transgene nicht ausreichend war, um die Menge an endogenen Proteinen zu übertreffen. Daher ist dieses System nicht geeignet, um die spezifischen Funktionen von AP-1 Proteinen zu untersuchen. Dies trifft sowohl für die Überexpression einzelner Jun Proteine, als auch für die nur partielle Hemmung der Gesamt-AP-1 Aktivität mittels der transdominant negativ wirkenden Jun Mutante zu. Ich habe deshalb für meine weiteren Arbeiten Zellsysteme verwendet, bei denen gezielt ein bestimmtes AP-1 Protein inaktiviert war.



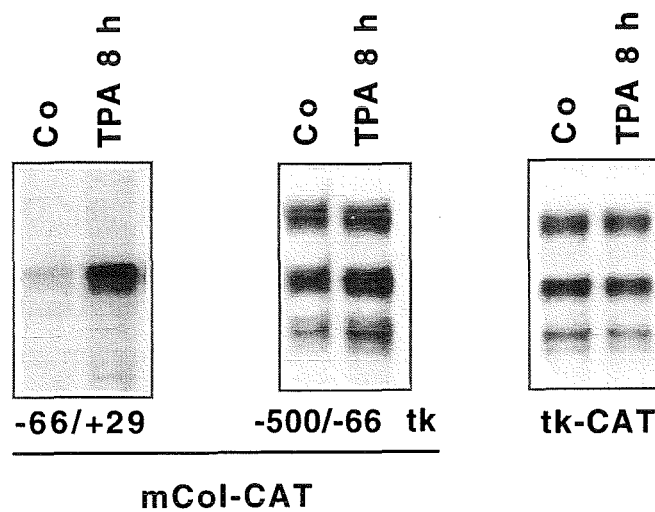
## Charakterisierung der AP-1 abhängigen Genregulation in Zellen ohne funktionellem cFos Protein

Die "gene targeting" Technik ermöglichte es Mäuse zu erzeugen, die in einem bestimmten Genlocus Mutationen tragen, die das Gen ausschalten bzw. das exprimierte Protein funktionslos machen. Auf diese Weise wurden *c-fos* null Mäuse erzeugt (Wang et al., 1992). Aus Wildtyp (*c-fos* +/+) und Mutanten (*c-fos* -/-) Embryos wurden primäre Fibroblasten isoliert und immortalisierte Zelllinien etabliert (Brüsselbach et al., 1995). Mehrere unabhängig etablierte Wildtyp und *c-fos* -/- Zelllinien wurden mir von Dr. E. F. Wagner (IMP, Wien) zur Verfügung gestellt. Gleichzeitig habe ich, ausgehend von primären Fibroblasten, immortalisierte *c-fos* -/- (f8 und f9) und Wildtyp (F13) Zelllinien etabliert. Diese Zelllinien wurden verwendet, um die spezifischen Funktionen von *c-fos* auf zellulärer bzw. molekularer Ebene zu untersuchen.

Die früheste nachweisbare Veränderung in der Genexpression nach Behandlung von Zellen mit TPA oder Wachstumsfaktoren ist die transkriptionelle Aktivierung der "frühen" Gene, wie z.B. *c-jun* und *c-fos*. Unabhängig von *de novo* Proteinsynthese führt dies innerhalb von 45 Minuten zu einer maximalen Anhäufung von *c-jun* und *c-fos* spezifischer mRNA. Im Gegensatz dazu weisen "späte" Gene eine verzögerte Induktionskinetik auf. Diese Gene werden im Falle von AP-1 regulierten Genen (z.B. Kollagenase I, Stromelysine und CD44) nur nach Transkription und Translation von AP-1 Faktoren exprimiert und erreichen daher erst nach Stunden eine maximale Expression (Angel et al., 1987a; Kerr et al., 1988; Hofmann et al., 1993). Die essentielle Funktion von Fos/Jun bei der Umsetzung extrazellulärer Signale in Veränderungen der Genexpression wurden anhand des Promotors des menschlichen Kollagenase I Gens etabliert (Angel und Karin, 1991). Da sich die Promotorsequenzen des interstitiellen Kollagenase Gens von Mensch und Maus deutlich unterscheiden (Schorpp et al., 1995) habe ich zunächst die Funktionalität der AP-1 Bindestelle im Maus Promotor nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wird die interstitielle Kollagenase der Maus (MMP-13) auch mit den Abkürzungen Kollagenase I oder Kollagenase bezeichnet.

Ratten-Osteosarkom Zellen (ROS 17/2.8) wurden mit verschiedenen Maus Kollagenase I Promotor-CAT-Genkonstrukten transfiziert und mit TPA behandelt. Nach 8 h wurde aus den Zellen RNA isoliert und die CAT-mRNA in einem RNase Protektionsexperiment quantifiziert. Ein Promotorkonstrukt (-66/+29), das nur das TRE enthält, ist in der Lage TPA-Induzierbarkeit zu vermitteln (Abb. 7). Ein

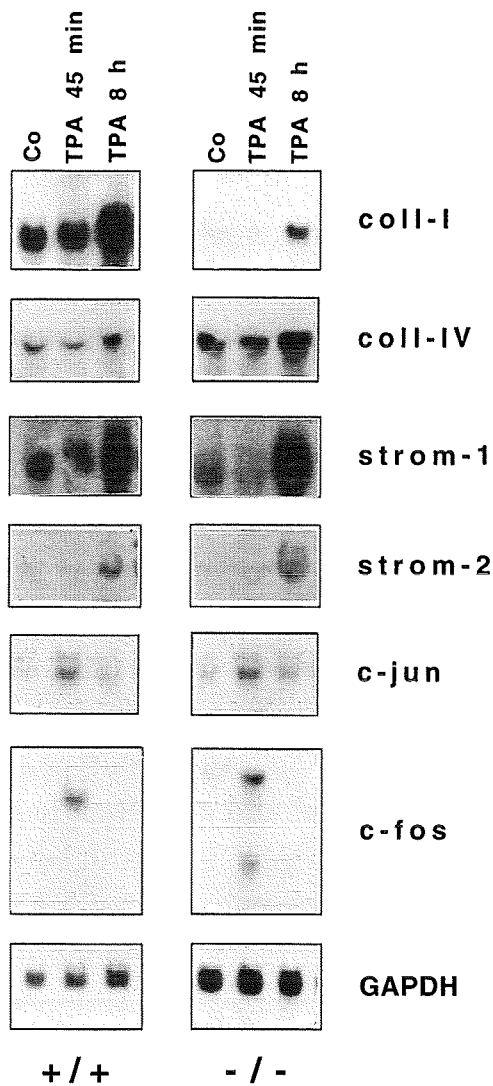
Promotorkonstrukt ohne AP-1 Bindestelle (-500/-66-tkCAT) kann dagegen nicht mehr durch TPA induziert werden. Das gleiche Resultat wurde für das Herpes-Simplex-Thymidinkinase-Promotor-CAT-Genkonstrukt (tk-CAT) beobachtet. Diese Befunde zeigen, daß die TPA induzierte Expression der Kollagenase I die Anwesenheit des TRE-Motivs im Promotor erfordert und folglich die TPA induzierte Transkription des Kollagenase I Gens der Maus von AP-1 abhängig ist.



**Abb. 7: Nachweis der Funktionalität der AP-1 Bindestelle im Promotor der interstitiellen Kollagenase der Maus.** Ratten-Osteosarkom Zellen (ROS 17/2.8) wurden pro Petrischale ( $\varnothing$  14cm) mit 20  $\mu$ g der Kollagenase-Promotor-CAT-Konstrukte -66/+29 mCol-CAT (enthält als Enhancersequenz nur das TRE) und -500/-66 tk-mColCAT (enthält Promotorsequenzen von -500 bis -66, TRE ist nicht vorhanden), sowie des Kontrollkonstrukts tk-CAT transient transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 8 h mit TPA (100ng/ml) behandelt bzw. unbehandelt (Co) belassen. Danach wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und die Menge der CAT-Transkripte durch eine RNase-Protektions-Analyse bestimmt. Anmerkung: Das Auftreten von drei geschützten tk-Fragmenten ist auf alternative Initiationsstellen der Transkription zurückzuführen.

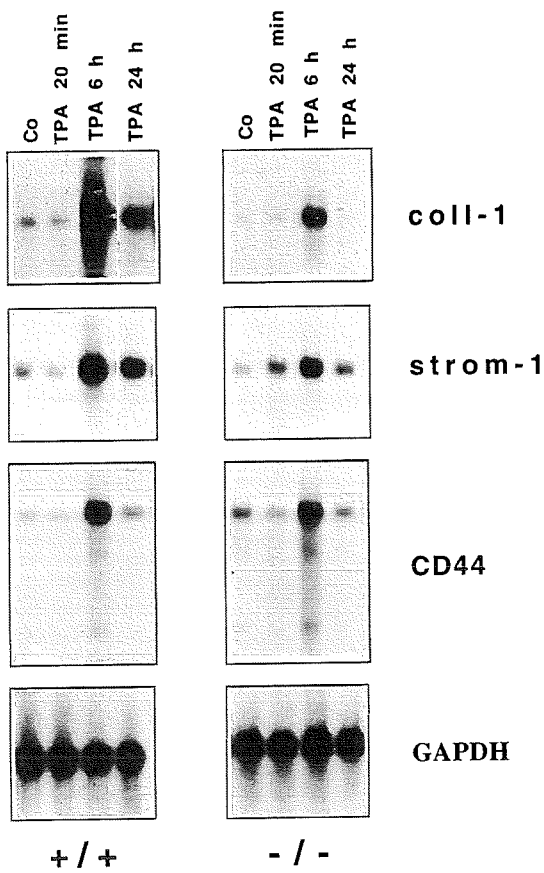
In einer ersten Reihe von Experimenten wurde überprüft, inwieweit cFos essentiell für die mRNA-Expression AP-1 abhängiger Gene nach extrazellulärem Stimulus ist, bzw. ob das Fehlen von cFos durch andere AP-1 Faktoren kompensiert werden kann. Dazu wurden Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen für 45 Minuten und 8 h mit TPA behandelt. Danach wurde RNA aus behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und diese in einer Northern Blot Analyse untersucht.

In Wildtyp Zellen war 45 Minuten nach TPA-Stimulation eine starke Akkumulation der *c-fos* mRNA nachweisbar (Abb. 8). Auf Grund des speziellen Designs des Vektors, der für den Gen-Knockout benutzt wurde (Wang et al., 1992), konnte in *c-fos* *-/-* Zellen rekombinante *c-fos*/Neomycin Fusions-mRNA detektiert werden, die eine den *c-fos* *+/+* Zellen vergleichbare Induktionskinetik aufweist. Ebenso war der basale und TPA induzierte Wert an *c-jun* mRNA in *c-fos* *-/-* Zellen, im Vergleich zu Wildtyp Zellen, nicht verändert. Bei den postulierten AP-1 abhängigen Zielgenen wies Stromelysin-1 einen höhere basale Expression als Stromelysin-2 auf (Abb. 8). Die Expression beider Gene war durch TPA (8 h) induzierbar und es traten keine Veränderungen im Expressionsmuster in *c-fos* *-/-* Zellen auf. Dies trifft auch für CD44 zu, dessen Expression in beiden Zelltypen 6 h nach TPA-Induktion maximal und nach 24 h weitgehend auf Basalwerte zurückgekehrt war (Abb. 9). Die Northern Blot Analyse in Abb. 9 zeigt in *c-fos* *-/-* Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, verringerte Mengen an Stromelysin-1 mRNA (6 h und 24 h nach TPA-Induktion), was jedoch auf experimentellen Schwankungen beruht und in unabhängig durchgeführten Experimenten nicht zu beobachten war. Das Kollagenase IV Gen (Gelatinase A), das kein TRE in seiner Promotorsequenz aufweist, wurde in beiden Zelltypen gleich effizient exprimiert und war durch TPA kaum induzierbar (Abb. 8).



**Abb. 8: Basale und TPA-induzierte Expression der interstitiellen Kollagenase der Maus ist reduziert in *c-fos*  $-/-$  Zellen.** Wildtyp ( $+/+$ ) und *c-fos*  $-/-$  Zellen ( $-/-$ ) wurden nicht (Co) oder 45 min bzw. 8 h mit TPA (100 ng/ml) behandelt. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, jeweils 20  $\mu$ g RNA in einem 1.4 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an Kollagenase I (coll-1), 72 kD Typ IV Kollagenase (Gelatinase A, coll-IV), Stromelysin-1 (strom-1), Stromelysin-2 (strom-2), *c-jun*, *c-fos* und Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spezifischer mRNA wurde durch aufeinanderfolgende Hybridisierung mit  $^{32}$ P-markierten cDNA Proben ermittelt.

Einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und *c-fos* defizienten Zellen wies jedoch das Expressionsmuster der interstitiellen Kollagenase auf (Abb. 8 und 9). Sowohl die basale als auch die TPA induzierte mRNA Menge war in *c-fos*  $-/-$  Zellen deutlich reduziert. Zusätzlich war bei *c-fos*  $+/+$  Zellen die mRNA Menge nach 24 h TPA Behandlung eindeutig noch nicht auf basale Werte gesunken, wie es bei den mutierten Zellen der Fall war. Der relative Induktionsfaktor ist in beiden Zelllinien jedoch unverändert.

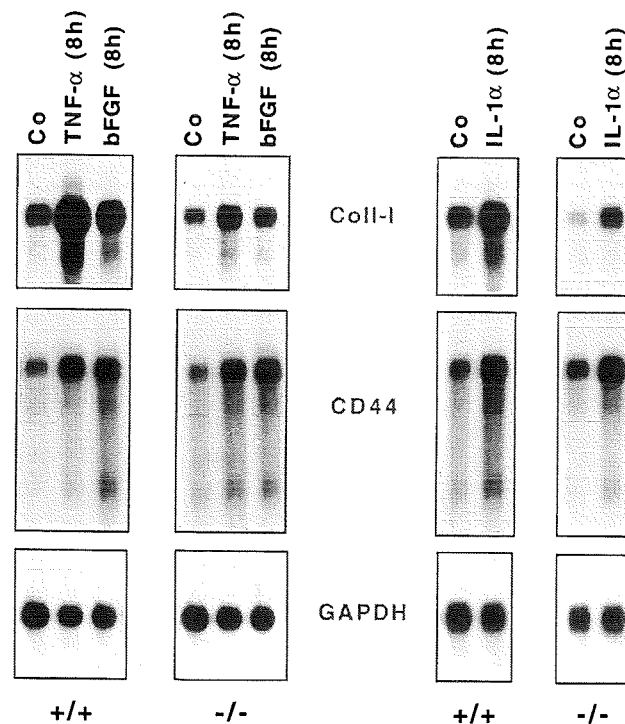


**Abb. 9: Inaktivierung von cFos hat keinen Einfluß auf die basale und TPA-induzierte Expression von CD44.** Wildtyp (+/+) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen (-/-) wurden nicht (Co) oder für 20 min, 6 h bzw. 24 h mit TPA (100ng/ml) behandelt. Aus den Zellen wurde polyA<sup>+</sup> RNA isoliert, jeweils 6 µg RNA in einem 1.4 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an Kollagenase I (*coll-1*), Stromelysin-1 (*strom-1*), CD44 und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß das Fehlen von cFos keine Auswirkungen auf die Expression der frühen Gene *c-jun* und *c-fos* nach extrazellulärem TPA Stimulus hat. Die Expressionsmuster der späten AP-1 regulierten Gene erlauben aber eine Einteilung dieser Gene in zwei Klassen. Einerseits bleibt die Inaktivierung von *c-fos* ohne Einfluß auf die Expression von CD44, Stromelysin-1 und -2, andererseits kann eine spezifische Funktion von cFos bei der transkriptionellen Regulation der Kollagenase I demonstriert werden. Das Fehlen von cFos resultiert in einer deutlich verringerten basalen und TPA induzierten Expression der Kollagenase I.

Ist die veränderte Expression der Kollagenase I spezifisch für TPA oder sind andere extrazelluläre Stimuli, die AP-1 aktivieren, ebensowenig in der Lage, die Transkription von Kollagenase I dem Wildtyp analog zu induzieren? Um diese Frage zu beantworten, wurden Zellen für 8 h mit TNF- $\alpha$ , bFGF oder Il-1 $\alpha$  behandelt und die Expression von Kollagenase I und CD44 durch Northern Blot Analyse bestimmt (Abb. 10). In *c-fos*<sup>+/+</sup> und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen wurde die Expression

von CD44 durch TNF- $\alpha$ , bFGF und IL-1 $\alpha$  mit vergleichbarer Effizienz induziert. Gänzlich anders war wiederum die Situation beim Expressionsmuster der Kollagenase I. Zum einen war der Basalwert in den mutierten Zellen reduziert. Zum anderen konnte die Kollagenase I Expression durch TNF- $\alpha$ , bFGF und IL-1 $\alpha$  induziert werden, jedoch war diese, analog zu TPA, in *c-fos*  $-/-$  Zellen eindeutig reduziert.



**Abb. 10: Expression der interstitiellen Kollagenase der Maus ist vermindert in *c-fos*  $-/-$  Zellen nach Stimulation mit Cytokinen und Wachstumsfaktoren.** Wildtyp (+/+) und *c-fos*  $-/-$  Zellen (-/-) wurden nicht (Co) oder 8 h mit TNF- $\alpha$  (5 ng/ml), bFGF (2.5 ng/ml) bzw. IL-1 $\alpha$  (5 ng/ml) behandelt. Aus den Zellen wurde polyA<sup>+</sup> RNA isoliert, jeweils 6  $\mu$ g RNA in einem 1.4 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an Kollagenase I (coll-1), CD44 und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.

Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß die basale sowie die durch TPA, Wachstumsfaktoren (bFGF) und Cytokine (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) induzierte Expression der Kollagenase I unbedingt cFos erfordert und dessen Fehlen nur partiell kompensiert werden kann. Gleichzeitig bleibt aber die Regulation von CD44, Stromelysin-1 und Stromelysin-2 durch das Fehlen von cFos unbeeinflusst.

Dies läßt auf Redundanz durch andere AP-1 Mitglieder bei der Regulation bestimmter Gene schließen.

### **Die *in vivo* Proteinbindung am Kollagenase I Promotor ist in *c-fos* *-/-* Zellen unverändert**

Um zu überprüfen, ob Unterschiede in der Affinität von DNA-bindenden Proteinen an die TRE-Sequenz des Kollagenase Gens auftreten, wurde eine *in vivo footprint* Analyse der Proteinbesetzung des Kollagenase I Promotors in Wildtyp bzw. *c-fos* *-/-* Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt (0) belassen oder mit TPA (2, 3, 6 und 24 h) behandelt und dann direkt mit einer partiell methylierenden Dosis von Dimethylsulfat (DMS) für zwei Minuten inkubiert. DMS diffundiert sehr schnell in die Zelle und den Zellkern, und methyliert bevorzugt die N7-Position von Guaninresten in der großen DNA-Rinne. Mit geringerer Effizienz wird auch die N3-Position von Adeninen in der kleinen DNA-Rinne methyliert. Proteine, die spezifisch mit DNA-Sequenzen interagieren, können die DNA entweder vor der methylierenden Substanz schützen und die Methylierung der Basen abschwächen (DMS-Protektion) oder benachbarte Basen, werden verstärkt methyliert, wenn auf Grund der Proteinbindung die DNA-Konformation so verändert wird, daß die Basen besser exponiert sind (DMS-Hyperreaktivität).

Die isolierten, genomischen DNA-Proben wurden anschließend an den methylierten Stellen spezifisch durch Piperidin gespalten, die Spaltprodukte selektiv amplifiziert und radioaktiv markiert. Parallel dazu wurde *in vitro* methylierte, genomische DNA (N, "nackte" bzw. proteinfreie DNA) in gleicher Weise behandelt. Nach Auftrennung der Produkte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel und direktem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* methylierten DNA wird die Proteinbindung anhand der Unterschiede in den Fragmentmustern sichtbar.

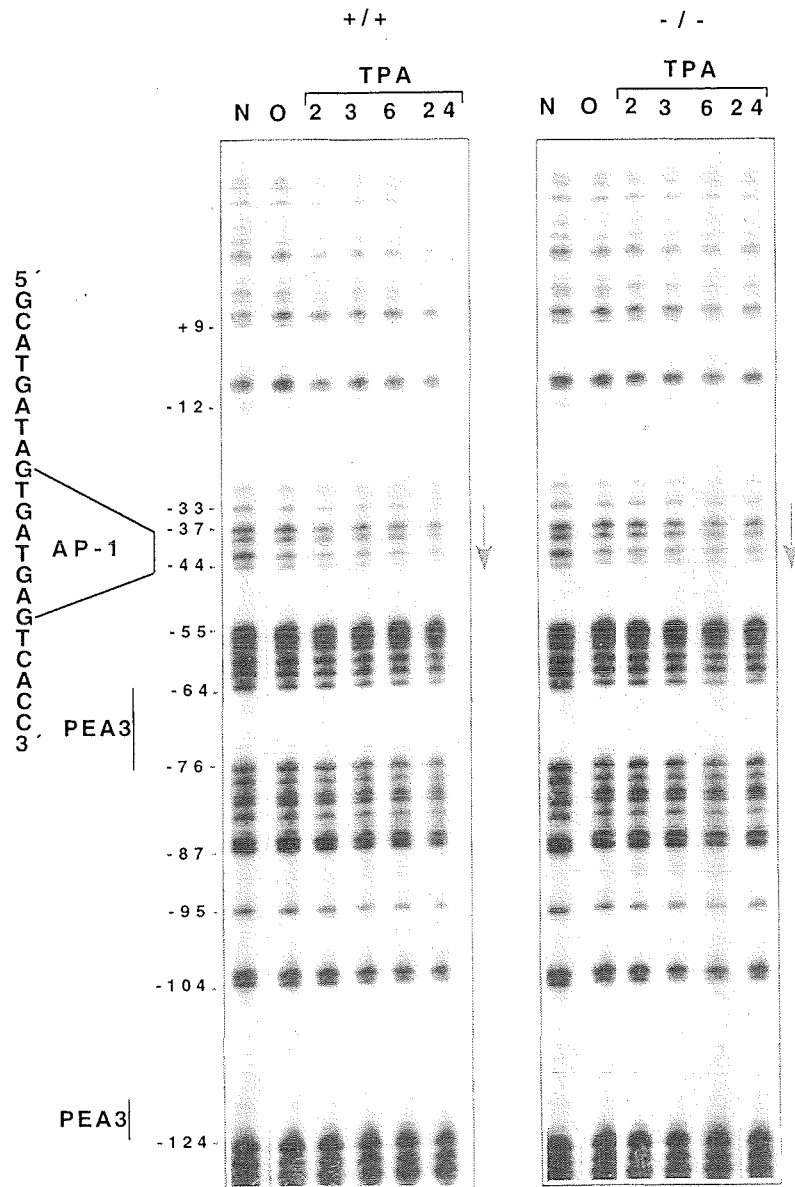
Exemplarisch für eine *in vivo footprint* Analyse ist in Abb. 11 das Fragmentmuster des nicht-kodierenden Stranges des Kollagenase I Promotors beider Zelltypen zu sehen. Dabei ist in unbehandelten Zellen (verglichen mit proteinfreier, *in vitro* methylierter DNA) eine schwache DMS-Protektion von zwei Guaninen in der TRE-Sequenz und einem direkt distal vom TRE gelegenen Guanin sichtbar. Behandlung der Zellen mit TPA bewirkt eine Verstärkung der DMS-

Protektionen, die nach 6 h maximal und auch nach 24 h noch feststellbar sind. Weitere auffällige Protektionen proximal oder distal vom TRE-Motiv konnten nicht beobachtet werden. Entscheidend jedoch ist, daß die beobachteten DMS-Reaktivitätsmuster in *c-fos* +/+ und *c-fos* -/- Zellen nahezu identisch sind. Dies bedeutet, daß keine qualitativ unterschiedliche Proteinbindung, möglicherweise durch einen Repressor in den *c-fos* -/- Zellen hervorgerufen, im detektierten Promotorbereich vorliegt. Am TRE tritt eine Proteinbindung auf, die nach TPA Behandlung verstärkt wird. Da keine quantitative Veränderung der Protektion in den *c-fos* -/- Zellen nachgewiesen wurde, ist es vorstellbar, daß die an das TRE bindenden AP-1 Komplexe zwar gleiche Bindungseigenschaften haben, sich aber in ihrer Zusammensetzung von denen in Wildtyp Zellen unterscheiden. Es wäre also denkbar, daß ein geringeres Transaktivierungspotential dieser AP-1 Spezies für die veränderte Kollagenase I Expression in *c-fos* -/- Zellen verantwortlich sind.

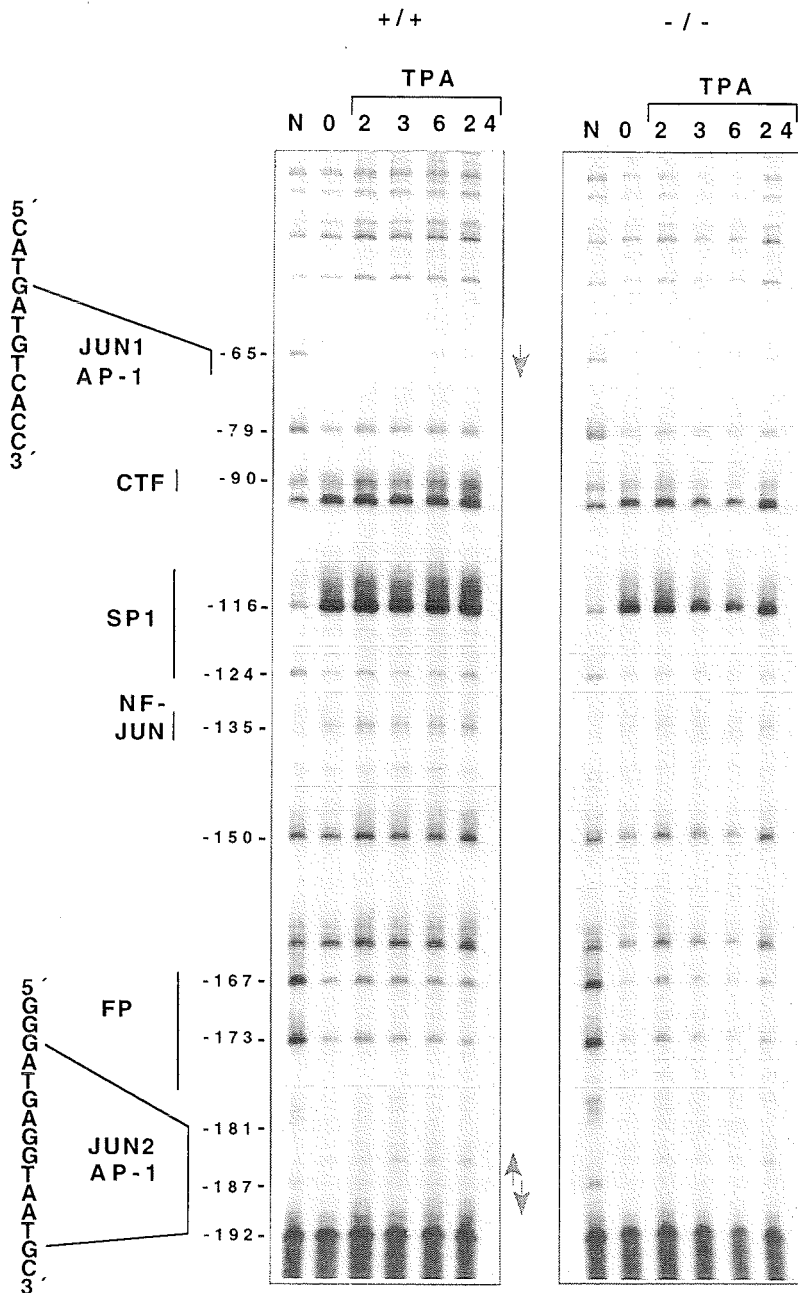
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Northern Blot Analyse (vgl. Abb. 8) treten auch am *c-jun* Promotor keine Veränderungen im Protein-Bindungsmuster in *c-fos* -/- Zellen auf. Vergleicht man bei dieser *in vivo footprint* Analyse (Abb. 12) die *in vitro* mit der *in vivo* methylierten DNA des nicht kodierenden DNA-Stranges, so erkennt man die typische konstitutive Bindung von Proteinen in unbehandelten Zellen (Herr et al., 1994). Dieser Zustand bleibt auch nach TPA Behandlung (2, 3, 6 und 24 h) ohne Veränderung bestehen. Besonders deutlich ist dies an den cJun/ATF-2 Bindungsstellen Jun1 und Jun2 sichtbar, wo das Guanin -65 bzw. das Guanin -187 fast vollständig geschützt ist. Weitere DMS-Protektionen treten im Bereich der SP1- (Guanin -124) und bei der FP-Bindungsstelle (Guanin -167 und -173) auf. DMS-Hyperreaktivitäten sind bei den Guaninen an Positionen -116 (SP1) und -186 (Jun2 AP-1) erkennbar.

Diese Experimente demonstrieren, daß in *c-fos* -/- Zellen der Kollagenase I und der *c-jun* Promotor keine qualitativ oder quantitativ unterschiedliche *in vivo* Proteinbesetzung im entsprechenden Vergleich zu Wildtyp Zellen aufweisen. Trotzdem kommt es im Falle der Kollagenase I zu einer Deregulierung der Promotoraktivität in cFos defizienten Zellen (vgl. Abb. 8 und 9). Deshalb sollten *in vitro* DNA-Bindungsstudien darüber Aufschluß geben, ob ein Austausch von Faktoren mit identischen DNA-Bindungseigenschaften, aber unterschiedlichen transaktivierenden Fähigkeiten stattfindet.





**Abb. 11: *In vivo* Proteinbindung am Promotor der interstitiellen Kollagenase der Maus ist nicht verändert in *c-fos* -/- Zellen.** Wildtyp (+/+) und *c-fos* -/- Zellen (-/-) wurden mit TPA (100 ng/ml) oder nicht (0) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten (2, 3, 6, 24 h) wurde die *in vivo* Proteinbindung durch *in vivo footprint*-Analyse bestimmt. N, *in vitro* methylierte, proteinfreie ("nackte") genomische DNA. Gezeigt ist die Guaninleiter des nicht-kodierenden Stranges (Bereich der Promotorsequenz von Position +9 bis -124). Die markierten Regionen repräsentieren Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren AP-1 und PEA3. Die Sequenz der AP-1 Bindestelle ist angegeben. Abwärts gerichtete Pfeile symbolisieren DMS-Protektionen in der AP-1 Bindestelle.



**Abb. 12: In vivo Proteinbindung am *c-jun* Promotor in Wildtyp und *c-fos* -/- Zellen.** Wildtyp (+/+) und *c-fos* -/- Zellen (-/-) wurden mit TPA (100 ng/ml) oder nicht (0) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten (2, 3, 6, 24 h) wurde die *in vivo* Proteinbindung durch *in vivo footprint*-Analyse bestimmt. N, *in vitro* methylierte, proteinfreie ("nackte") genomische DNA. Gezeigt ist die Guaninleiter des nicht-kodierenden Stranges (Bereich der Promotorsequenz von Position -65 bis -192). Die markierten Regionen repräsentieren Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren CTF, SP1, NF-Jun und FP. Die Sequenzen der beiden cJun/ATF-2 Bindestellen (Jun1 und Jun2) sind angegeben. Abwärts gerichtete Pfeile symbolisieren DMS-Protektionen, aufwärts gerichtete Pfeile DMS-Hyperreaktivitäten.

## Partner-spezifische Unterschiede in der Bindung von Jun/Fos Komplexen an TRE-Sequenzen *in vitro*

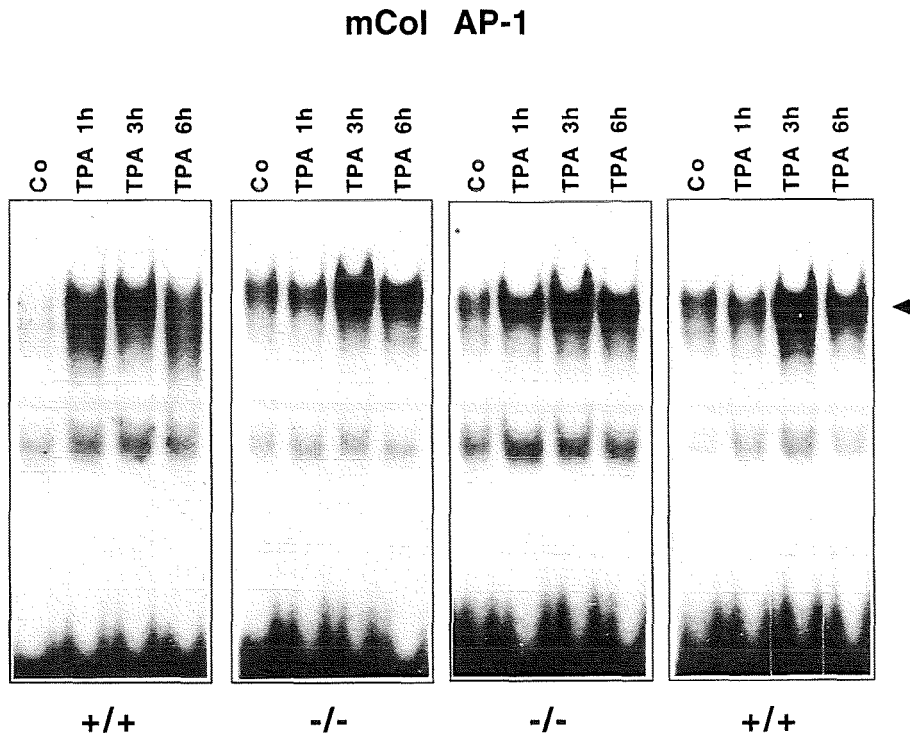
Zur exakten Bestimmung der Untereinheiten von AP-1 Dimeren, die an die Kollagenase-TRE-Sequenz binden, wurden Gelretardations-Experimente durchgeführt. Gesamt-Zellextrakte wurden mit synthetisch hergestellten TRE-Oligonukleotiden, die spezifische AP-1 Bindungssequenzen enthielten und radioaktiv markiert waren, inkubiert. Binden im Extrakt vorhandene AP-1 Dimere an die Oligonukleotid-Probe, dann entstehen Protein-DNA-Komplexe, die im nativen Polyacrylamidgel, im Vergleich zu den freien, ungebundenen Oligonukleotiden, deutlich verlangsamt wandern. Liegt das radioaktive Oligonukleotid im Überschuß vor, so entspricht die Stärke der retardierten Bande der Menge an gebundenem Protein. Um direkt nachzuweisen, welche AP-1 Protein-Komponenten an der Komplexbildung beteiligt sind, wurden die Zellextrakte mit Antisera, die spezifisch die verschiedenen Jun oder Fos Proteine erkennen, vorinkubiert. Dadurch kommt es, je nach Lokalisation der Antikörper-Bindestelle im Protein, entweder zur Hemmung der DNA-Bindung oder zur Ausbildung von Antikörper/AP-1/DNA-Komplexen, die ein stärker retardiertes Laufverhalten ("Supershift") als AP-1/DNA-Komplexe aufweisen.

In Abb. 13 sind die Sequenzen der Oligonukleotide dargestellt, die für die nachfolgenden Gelretardations-Analysen eingesetzt wurden. Diese setzen sich jeweils aus der TRE-Konsensus-Sequenz sowie flankierenden Sequenzen zusammen und entsprechen Promotorsequenzen des menschlichen Kollagenase I Gens (huCol AP-1, AP-1 Konsensus-Sequenz), des Maus Kollagenase I Gens (mCol AP-1) und des Maus CD44 Gens (mCD44 AP-1). Auffällig ist das um vier Nukleotide erweiterte Palindrom im Bereich des Maus Kollagenase I Promotors, das wahrscheinlich für die sehr hohe Affinität von AP-1 an diese Sequenz verantwortlich ist (Schorpp et al., 1995).



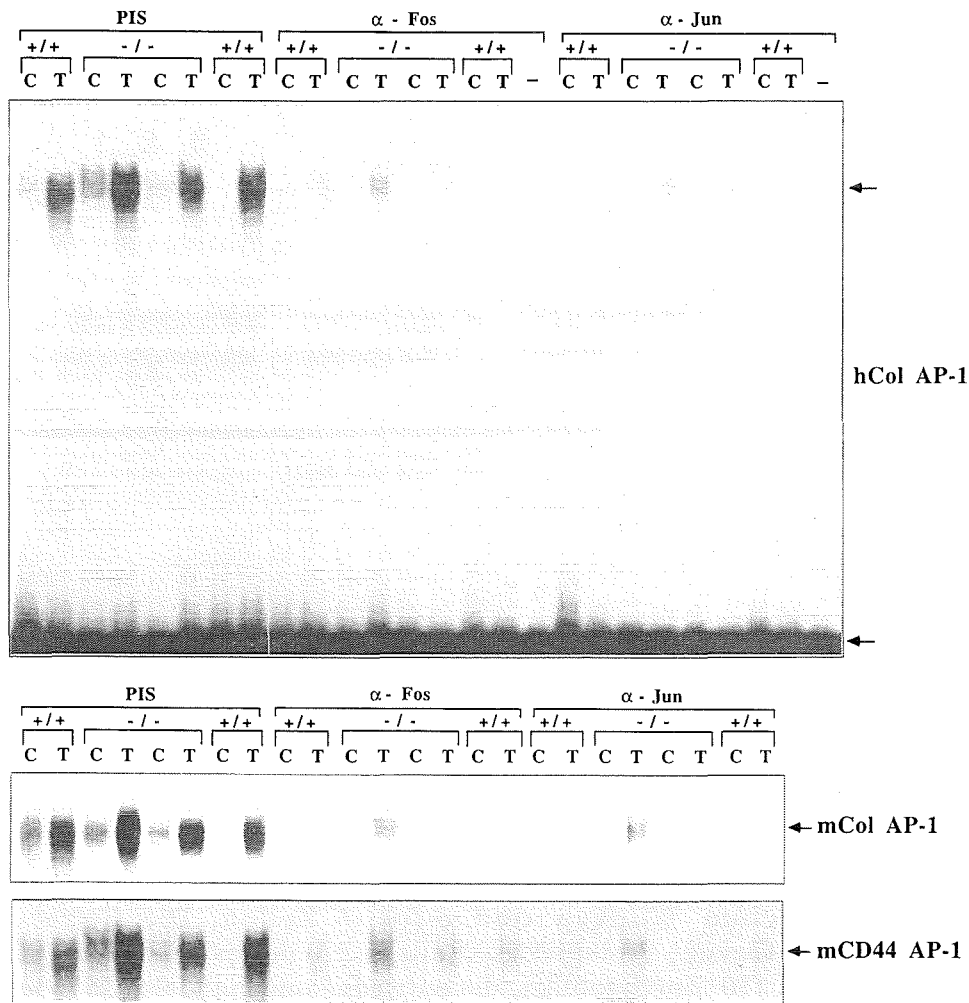
**Abb. 13: Vergleich der TRE-Sequenzen der Kollagenase I und CD44 Gene.** Die angeführten Sequenzen setzen sich aus der TRE-Konsensus-Sequenz (unterstrichen) sowie flankierenden Basen zusammen und repräsentieren Promotorsequenzen der interstitiellen Kollagenase des Menschen (huCol AP-1), der Maus (mCol AP-1) und des CD44 Gens der Maus (mCD44 AP-1). Die AP-1 Bindestelle der Maus Kollagenase I weist ein um vier Nukleotide erweitertes Palindrom auf (durch Großbuchstaben markiert). Nach Hybridisierung mit entsprechend komplementären Sequenzen wurden die angegebenen Oligonukleotide bei den *in vitro* DNA-Bindungsstudien verwendet.

Zunächst wurden Proteinextrakte aus *c-fos* *+/+* und *c-fos* *-/-* Zellen, die entweder unbehandelt oder für 1, 3 und 6 h mit TPA stimuliert waren, präpariert und in einer Gelretardations-Analyse mit der mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe eingesetzt. Dabei ergaben sich retardierte AP-1/DNA-Komplexe mit einer transienten Kinetik (Abb. 14). Die stärkste Bande, die die größte Menge an DNA-gebundenen AP-1 Komplexen widerspiegelt, konnte für je zwei Wildtyp (WT56, f20) und *c-fos* *-/-* Zelllinien (f1, f10) nach dreistündiger TPA-Behandlung festgestellt werden. Entsprechend dem Befund der *in vivo footprint* Analyse wurden in *c-fos* *-/-* Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, keine quantitativen Unterschiede in der DNA-Bindungsaktivität von AP-1 nachgewiesen.



**Abb. 14: TPA-induzierte Bindungsaktivität von AP-1 an das TRE der interstitiellen Kollagenase der Maus ist transient und zeigt keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen.** Die Gelretardations-Analysen wurden mit Gesamt-Proteinextrakt aus je 2 Wildtyp (+/+; WT56, f20) und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zelllinien (-/-; f1, f10) durchgeführt, die entweder unbehandelt (Co) oder für 1, 3, und 6 h mit TPA (100 ng/ml) behandelt waren. Je 3 µg Proteinextrakt wurden mit 25 fmol radioaktiv markiertem mCol AP-1 Oligonukleotid gemischt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionen auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Der spezifische AP-1/DNA-Komplex ist mit einem Pfeil markiert. Der schneller wandernde Komplex wurde durch Wettbewerbsanalysen als unspezifisch identifiziert.

In Abbildung 15 ist die *in vitro* DNA-Bindung dargestellt, bei dem die Proteinextrakte (unbehandelt, 3 h TPA) mit Prä-Immunsereum oder Antiseren (verhindern DNA-Bindung), die alle Fos Proteine ( $\alpha$ -Fos) bzw. alle Jun Proteine ( $\alpha$ -Jun) erkennen, vorinkubiert wurden. Nach Zugabe der  $\alpha$ -Fos und  $\alpha$ -Jun Antiseren wurde die Ausbildung der AP-1/DNA-Komplexe annähernd vollständig gehemmt. Das gilt für je zwei *c-fos* +/+ und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zelllinien und wurde für alle eingesetzten TRE-Oligonukleotide (huCol AP-1, mCol AP-1 und mCD44 AP-1) beobachtet.



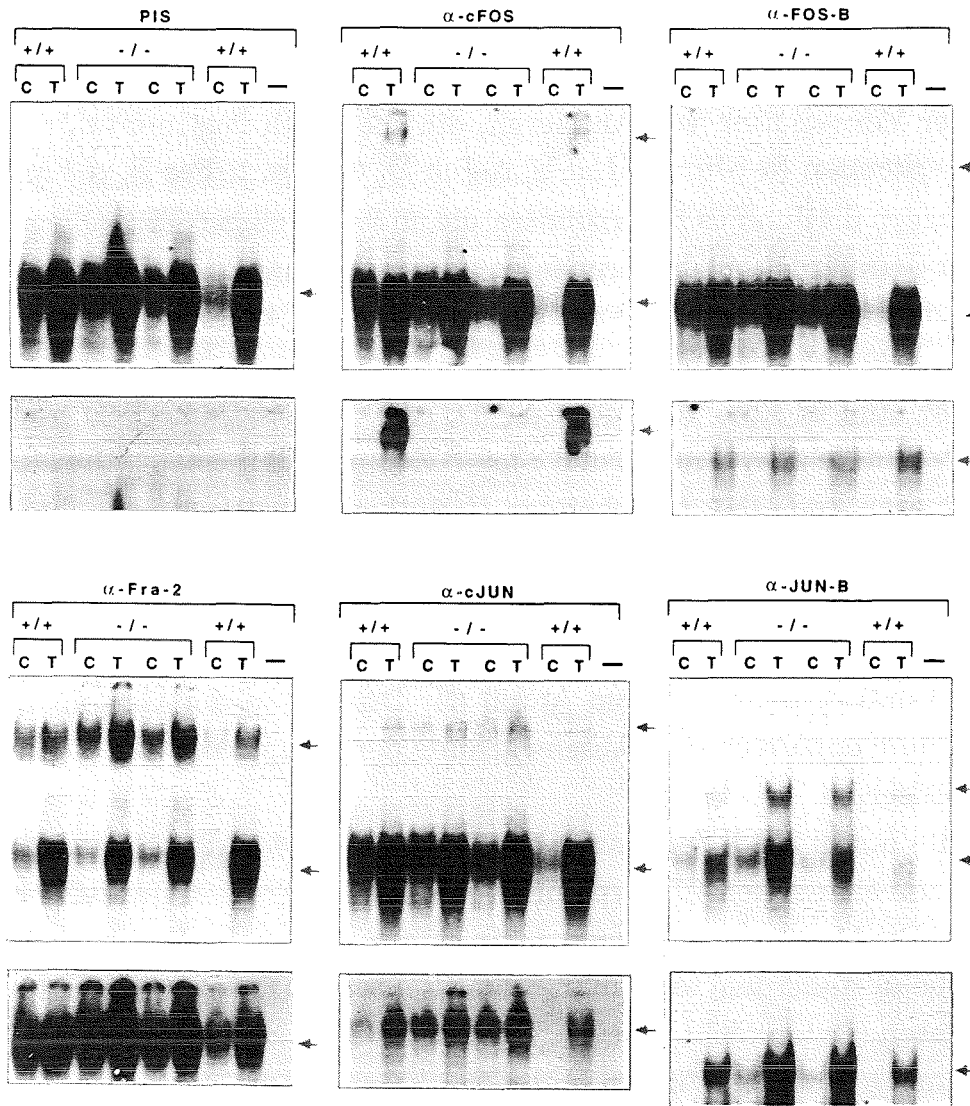
**Abb. 15: Jun/Fos Heterodimere binden *in vitro* an die TRE-Oligonukleotide huCol AP-1, mCol AP-1 und mCD44 AP-1.** Je 2 Wildtyp (+/+; WT56, f20) und *c-fos* -/- Zelllinien (-/-; f1, f10) wurden für 3 h mit TPA (T, 100 ng/ml) behandelt oder unbehandelt (C) belassen. Gesamt-Proteinextrakte (3  $\mu$ g) wurden mit Antiseren gegen die Fos Proteine ( $\alpha$ -Fos, verhindern DNA-Bindung von AP-1) oder die Jun Proteine ( $\alpha$ -Jun, verhindern DNA-Bindung von AP-1) für 2 h auf Eis vorinkubiert. Als Kontrolle wurde Prä-Immunsereum (PIS) verwendet. Danach wurde jeweils 25 fmol radioaktiv markiertes TRE-Oligonukleotid (huCol AP-1, mCol AP-1, mCD44 AP-1) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Die Positionen der AP-1/TRE Komplexe sind mit Pfeilen markiert. Die Antiseren selbst verursachen in Abwesenheit von Proteinextrakt (-) keine Ausbildung von Komplexen. Bei der Gelretardations-Analyse mit der huCol AP-1 Oligonukleotid-Probe ist das freie Oligonukleotid mit einem Pfeil (unten) gekennzeichnet.

Die fast vollständige Hemmung der DNA-Bindung durch Jun oder Fos spezifische Antikörper beweist, daß es sich bei den Komplexen, die an die AP-1 Sequenzen binden, um Jun/Fos Heterodimere handelt und daß auch in *c-fos* *-/-* Zellen keine Bindung von Jun /Jun Homodimeren nachweisbar ist.

Unter Verwendung von Antiseren, die spezifisch bestimmte Jun und Fos Proteine erkennen ( $\alpha$ -cJun,  $\alpha$ -Jun-B,  $\alpha$ -Jun-D,  $\alpha$ -cFos,  $\alpha$ -Fos-B,  $\alpha$ -Fra-1 und  $\alpha$ -Fra-2), wurden die Jun/Fos Heterodimere, die an die jeweiligen TRE-Oligonukleotide binden, in Gelretardations-Experimenten umfassend charakterisiert. Die Antiseren bewirken dabei die Ausbildung von "Supershifts", da sie Epitope in den Jun und Fos Proteinen erkennen, die nicht mit der AP-1 DNA-Bindung interferieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 (huCol AP-1), Abb. 17 (mCD44 AP-1) und Abb. 18 (mCol AP-1) für je zwei Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zelllinien dargestellt. Die aus Jun/Fos Heterodimeren und DNA bestehenden Hauptkomplexe sind nach TPA-Behandlung induziert. Bedingt vom angezeigten spezifischen Antiserum sind außerdem "Supershifts" sichtbar, die aus Antikörper (erkennt eine Dimer-Untereinheit), Jun/Fos Heterodimeren und Probe zusammengesetzt sind. Gleichzeitig bewirken die "Supershifts", abhängig vom Anteil der Dimere an der Gesamt-Bindungsaktivität, eine entsprechende Abschwächung der Hauptbande im Vergleich zum Prä-Immunsorum.

An die huCol AP-1 Sequenz (Abb. 16) und mCD44 AP-1 Sequenz (Abb. 17) binden in unbehandelten Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen Fra-2/X, JunB/X und cJun/X Komplexe. Die Menge dieser Dimere ist in *c-fos* *-/-* Zellen, im Vergleich zu Wildtyp Zellen, erhöht. Außerdem wurden in beiden Zelltypen Dimere mit Fra-1 und JunD nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es treten jedoch keine Dimere mit cFos und FosB in unbehandelten Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen auf. Nach TPA-Stimulation binden Heterodimere an die huCol und mCD44 AP-1 Sequenzen, bei denen alle Jun und Fos Proteine als Dimer-Untereinheit beteiligt sind, d.h. cJun/X, JunB/X, JunD/X (Daten nicht gezeigt), cFos/X, FosB/X, Fra-1/X (Daten nicht gezeigt) und Fra-2/X Heterodimere sind prinzipiell in der Lage *in vitro* an diese TRE-Sequenzen zu binden. Wie erwartet treten keine cFos/X Dimere in *c-fos* *-/-* Zellen auf. In cFos defizienten Zellen treten nach TPA-Induktion verstärkt Fra-2/X und JunB/X Dimere auf, die generell in beiden Zelltypen bevorzugt an die huCol AP-1 und mCD44 AP-1 Oligonukleotid-Proben binden.

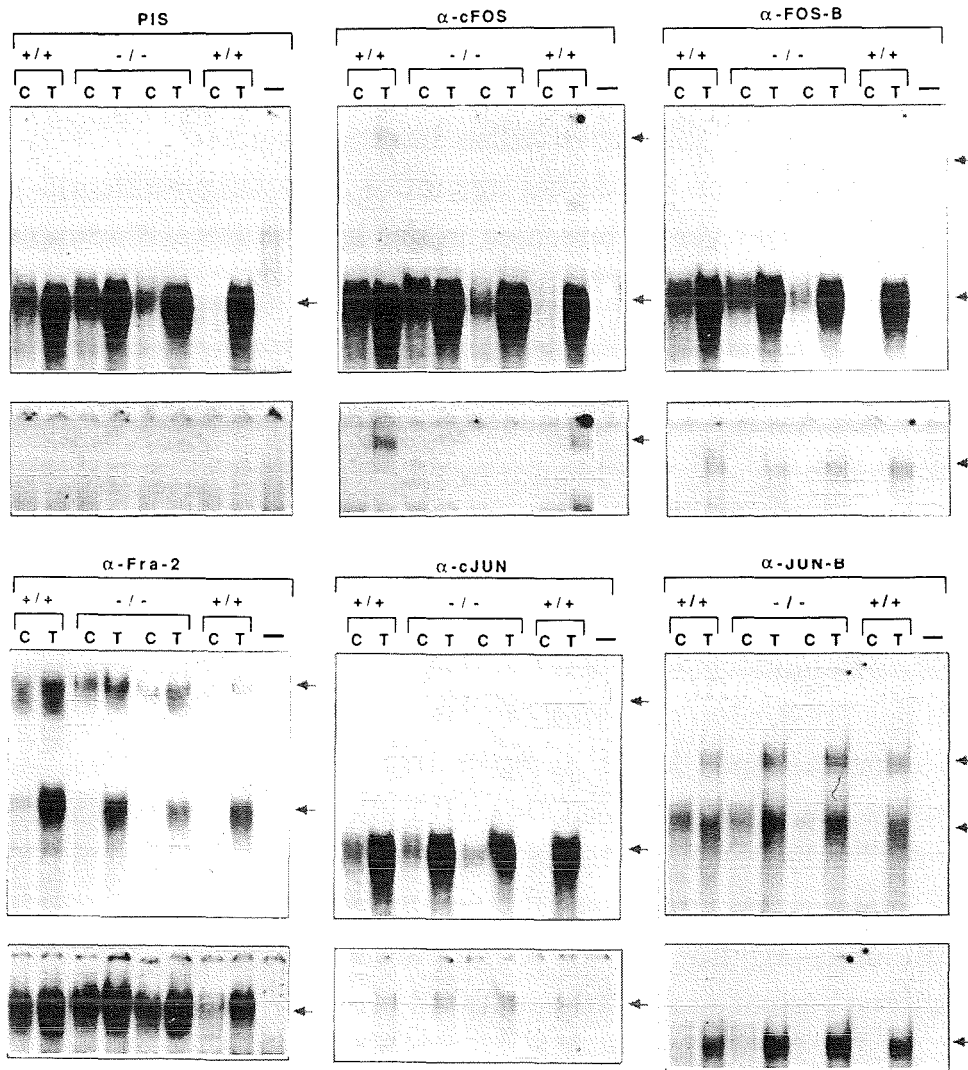
## huCol AP-1



**Abb. 16: Nachweis von AP-1 Untereinheiten, die *in vitro* an das TRE-Oligonukleotid huCol AP-1 binden.** Gesamt-Proteinextrakte (je 3  $\mu$ g) aus unbehandelten (C) oder für 3 h mit TPA (T, 100ng/ml) behandelten Wildtyp (+/+; WT56, f20) und *c-fos* *-/-* Zelllinien (-/-; f1, f10) wurden mit Antiseren, die die einzelnen Fos Proteine ( $\alpha$ -cFos,  $\alpha$ -FosB,  $\alpha$ -Fra-2) oder Jun Proteine ( $\alpha$ -cJun,  $\alpha$ -JunB) erkennen, bzw. mit Prä-Immunsereum (PIS) für 2 h auf Eis vorinkubiert. Die eingesetzten Antiseren sind gegen Epitope der Jun und Fos Proteine gerichtet, die nicht mit der DNA-Bindung von AP-1 interferieren. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Probe (huCol AP-1) und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Reaktionen auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Die ausgebildeten AP-1/TRE- und Antikörper/AP-1/TRE-Komplexe ("Supershifts") sind durch Peile gekennzeichnet. Die Antiseren selbst verursachen in Abwesenheit von Proteinextrakt (-) keine Ausbildung von Komplexen. Autoradiogramme nach längeren Expositionszeiten aus dem Bereich der Supershifts sind in den kleineren Ausschnitten am jeweiligen unteren Rand der Abbildung gezeigt.



mCD44 AP-1



**Abb. 17: Nachweis von AP-1 Untereinheiten, die *in vitro* an das TRE-Oligonukleotid mCD44 AP-1 binden.** Die Gelretardations-Analysen wurden unter Verwendung der radioaktiv markierten mCD44 AP-1 Oligonukleotid-Probe entsprechend Abb. 16 durchgeführt.

In unbehandelten Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen binden an die TRE-Sequenz des interstitiellen Kollagenase Gens der Maus (mCol AP-1) ebenfalls Dimere mit Fra-2, JunB und cJun (Abb. 18), sowie Dimere mit Fra-1 und JunD (Daten nicht gezeigt). Dabei ist der Anteil der Fra-2/X, JunB/X und cJun/X Dimere in *c-fos* *-/-* Zellen erhöht. Auch bei der mCol AP-1 Sequenz konnte keine Bindung von cFos/X und FosB/X Komplexen in unbehandelten Zellen detektiert werden.

Nach TPA-Induktion wurde bei der mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe ein grundlegender qualitativer Unterschied in der *in vitro* DNA-Bindung von AP-1 Komplexen festgestellt. Sowohl in Wildtyp als auch *c-fos* *-/-* Zellen binden keine FosB/X Dimere an die TRE-Sequenz des Maus Kollagenase I Promotors, während eine Bindung dieser Dimere bei der huCol AP-1 und mCD44 TRE-Sequenz auftrat. Dies ist nochmals im direkten Vergleich zur huCol AP-1 Probe in Abbildung 19 dargestellt. Unabhängig davon konnte in Wildtyp Zellen nach TPA-Stimulation eine Bindung von cFos/X, Fra-2/X, Fra-1/X (Daten nicht gezeigt), cJun/X, JunB/X und JunD/X (Daten nicht gezeigt) Komplexen an die mCol AP-1 Sequenz nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von cFos/X Dimeren wurde in *c-fos* *-/-* Zellen eine ähnlicher Befund wie beim Wildtyp festgestellt. Auch hier war der Anteil an Komplexen mit Fra-2, cJun und JunB in *c-fos* *-/-* Zellen erhöht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß an die TRE-Sequenzmotive huCol AP-1 und mCD44 AP-1 alle theoretisch möglichen Jun/Fos Heterodimere binden. Das gleiche trifft für die mCol AP-1 Probe, mit Ausnahme von FosB/X Dimeren, zu. Für alle drei Oligonukleotide wurde nachgewiesen, daß die Gesamt-Bindungsaktivität von AP-1 hauptsächlich aus Fra-2/X, JunB/X und cJun/X Dimeren besteht und daß deren Anteil in *c-fos* *-/-* Zellen noch weiter erhöht ist.

Der entscheidende Befund ist aber, daß keine FosB/X Dimere an die mCol AP-1 Sequenz binden. Dadurch ist die theoretische Möglichkeit ausgeschlossen, daß bei der Regulation der Expression von Kollagenase I fehlende cFos/X Dimere durch FosB/X Dimere ersetzt werden können und infolge dessen die Expression von Kollagenase I in *c-fos* *-/-* Zellen verändert ist.

## mCol AP-1

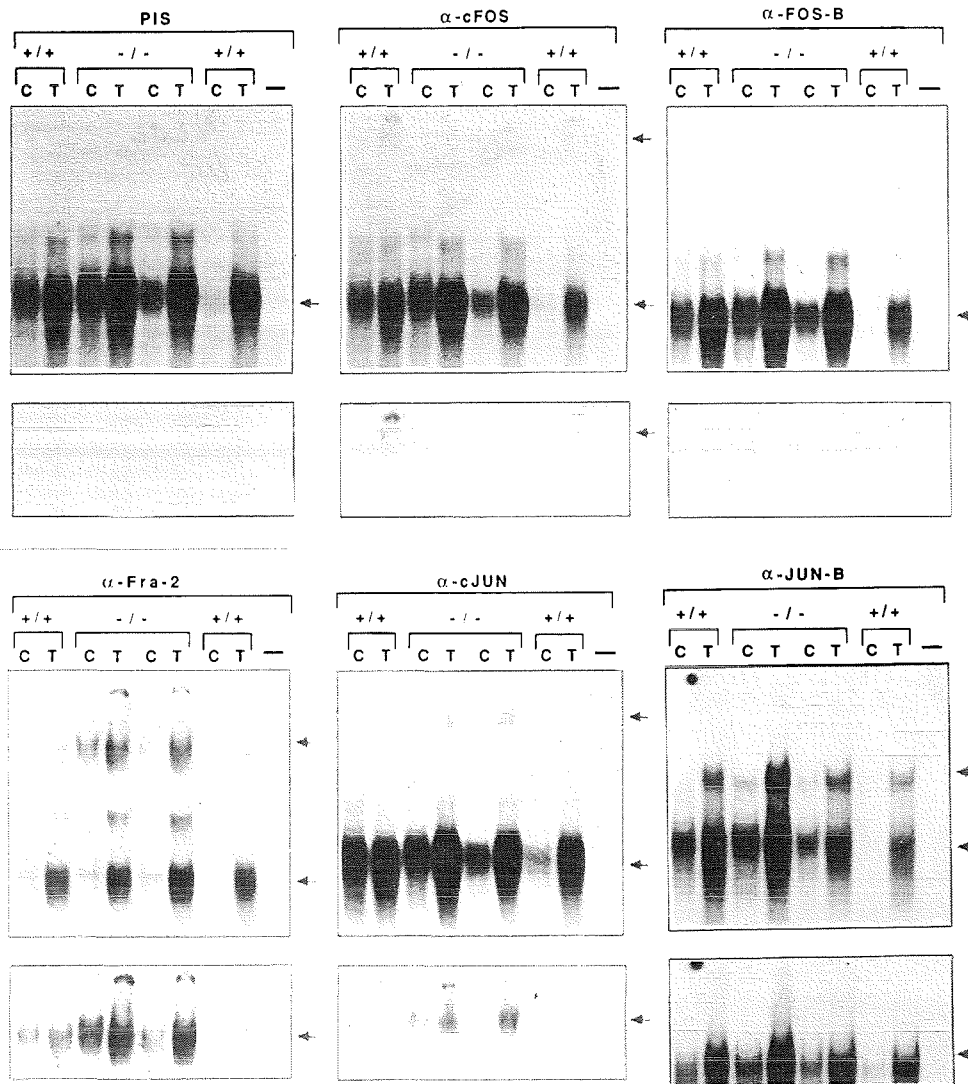
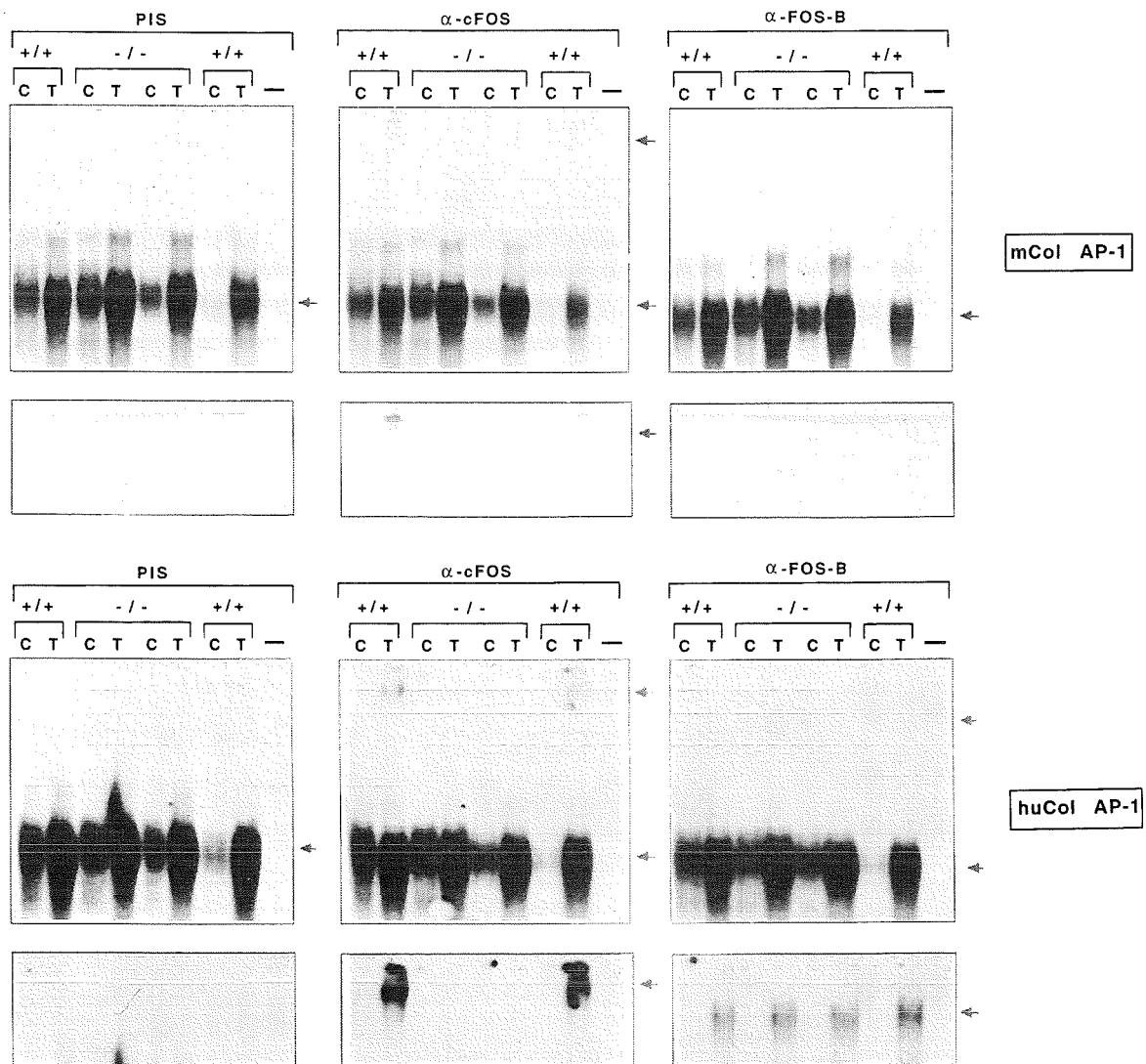


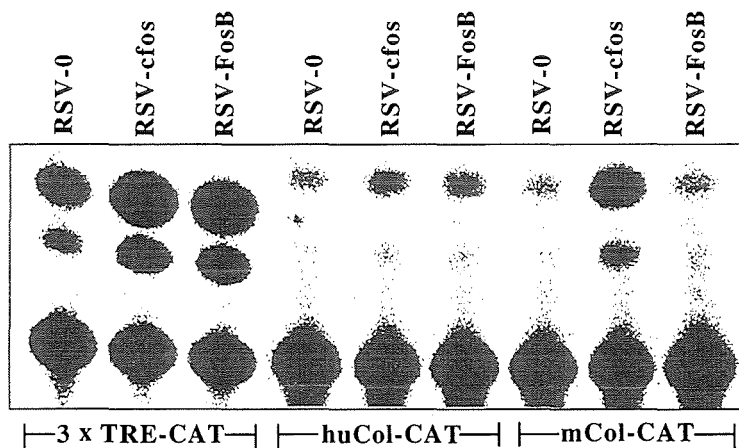
Abb. 18: Nachweis von AP-1 Untereinheiten, die *in vitro* an das TRE-Oligonukleotid mCol AP-1 binden. Die Gelretardations-Analysen wurden unter Verwendung der radioaktiv markierten mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe entsprechend Abb. 16 durchgeführt.



**Abb. 19: FosB bindet *in vitro* nicht an die TRE-Sequenz der interstitiellen Kollagenase der Maus.** Direkter Vergleich eines vergrößerten Ausschnitts von Abb. 18 (mCol AP-1; PIS,  $\alpha$ -cFos,  $\alpha$ -FosB) und Abb. 16 (huCol AP-1; PIS,  $\alpha$ -cFos,  $\alpha$ -FosB).

Um zu überprüfen, ob der, durch *in vitro* DNA-Bindungsstudien formulierte, molekulare Mechanismus der veränderten Kollagenase I Expression auch *in vivo* zutrifft, wurden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt (Abb. 20). Dazu wurden NIH 3T3 Zellen mit den Expressionsvektoren RSV-cFos, RSV-FosB und RSV-0 transient transfiziert. Als Reporterplasmide wurden entweder -73/+63 huCol-CAT oder -66/+29 mCol-CAT kotransfiziert. Diese Promotor CAT-

Konstrukte enthalten entsprechende Promotorsequenzen der interstitiellen Kollagenase des Menschen bzw. der Maus, d.h. die TRE-Sequenzmotive, die als Oligonukleotid-Proben für die *in vitro* DNA-Bindungsstudien eingesetzt wurden, liegen in diesen Promotorregionen vor. Außerdem wurden die transaktivierenden Eigenschaften von cFos und FosB an einem artifiziellen Promotor, der drei Kopien der TRE-Sequenz vom menschlichen Kollagenase I Promotor enthielt (3xTRE-tk-CAT), untersucht.



**Abb. 20: Expression von cFos aber nicht FosB führt zur Aktivierung des Promotors der interstitiellen Kollagenase der Maus.** NIH 3T3-Zellen wurden pro Petrischale ( $\varnothing$  9cm) mit 2.5  $\mu$ g der Reporterplasmide huCol-CAT (Promotorbereich -73/+63 der menschlichen Kollagenase I), mCol-CAT (Promotorbereich -66/+29 der Maus Kollagenase I) und 3xTRE-CAT (artifizielles Promotorkonstrukt mit 3 Kopien des Konsensus-TREs) transient transfiziert. Zusätzlich wurden je 7.5  $\mu$ g der Expressionsvektoren RSV-cFos oder RSV-FosB bzw. des entsprechenden "leeren" Expressionsvektors RSV-0 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte präpariert und die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt.

Sowohl die Expression von cFos als auch von FosB führt, mit vergleichbarer Effizienz, zu einer verstärkten CAT-Aktivität des -73/+63 huCol-CAT Reporterplasmids. Auch das 3xTRE-tk-CAT Reporterplasmid wird durch cFos und FosB in gleichem Umfang aktiviert. Im Gegensatz dazu ist bei der Kotransfektion des -66/+29 mCol-CAT Reporters ein deutlicher Unterschied zwischen cFos und FosB erkennbar. Während die Expression von cFos die CAT-Aktivität stark erhöht, kann FosB diese nur marginal steigern. Ein ähnlicher Befund konnte auch in GM 637 Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten der *in vitro* DNA-Bindungsstudien überein und beweisen, daß FosB/X Dimere nicht an das TRE des Maus Kollagenase I Promotors binden und folglich die Transkription nicht aktivieren können. Liegt umgekehrt ein TRE mit der Konsensussequenz aus dem humanen Kollagenase I Promotor, wie es beim Stromelysin-1 der Fall ist, oder ein TRE des CD44 Promotors vor, ist es möglich, daß cFos/X Dimere durch FosB/X Dimere kompensiert werden. Dies bedeutet, daß in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen, nach Behandlung mit TPA, zwei Klassen von AP-1 abhängigen Zielgenen definiert werden können, die sich abhängig von der Sequenz des TRE-Motivs im Promotor, in der funktionellen Redundanz zwischen cFos und FosB unterscheiden.

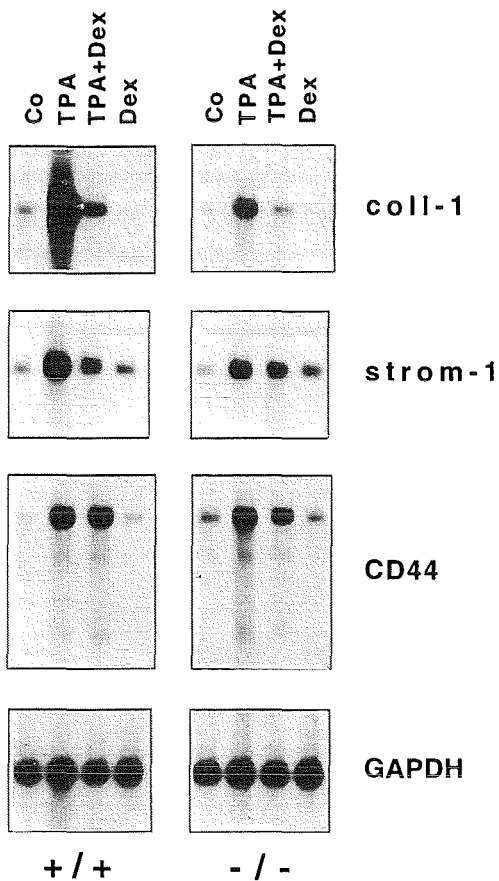
### **Basale und TPA induzierte Expression von Kollagenase I in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen wird durch Glucocorticoide gehemmt**

Die TPA-induzierte Expression von AP-1 abhängigen Zielgenen (z.B. Kollagenase, Stromelysin) wird durch Glucocorticoide fast vollständig aufgehoben. Dies beruht auf einer Hemmung der Transaktivierung durch Fos/Jun Komplexe, ohne deren DNA-Bindung am Promotor zu beeinflussen (König et al., 1992). Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, daß, abhängig vom Fos-Partner, Fos/Jun Dimere unterschiedlich beeinflußt werden. Transiente Transfektionsanalysen haben ergeben, daß cFos/cJun Dimere durch Glucocorticoide reprimiert, jedoch cJun/cJun und Fra-1/cJun Dimere aktiviert werden (Diamond et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995). Diese Daten lassen vermuten, daß der Glucocorticoidrezeptor in der Lage ist zwischen verschiedenen Komponenten der AP-1 Familie zu unterscheiden.

Um zu untersuchen, wie die Expression von AP-1 regulierten Genen (Kollagenase I, Stromelysin-1 und CD44) in Abwesenheit von cFos durch Glucocorticoide gesteuert wird, wurden Wildtyp und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen mit TPA in Ab- oder Anwesenheit von Dexamethason behandelt. Die Northern Blot Analyse ergab, daß in beiden Zelltypen sowohl die basale als auch die TPA-induzierte Expression von Kollagenase I durch Dexamethason reduziert wird (Abb. 21). Die TPA-induzierte Stromelysin-1 Expression wird in geringerem Ausmaß reprimiert, wohingegen die CD44 Expression durch Dexamethason kaum beeinflußt wird.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Glucocorticoid-vermittelte Hemmung der Expression von AP-1 Zielgenen durch das Fehlen von cFos nicht beeinflußt wird. Es

ist daher anzunehmen, daß die Funktion von cFos durch andere Fos Proteine kompensiert werden kann.

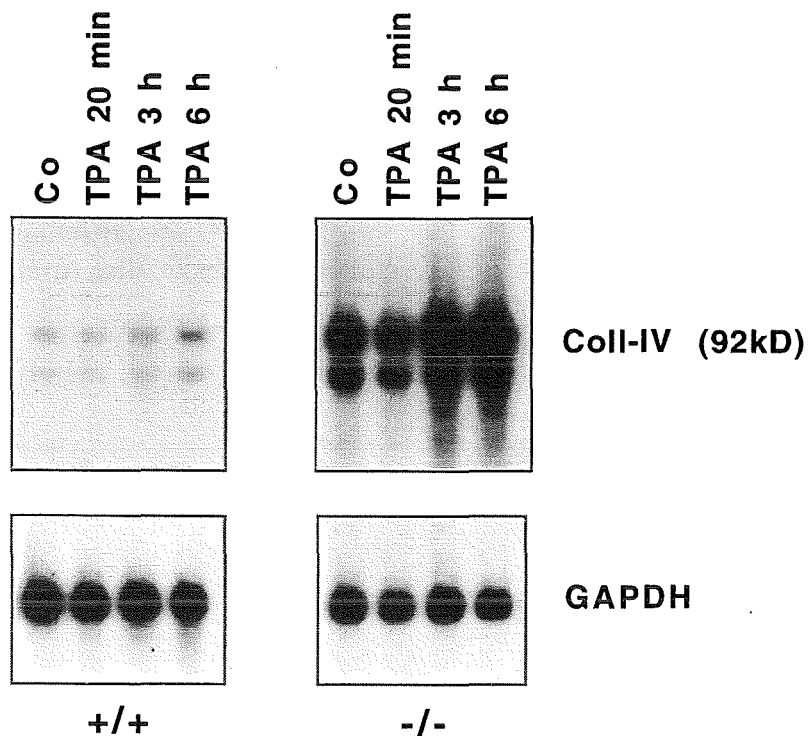


**Abb. 21: Das Fehlen von cFos hat keinen Einfluß auf die Hemmung der basalen und TPA-induzierten Expression von Kollagenase I durch Dexamethason.** Wildtyp (+/+) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen (-/-) wurden entweder unbehandelt belassen (Co) oder für 6h mit TPA (100ng/ml), Dexamethason (Dex, 10<sup>-7</sup> M f.c.) bzw. TPA und Dexamethason gleichzeitig (TPA+Dex) behandelt. Aus den Zellen wurde polyA<sup>+</sup> RNA isoliert, jeweils 6 µg RNA in einem 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an Kollagenase I (*coll-1*), Stromelysin-1 (*strom-1*), CD44 und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.

### Der Verlust von cFos führt zur verstärkten Expression der 92-kD Typ IV Kollagenase

Ein weiteres Gen, dessen TPA-induzierte Transkription in menschlichen Zellen durch AP-1 reguliert wird, ist die 92-kD Typ IV Kollagenase (Gelatinase B; Sato und Seiki, 1993). Um zu untersuchen, ob das homologe Gen der Maus ähnlich reguliert wird bzw. welche Auswirkungen das Fehlen von cFos auf die Expression der Kollagenase IV (92 kD) hat, wurden Wildtyp und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen mit TPA

behandelt, poly A<sup>+</sup> RNA präpariert und eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Im Gegensatz zur reduzierten Kollagenase I Expression wurden in *cFos* defizienten Zellen sowohl basal als auch nach TPA-Induktion (3 h und 6 h) wesentlich höhere Mengen an Gelatinase B mRNA als in Wildtyp Zellen nachgewiesen (Abb. 22). In Wildtyp Zellen konnte 6 h nach der TPA-Behandlung eine maximale Expression von Kollagenase IV (92 kD) beobachtet werden. Die zu diesem Zeitpunkt festgestellte mRNA Menge ist aber noch deutlich geringer als der Basalwert in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen.

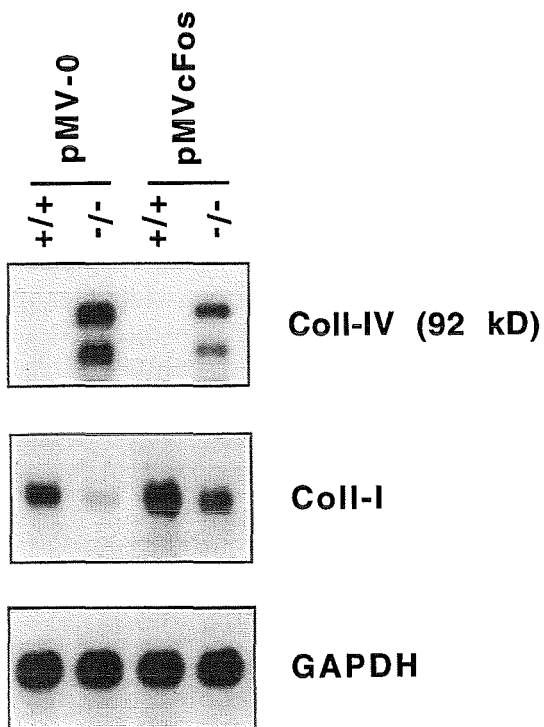


**Abb. 22: Expression der 92-kD Typ IV Kollagenase ist erhöht in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen.** Wildtyp (+/+) und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen (-/-) wurden nicht (Co) oder für 20 min, 3 h oder 6 h mit TPA (100ng/ml) behandelt. Aus den Zellen wurde polyA<sup>+</sup> RNA isoliert, jeweils 6 mg RNA in einem 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an 92-kD Typ IV Kollagenase (Coll-IV 92 kD) und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.

Durch Wiedereinführung von exogenem *c-fos* in *c-fos* <sup>-/-</sup> und Wildtyp Zellen wurde überprüft, ob die erhöhte Expression von Kollagenase IV (92 kD) ursächlich auf dem Verlust von *cFos* beruht oder auf sekundäre Effekte bei der Etablierung



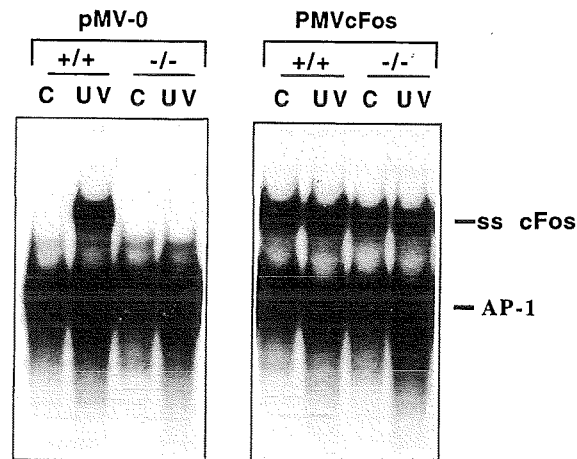
der Zellen zurückzuführen ist. Dazu wurden beide Zelltypen mit Retroviren, die eine konstitutive Überexpression von cFos ermöglichen, transient infiziert. Nachfolgend wurde die Expression der Gelatinase B auf mRNA-Ebene bestimmt (Abb. 23). Man erkennt, daß exogenes cFos (pMV-cFos), im Vergleich zur Kontrollinfektion (pMV-0), die verstärkte, basale Expression in *c-fos*  $-/-$  Zellen partiell reduzieren kann. Außerdem führt die Infektion mit pMV-cFos Viren auch in Wildtyp Zellen zu einer Verringerung der Menge an basal exprimierter Kollagenase IV (92 kD) mRNA. Im Gegensatz dazu wird durch exogenes cFos die Expression der Kollagenase I in Wildtyp und *c-fos*  $-/-$  Zellen gesteigert.



**Abb. 23: Exogen exprimiertes cFos vermindert die Expression der 92-kD Typ IV Kollagenase in *c-fos*  $-/-$  Zellen.** Wildtyp (+/+) und *c-fos*  $-/-$  Zellen (-/-) wurden in Gegenwart von Polybren (8  $\mu$ g/ml f.c.) mit Überständen der retroviralen WE Produzenten-Zelllinien pMV-0 und pMVcFos transient infiziert. Aus den Zellen wurde 24 h nach der Infektion polyA<sup>+</sup> RNA isoliert, jeweils 6  $\mu$ g RNA in einem 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an 92-kD Typ IV Kollagenase (Coll-IV 92 kD) und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.

Zur Kontrolle der Infektionseffizienz wurde parallel eine Gelretardations-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe eines Konsensus-TRE-Oligonukleotids (huCol AP-1) und der Vorinkubation mit cFos-spezifischem Antikörper wurde die Menge an exogen exprimierten cFos Protein in infizierten Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle diente die UV-induzierte Expression von endogenem cFos in Wildtyp Zellen. Durch die retrovirale Infektion (pMV-cFos) kommt es zur Expression von exogenem cFos in den *c-fos*  $-/-$  Zellen (Abb. 24). Die exprimierte Proteinmenge in *c-*

*fos*<sup>-/-</sup> Zellen ist dabei mit der durch UV-Strahlung induzierten Menge in *c-fos*<sup>+/+</sup> Zellen vergleichbar und belegt eine hohe Expressionsrate.



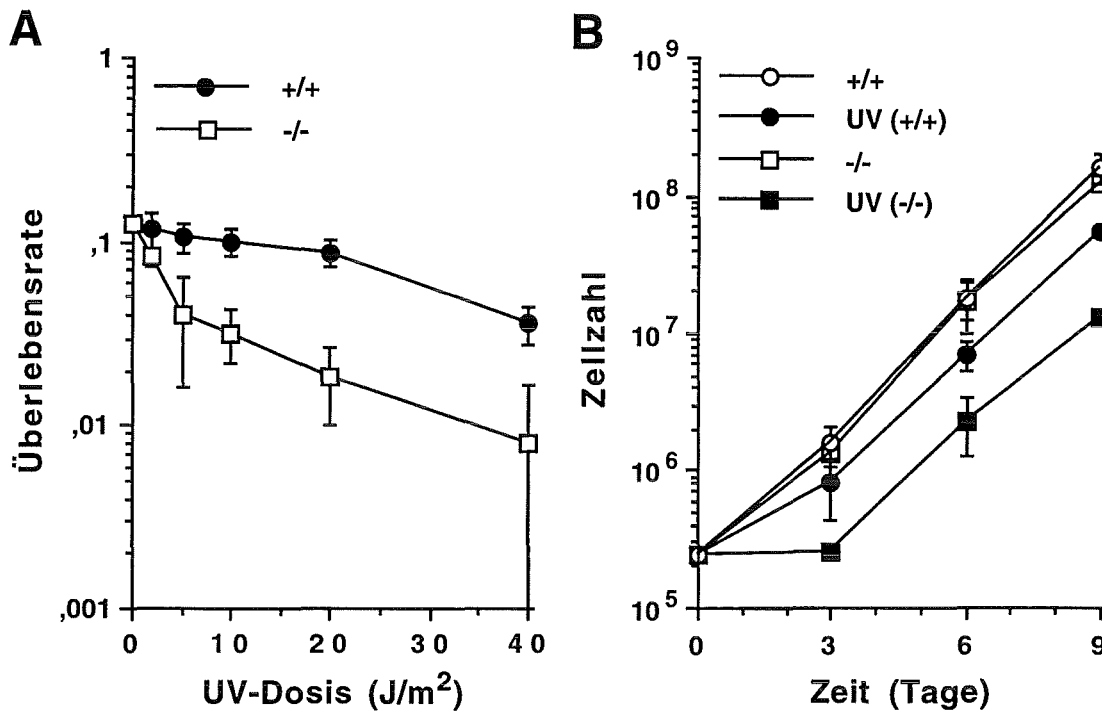
**Abb. 24: DNA-Bindung von exogen exprimiertem cFos.** Wildtyp (+/+) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen (-/-) wurden, wie in Abb. 23 beschrieben, transient infiziert und anschließend UV-bestrahlt ( $40 \text{ J/m}^2$  UVC) bzw. nicht bestrahlt (C). 6 h später wurden Gesamt-Proteinextrakte aus den Zellen isoliert und jeweils  $5 \mu\text{g}$  für eine Gelretardations-Analyse eingesetzt. Die Proteinextrakte wurden mit einem cFos spezifischen Antiserum für 2 h auf Eis vorinkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Probe (huCol AP-1) und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Reaktionen auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. AP-1, AP-1/DNA-Komplex; ss cFos, cFos-spezifischer "Supershift".

Aus diesen Ergebnissen kann einerseits abgeleitet werden, daß zwischen der Expression von cFos und der Kollagenase IV (92 kD) ein kausaler, reziproker Zusammenhang besteht, d.h. cFos wirkt antagonistisch auf die Expression dieses Gens. Welcher molekulare Mechanismus dafür verantwortlich ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Andererseits bestätigen diese Daten eindeutig, daß die reduzierte Expression von Kollagenase I in *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen auf das Fehlen von cFos zurückzuführen ist.

## **cFos ist eine essentielle Komponente in der UV-Anwort von Säugetierzellen**

Der Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt Geninduktion durch extrazelluläre Signale, die eine genotoxische Wirkung ausüben, wie z.B. UV-Strahlung und chemische Karzinogene. Diese Agenzien induzieren sowohl die Expression der frühen Gene wie z.B. *c-jun* und *c-fos* als auch der späten Gene wie z.B. Kollagenase I, Stromelysine und Metallotheonin IIa (Herrlich et al., 1992). Für die UV-Induktion der späten Gene könnte, analog zur TPA-Induktion, die Expression von Fos und Jun notwendig sein. Im Gegensatz zu der relativ frühen, maximalen Induktion von Kollagenase I und Stromelysin-1 und -2 nach TPA-Behandlung weist die Expression dieser Gene in UV-bestrahlten Zellen eine verzögerte Kinetik auf. Es gibt klare Hinweise darauf, daß nach UV-Strahlung sezernierte Faktoren, darunter  $IL-1\alpha$  und bFGF (zusammengefaßt als EPIF = extrazellulärer Proteinsynthese induzierender Faktor), für diese Induktion verantwortlich sind (Schorpp et al., 1984; Krämer et al., 1993). Welche Rolle das cFos Protein bei der Induktion von AP-1 abhängigen Genen durch genotoxische Substanzen spielt und welche Funktion cFos bei der generellen Antwort der Zelle auf diese Substanzen hat, wurde in *c-fos*  $-/-$  Zellen untersucht.

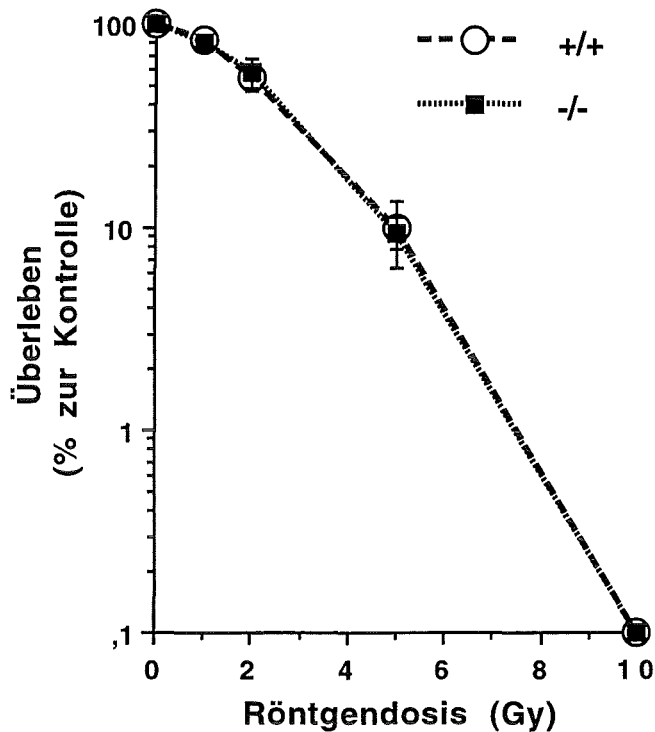
Zunächst wurde bestimmt, ob cFos eine protektive Funktion beim Überleben einer Zelle nach UV-Bestrahlung besitzt. Bei steigenden UV-Dosen wurde die Anzahl der Zellkolonien, die sich aus einzelnen Zellen ableiten, detektiert. Das klonale Überleben von zwei unabhängigen *c-fos*  $-/-$  Zelllinien war im Vergleich zu Wildtyp Zelllinien deutlich reduziert (Abb. 25 A). Bei einer UV-Dosis von  $20 \text{ J/m}^2$  wurden fünfmal mehr Wildtyp als *c-fos*  $-/-$  Kolonien festgestellt. Die Proliferationsrate von UV-bestrahlten *c-fos*  $-/-$  Zellen war ebenfalls vermindert (Abb. 25 B). Drei Tage nach der UV-Bestrahlung wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt, wobei Wildtyp Zellen 55 % und *c-fos*  $-/-$  Zellen 20 % der Anzahl erreichten, die bei entsprechenden unbestrahlten Zellen ermittelt wurde. Zu späteren Zeitpunkten war die Proliferationsrate von Wildtyp und *c-fos*  $-/-$  Zellen vergleichbar. Die signifikante Reduktion des klonalen Überlebens und der Proliferationsrate beweisen, daß das Fehlen des cFos Proteins eine UV-Hypersensitivität in *c-fos*  $-/-$  Zellen hervorruft.



**Abb. 25: Der Verlust von cFos reduziert die Proliferation und die Überlebensfähigkeit von Zellen und nach UV-Bestrahlung. A:** Je 500 Wildtyp (+/+) und *c-fos* -/- Zellen (-/-) wurden ausgesät und 8 h später mit steigenden Dosen an UVC bestrahlt. Nach 12 Tagen wurden die Zellen fixiert, mit Methylenblau angefärbt und die Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt. Die Überlebensraten der Zellen (Anzahl der Kolonien/500 Zellen) bei verschiedenen UV-Dosen sind gezeigt. Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$ SD aus 3 parallelen Ansätzen mit je 2 Wildtyp (f20, WT56) und *c-fos* -/- (f1, f10) Zelllinien. **B:** Pro Ansatz wurden  $2.5 \times 10^5$  Wildtyp (+/+) und *c-fos* -/- Zellen ausgesät und 8 h später mit  $10 \text{ J/m}^2$  UVC (UV) bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Alle 3 Tage wurde die Zellen passagiert und die Zellzahl bestimmt. Die Proliferationskurven stellen die Mittelwerte  $\pm$ SD von Experimenten mit 3 Wildtyp (NIH 3T3, f20, WT56) und 2 *c-fos* -/- (f1, f10) Zelllinien dar.  
aus: Schreiber et al., 1995

Ist die Hypersensitivität der *c-fos* -/- Zellen spezifisch für UV-Strahlung oder resultiert die Behandlung mit anderen DNA-schädigenden Agenzien in einem ähnlichen Phänotyp? Zur Beantwortung dieser Frage habe ich Wildtyp und *c-fos* -/- Zellen verschiedenen Dosen an  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt und deren Überlebensfähigkeit gemessen. Der Vergleich der Dosis-Effekt-Kurven beider Zelltypen (Abb.26) veranschaulicht, daß *c-fos* -/- Zellen keine veränderte Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlung haben. Die durch Röntgenstrahlung induzierte Expression von *c-fos* (Sherman et al., 1990) ist also nicht an einem protektiven

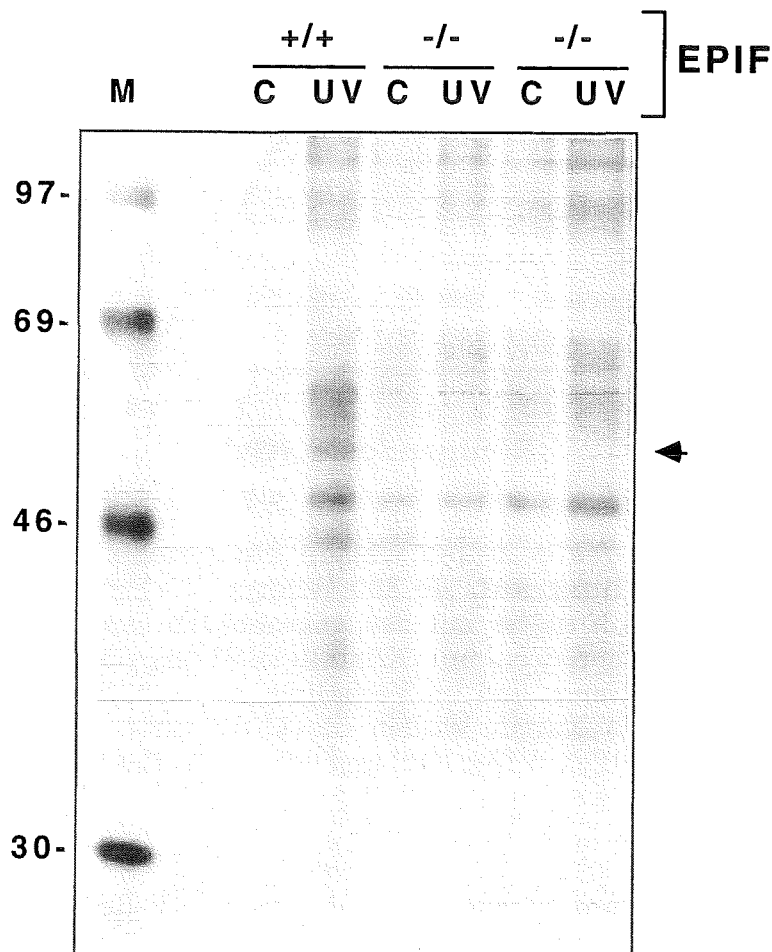
Mechanismus beteiligt und legt eine spezifische Funktion von cFos in der UV-Antwort nahe.



**Abb. 26: Wildtyp und *c-fos*  $-/-$  Zellen weisen die gleiche Überlebensfähigkeit nach Röntgenbestrahlung auf.** Je 300 Wildtyp (+/+) und *c-fos*  $-/-$  Zellen ( $-/-$ ) wurden ausgesät und 24 h später mit den angegebenen Dosen bestrahlt. Nach 12 Tagen wurden die Zellen fixiert, mit Kristallviolett angefärbt, die Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt und im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle das Überleben errechnet. Die Kurven stellen die Mittelwerte  $\pm$ SD aus 2 parallelen Ansätzen mit je 3 Wildtyp (f20, WT56, F13) und *c-fos*  $-/-$  (f1, f10, f9) Zelllinien dar.

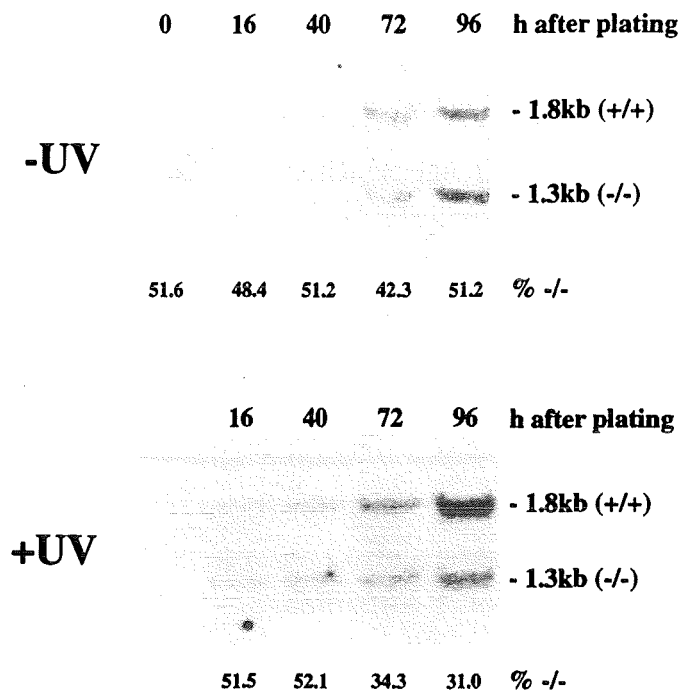
Der Faktor EPIF kann mehrere Stunden nach UV-Bestrahlung im Kulturmedium von HeLa Zellen nachgewiesen werden und ist in der Lage in unbestrahlten Zellen die UV-Antwort zu induzieren (z.B. Expression von Kollagenase I; Schorpp et al., 1984; Angel et al., 1987a; Krämer et al., 1993). Um zu überprüfen, ob eine EPIF Aktivität in *c-fos*  $-/-$  Zellen produziert wird, wurden Wildtyp Zellen mit Kulturmedium von UV-bestrahlten Wildtyp und *c-fos*  $-/-$  Zellen inkubiert und in vivo mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Als Parameter für die im konditionierten Medium enthaltene EPIF Aktivität diente die Neusynthese und Sekretion des Kollagenase I Proteins. Die sezernierten Proteine der Zielzellen wurden dazu auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradio-

graphie sichtbar gemacht (Abb. 27). Man erkennt, daß das konditionierte Kulturmedium von UV-bestrahlten Wildtyp Zellen die Synthese eines Proteins von ca. 55kD in den Rezipientenzellen induziert, das dem Molekulargewicht der Kollagenase I entspricht. Konditionierte Kulturmedien von zwei unterschiedlichen *c-fos* *-/-* Zelllinien (f1, f10) sind dagegen nicht in der Lage die Expression und Sekretion dieses Proteins in den Zielzellen zu induzieren. Dies deutet darauf hin, daß die UV-induzierte EPIF Produktion in *c-fos* *-/-* Zellen beeinträchtigt ist.



**Abb. 27: Im Kulturmedium von UV-bestrahlten *c-fos* *-/-* Zellen ist keine EPIF-Aktivität vorhanden.** Zielzellen (Wildtyp Zellen) wurden mit Kulturmedium (EPIF) inkubiert, das von unbestrahlten (C) oder UVC-bestrahlten ( $40 \text{ J/m}^2$ ; UV) Wildtyp (+/+) und *c-fos* *-/-* Zellen (-/-, f1, f10) stammte. Die Zielzellen wurden 8 h nach der Inkubation für 3 h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin in Kultur markiert, die sezernierten Proteine mit TCA gefällt und in einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte der in Spur M aufgetrennten Eichproteine in kD an. Die Position eines induzierten Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Ist die fehlende EPIF Aktivität für die UV-Hypersensitivität der *c-fos* *-/-* Zellen verantwortlich ? Um diese Frage zu beantworten, wurden *c-fos* *+/+* und *c-fos* *-/-* Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt und gemeinsam kultiviert. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde das Mengenverhältnis beider Zelltypen in unbehandelten und UV-bestrahlten Ansätzen verfolgt. Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen konnten anhand der unterschiedlichen *c-fos* Genloci in der Southern Blot Analyse unterschieden und die relativen Anteile an der Gesamtpopulation bestimmt werden. Wie es bei vergleichbaren Proliferationsraten beider Zelltypen zu erwarten ist, veränderte sich in unbestrahlten Kulturen das Ausgangsverhältnis von 1:1 nicht (Abb. 28). Im Verlauf von 96 Stunden nach UV-Bestrahlung der Zellen wurden jedoch zunehmend geringere Anteile an *c-fos* *-/-* Zellen festgestellt (gemessen an der geringeren Intensität der für *c-fos* *-/-* Zellen charakteristischen Bande). Dies bestätigt die Unterschiede in der Proliferationsrate und bedeutet, daß UV-induzierte, von *c-fos* *+/+* Zellen sezernierte Faktoren nicht ausreichend sind, die UV-Hypersensitivität von *c-fos* *-/-* Zellen aufzuheben.

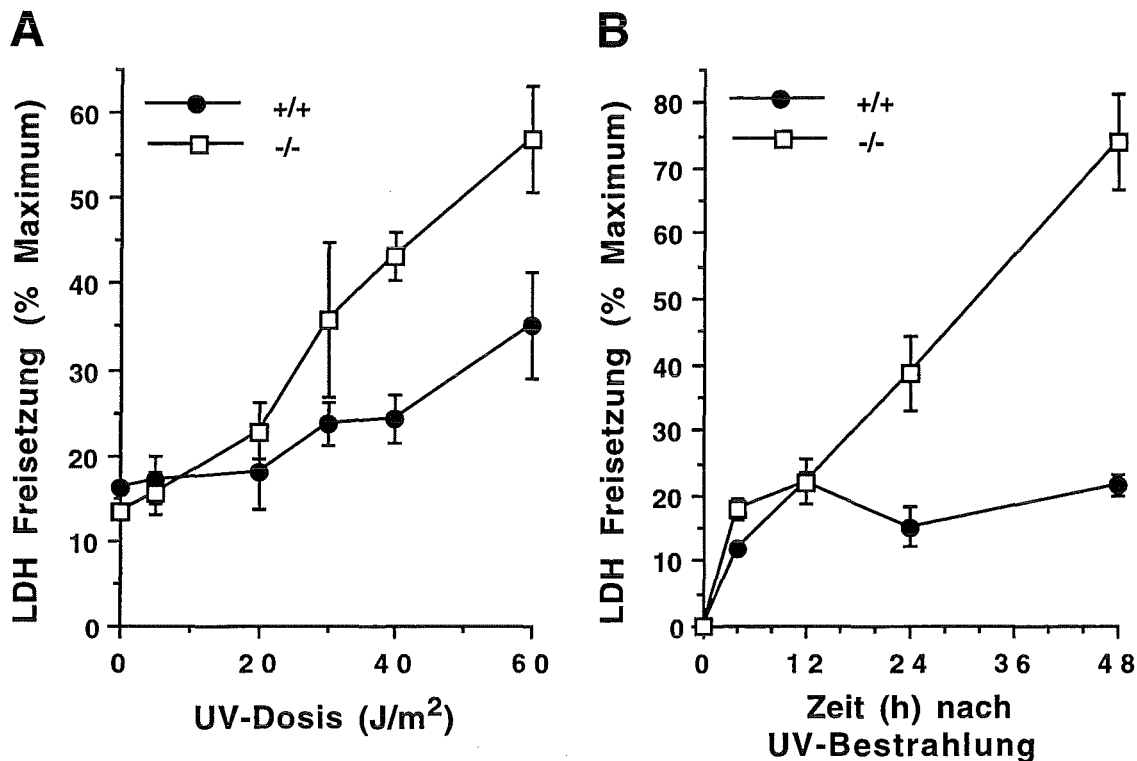


**Abb. 28: Kokultivierung mit Wildtyp Zellen hat keinen Einfluß auf die Proliferationsrate von *c-fos* *-/-* Zellen nach UV-Bestrahlung.** Wildtyp (+/+) und *c-fos* *-/-* Zellen (-/-) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und gemeinsam kultiviert. 6 h nach dem Aussäen wurden die Zellen UV-bestrahlt (+UV, 10 J/m<sup>2</sup> UVC) bzw. nicht bestrahlt (-UV). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Aussäen wurden die Zellen (3-fache Ansätze) geerntet und Southern Blot Analysen durchgeführt. Nach Restriktion mit Pvu II repräsentiert die 1.8 kb Bande das Wildtyp Allel von *c-fos*, während in *c-fos* *-/-* Zellen eine 1.3 kb Bande dem durch homologe Rekombination inaktivierten *c-fos* Allel entspricht. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe eines PhosphoImager-Systems quantifiziert. Der daraus berechnete prozentuale Anteil von *c-fos* *-/-* Zellen in der Kokultur (% -/-) ist jeweils unterhalb der Abbildung angeführt. aus: Schreiber et al., 1995

Da UV-Strahlung die Proliferationsrate von *c-fos* *-/-* Zellen reduziert, wurde untersucht, ob ein vermehrter Zelltod die primäre Ursache für diesen Befund ist. Die Menge des zytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH), das infolge von Zellyse in das Kulturmedium freigesetzt wird, wurde als indirektes Maß für Zelltod verwendet. Die quantitative Bestimmung von LDH, die 36 Stunden nach UV-Bestrahlung ins Kulturmedium freigesetzt wurde, ergab für *c-fos* *-/-* Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, einen 2-fach erhöhten Wert (Abb. 29 A). Der zeitliche Verlauf der LDH-Freisetzung war in den ersten 12 Stunden nach der Bestrahlung

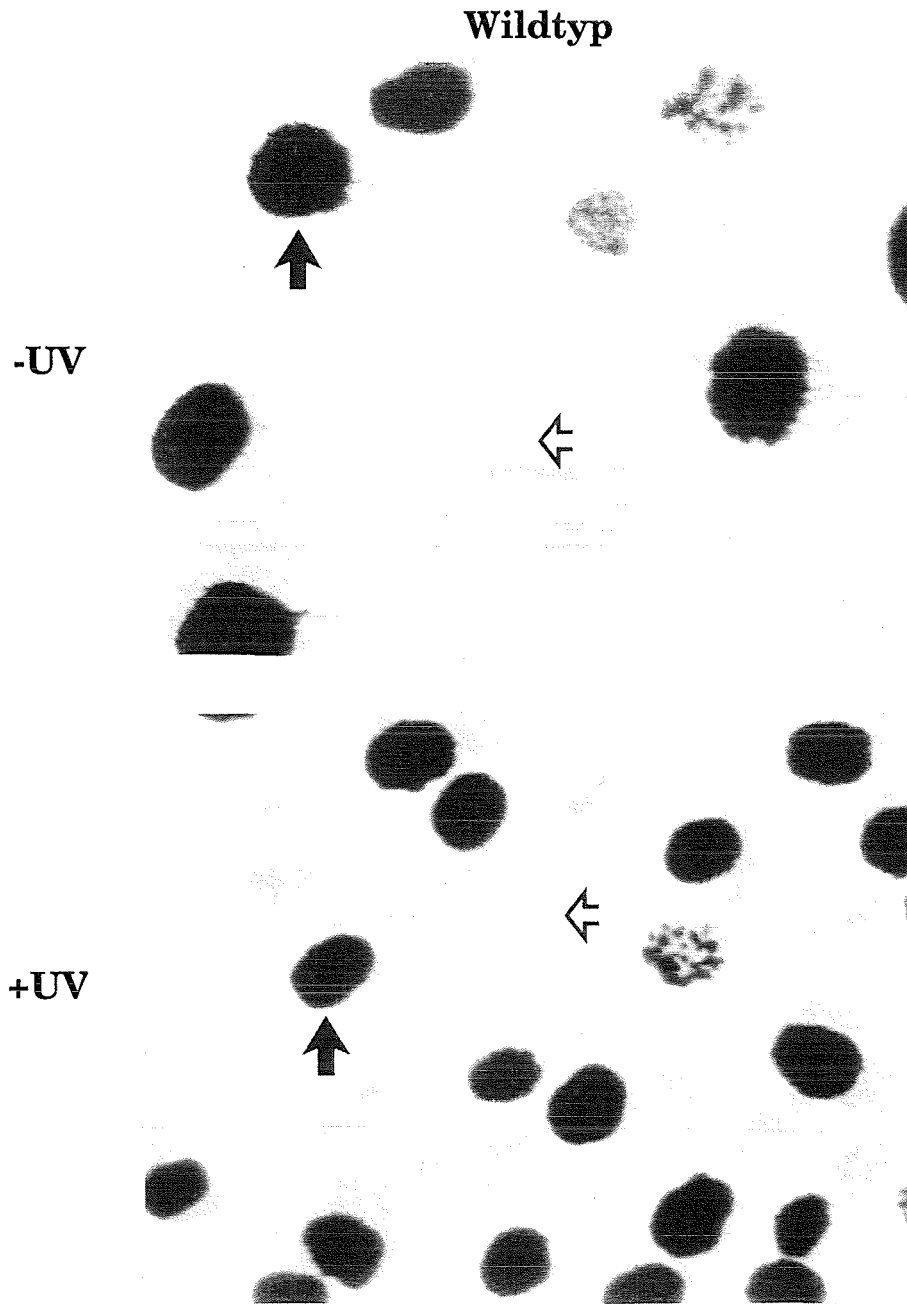


für beide Zelltypen vergleichbar und stieg bei *c-fos* *-/-* Zellen in den nächsten 36 h linear an, während bei *c-fos* *+/+* Zellen keine Veränderung festgestellt wurde (Abb. 29 B). Daher konnte 48 h nach der Bestrahlung eine signifikant größere Menge an freigesetztem LDH im Kulturmedium von *c-fos* *-/-* Zellen gemessen werden. Dieser Unterschied verdeutlicht den drastischen Anstieg an abgestorbenen Zellen, die kein funktionelles cFos haben und bestätigt die UV-Hypersensitivität dieser Zellen.

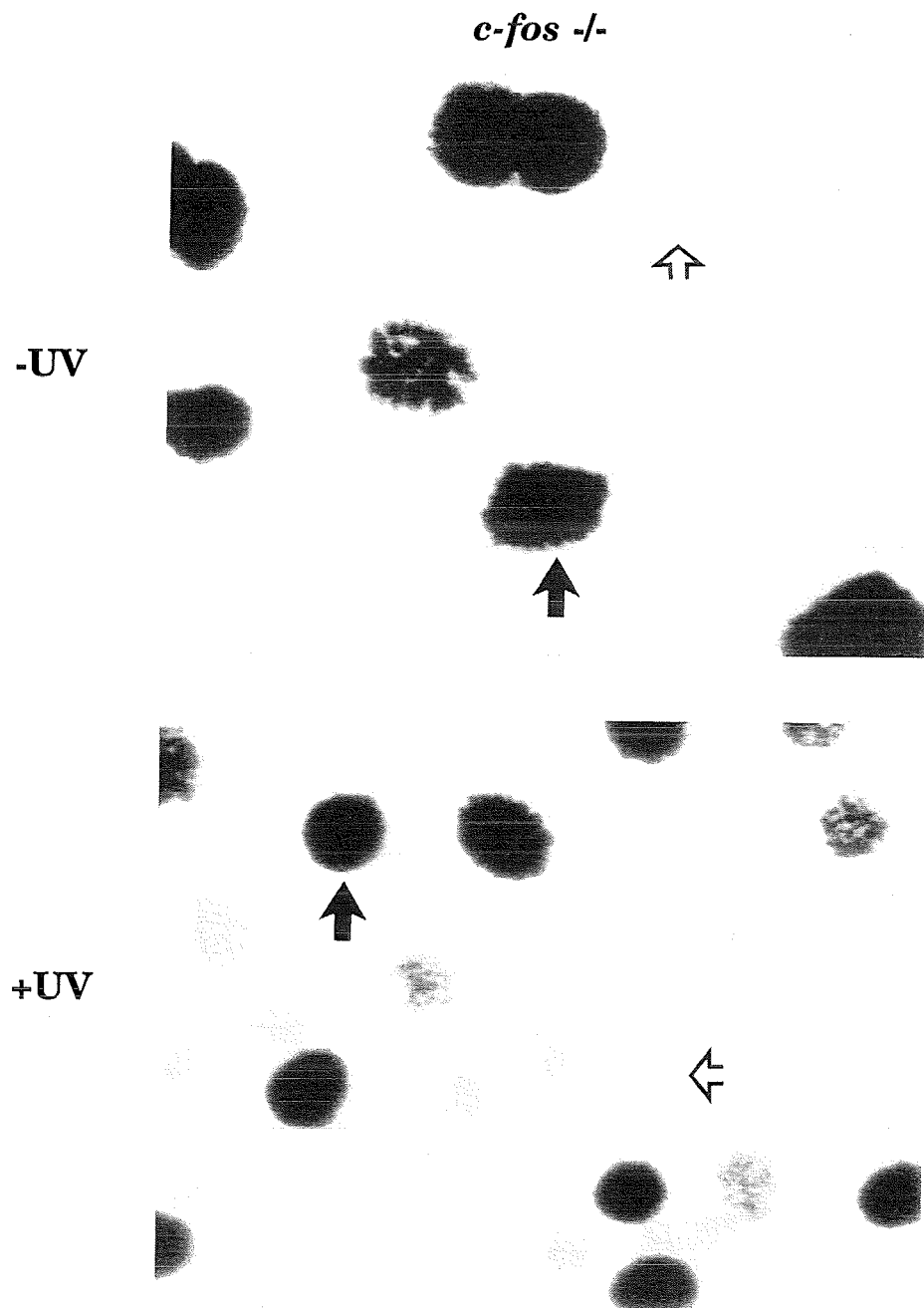


**Abb. 29: UV-Bestrahlung führt zu verstärktem Zelltod bei *c-fos* *-/-* Zellen. A:** Wildtyp (*+/+*) und *c-fos* *-/-* Zellen (*-/-*) wurden mit steigenden Dosen an UVC bestrahlt. 36 h nach der Bestrahlung wurde der Anteil an toten Zellen indirekt durch einen Enzymtest nachgewiesen. Dabei wurde die Menge an Lactatdehydrogenase (LDH), die infolge von Zellyse ins Kulturmedium freigesetzt wurde, kolorimetrisch bestimmt. Alle Werte sind in Prozent von der maximalen LDH Freisetzung angegeben. Der maximale Wert an freigesetztem LDH (=100%) wurde durch Behandlung von Kontrollzellen mit Triton X-100 bestimmt. **B:** Die Menge an freigesetztem LDH (% Maximum) wurde zu verschiedenen Zeiten nach der UVC-Bestrahlung (40 J/m<sup>2</sup>) bestimmt. In A und B sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$ SD aus 3 parallelen Ansätzen mit je 2 Wildtyp (f20, WT56) und *c-fos* *-/-* (f1, f10) Zelllinien gezeigt.  
aus: Schreiber et al., 1995

Alle bekannten UV-sensitiven Zelllinien, für die eine genetische Ursache identifiziert wurde, weisen Defekte bei der DNA-Reparatur auf (Carr und Hoekstra, 1995). Daher war es naheliegend anzunehmen, daß auch in *c-fos* *-/-* Zellen Veränderungen in der DNA-Reparatur-Effizienz auftreten. UV-induzierte DNA-Läsionen (vor allem Pyrimidindimere) werden primär durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur beseitigt. Dabei folgt dem Ausschneiden der DNA-Läsionen eine sogenannte "außerplanmäßige DNA-Synthese" (unscheduled DNA synthesis, UDS), die durch Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin sichtbar gemacht werden kann. Die radioaktive Markierung der DNA ist proportional zur Effizienz der DNA-Reparatur und ermöglicht damit die Messung der Reparaturfähigkeit der untersuchten Zellen. In *c-fos* *+/+* und *c-fos* *-/-* Zellen habe ich die UDS-Effizienz auf Einzelzellebene durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau und nachfolgender *in situ* Autoradiografie bestimmt (Abb. 30 und 31). Die stark markierten S-Phase-Kerne, die auf Grund der semi-konservativen DNA-Replikation hohe <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbausraten haben, sind sehr leicht von Nicht-S-Phase Kernen zu unterscheiden. Nach UV-Bestrahlung erkennt man im Vergleich zu unbestrahlten Zellen in allen Nicht-S-Phase-Kernen körnig markierte Strukturen (Silberkörner), die auf UV-induzierter UDS beruhen. Dies macht deutlich, daß sowohl Wildtyp als auch *c-fos* *-/-* Zellen qualitativ UDS-positiv waren.



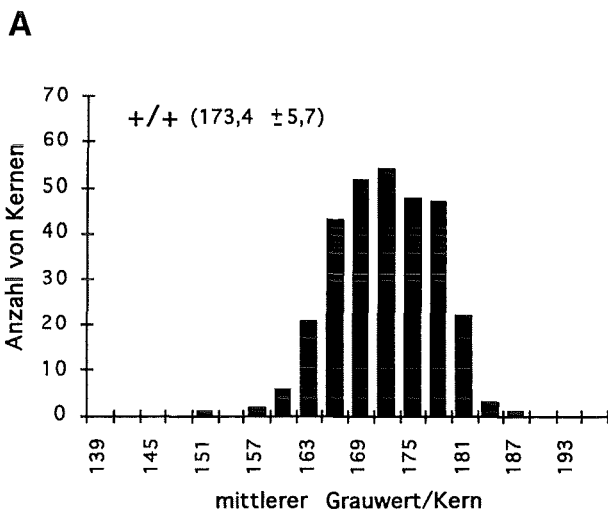
**Abb. 30: Außerplanmäßige DNA-Synthese (UDS) in Wildtyp Zellen.** Wildtyp Zellen (+/+) wurden auf Kammer-Objektträgern (chamber slides) kultiviert, mit  $40 \text{ J/m}^2$  UVC bestrahlt (+UV) bzw. nicht bestrahlt (-UV) und für 2 h mit  $^3\text{H}$ -Thymidin in Kultur markiert. Nachfolgend wurden die Zellen fixiert, mit einer Photoemulsion beschichtet und 8 Tage bei  $4^\circ\text{C}$  exponiert. Nach Entwickeln und Fixieren wurden die Präparate mit Giemsa gefärbt. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen (400x) der Präparate. S-Phase-Kerne sind durch schwarze Pfeile, Nicht-S-Phase-Kerne durch offene Pfeile markiert.



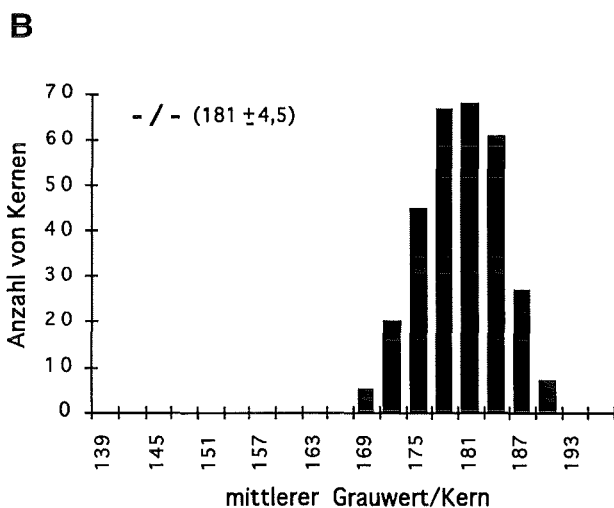
**Abb. 31: Außerplanmäßige DNA-Synthese (UDS) in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen.** *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen wurden, wie in Abb. 30 beschrieben, behandelt und analysiert.

Zur quantitativen Auswertung der UDS-Versuche wurden nur Zellen herangezogen, die eindeutig nicht in der S-Phase waren. Die Anzahl der Silberkörner in Kernen UV-bestrahlter Zellen wurde mittels eines automatischen Bildverarbeitungssystems bestimmt (Colourmorph Version 4.2). Dieses System errechnet in Abhängigkeit von der Anzahl der Körner (bzw. der dadurch hervorgerufenen Schwärzung) eines Zellkerns einen mittleren relativen Grauwert.

Dabei haben Kerne mit wenigen Körnern hohe Grauwerte. Abbildung 32 gibt die Häufigkeitsverteilung der mittleren Grauwerte von Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellkernen an. Die statistischen Mittelwerte der Grau-werte beider Zelltypen waren nicht signifikant unterschiedlich. Sowohl die quantitative als auch die qualitative Auswertung der UDS-Versuche demonstrierten, daß *c-fos* *-/-* Zellen zur UV-induzierten Nukleotid-Exzisions-Reparatur fähig sind, und daß diese mit gleicher Effizienz wie in Wildtyp Zellen stattfindet.



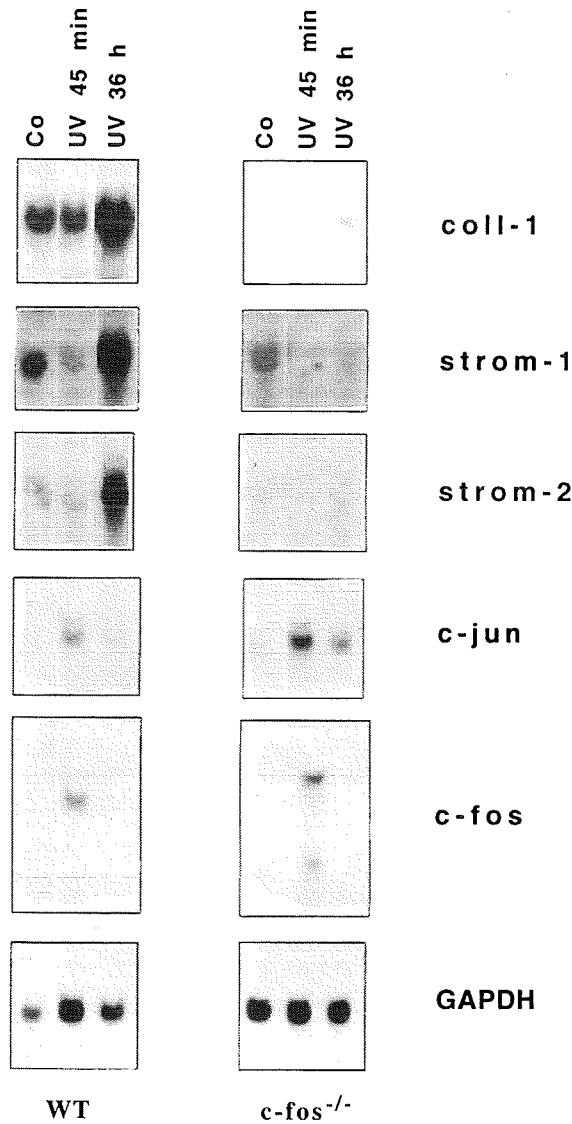
**Abb. 32: UV-induzierte UDS ist nicht verändert in *c-fos* *-/-* Zellen.** Bei insgesamt je 300 nicht-S-Phase Kernen (vgl. Abb. 30 und 31) von UV-bestrahlten (40 J/m<sup>2</sup> UVC) Wildtyp (+/+, **A**) und *c-fos* *-/-* Zellen (-/-, **B**) wurde der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau mit Hilfe eines automatischen Bildverarbeitungssystems quantitativ bestimmt. Gezeigt sind die Anzahl der Kerne mit den angegebenen mittleren Grauwerten. Dabei repräsentieren niedrige Grauwerte einen starken Einbau an <sup>3</sup>H-Thymidin.



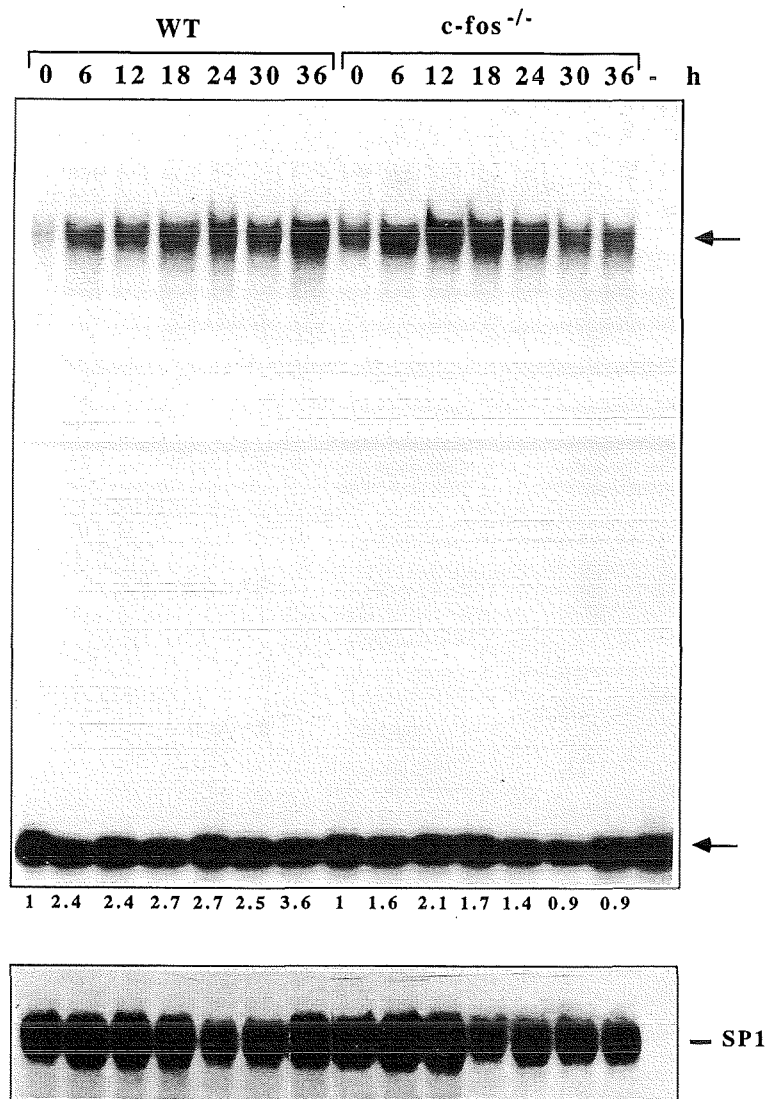
## Die UV-induzierte Expression von AP-1 abhängigen Zielgenen und die DNA-Bindung von AP-1 ist in *c-fos* *-/-* Zellen reduziert

Auf Grund der Funktion von cFos als Transkriptionsfaktor ist es wahrscheinlich, daß die UV-Hypersensitivität von *c-fos* *-/-* Zellen durch eine veränderte Regulation von Genen verursacht wird, deren UV-induzierte Expression durch cFos bzw. AP-1 kontrolliert wird. Exemplarisch für diese Kategorie von Genen wurde die Expression von Kollagenase I, Stromelysin-1 und -2 bestimmt. UV-Bestrahlung führte in Wildtyp Zellen zu einer transkriptionellen Aktivierung der Kollagenase I, Stromelysin-1 und -2, die 36 h nach der Bestrahlung einen maximalen Wert erreicht (Abb. 33; Gack et al., 1994). In *c-fos* *-/-* Zellen ist die basale Kollagenase I Expression reduziert (vgl. Abb. 6) und wird nach UV-Bestrahlung nur marginal induziert (Abb. 33). Ähnlich verhält es sich mit der UV-induzierten Expression von Stromelysin-1 und -2, die in *c-fos* *-/-* Zellen nicht mehr nachweisbar ist. UV-Bestrahlung bewirkt bei beiden Zelltypen innerhalb von 45 Minuten eine maximale Akkumulation *c-jun* und *c-fos* spezifischer mRNA, die nach 36 h auf basale Werte zurückgekehrt ist.

Im Gegensatz zur TPA-Behandlung (vgl. Abb. 6), bei der ausschließlich die Kollagenase I Expression reduziert war, ist in *c-fos* *-/-* Zellen nach UV-Bestrahlung die Expression aller untersuchten "späten" AP-1 abhängigen Zielgene nahezu vollständig gehemmt. Die Ursache dafür könnte auf einer reduzierten DNA-Bindung von AP-1 oder in einer verminderten Transaktivierungsfähigkeit der gebundenen Fos/Jun Proteine beruhen. Um die Bindung von AP-1 an die TRE-Sequenz in Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen zu bestimmen, wurden *in vitro* DNA-Bindungstudien mit Proteinextrakten aus UV-bestrahlten Zellen durchgeführt. Gelretardations-Experimente mit der TRE-Sequenz der interstitiellen Kollagenase der Maus (Abb. 34) oder des Menschen (Abb. 35) ergaben, daß die UV-Bestrahlung von Wildtyp Zellen in einer lang-anhaltenden Verstärkung der DNA-Bindung von AP-1 resultiert. Die Bindung ist 36 h nach der Bestrahlung maximal und weist einen fast 4-fach höheren Wert als die unbestrahlte Kontrolle auf. Dagegen ist in *c-fos* *-/-* die DNA-Bindung von AP-1 verringert und ist im Verlauf von 36 h nach der UV-Bestrahlung bereits auf basale Werte gesunken. Als interne Qualitätskontrolle der eingesetzten Proteinextrakte diente die Protein-Bindung von SP-1 an seine Konsensussequenz (Abb. 34).

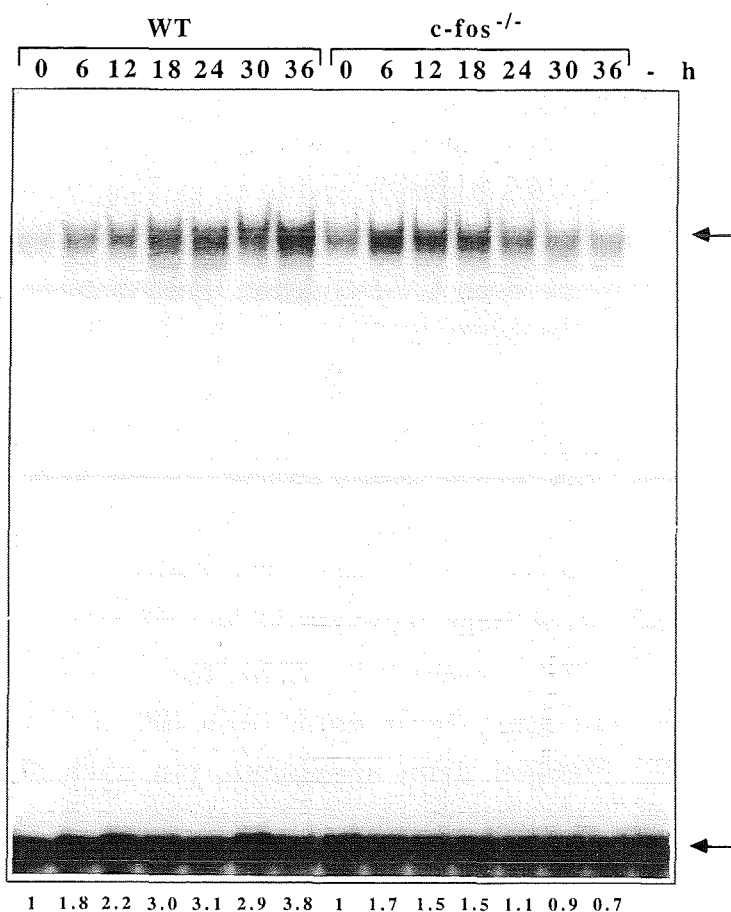


**Abb. 33: UV-induzierte Expression von AP-1 abhängigen Zielgenen ist gehemmt in *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen.** Wildtyp (WT) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit UVC (40 J/m<sup>2</sup>; UV) bestrahlt oder nicht bestrahlt (Co). Aus den Zellen wurde zu den angegebenen Zeiten (45 min und 36 h nach der Bestrahlung) Gesamt-RNA isoliert, jeweils 20 µg RNA in einem 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an Kollagenase I (*coll-1*), Stromelysin-1 (*strom-1*), Stromelysin-2 (*strom-2*), *c-jun*, *c-fos* und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.



**Abb. 34: UV-induzierte Bindungsaktivität von AP-1 an das TRE der interstitiellen Kollagenase der Maus.** Gesamt-Proteinextrakt wurde aus unbestrahlten (0) und UVC-bestrahlten ( $40 \text{ J/m}^2$ ) Wildtyp (WT) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung präpariert. Je  $3 \mu\text{g}$  Proteinextrakt wurden mit  $25 \text{ fmol}$  radioaktiv markiertem mCol AP-1 Oligonukleotid (vgl. Abb. 13) gemischt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionen auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. (-), ohne Proteinextrakt. Der obere Pfeil kennzeichnet die Position der AP-1/DNA-Komplexe, der untere Pfeil freie Oligonukleotide. Mit einem PhosphoImager-System wurde die Menge an AP-1/DNA-Komplexen bestimmt (unabhängig für jede Zelllinie). Die berechneten Induktionsfaktoren sind unterhalb der Abb. angegeben. Zur Qualitätskontrolle der verwendeten Proteinextrakte wurde parallel eine Gelretardations-Analyse mit einer SP-1 Oligonukleotid-Probe durchgeführt.





**Abb. 35: UV-induzierte Bindungsaktivität von AP-1 an das TRE der interstitiellen Kollagenase des Menschen.** Die Gelretardations-Analyse wurde unter Verwendung der radioaktiv markierten huCol AP-1 entsprechend Abb. 34 durchgeführt.

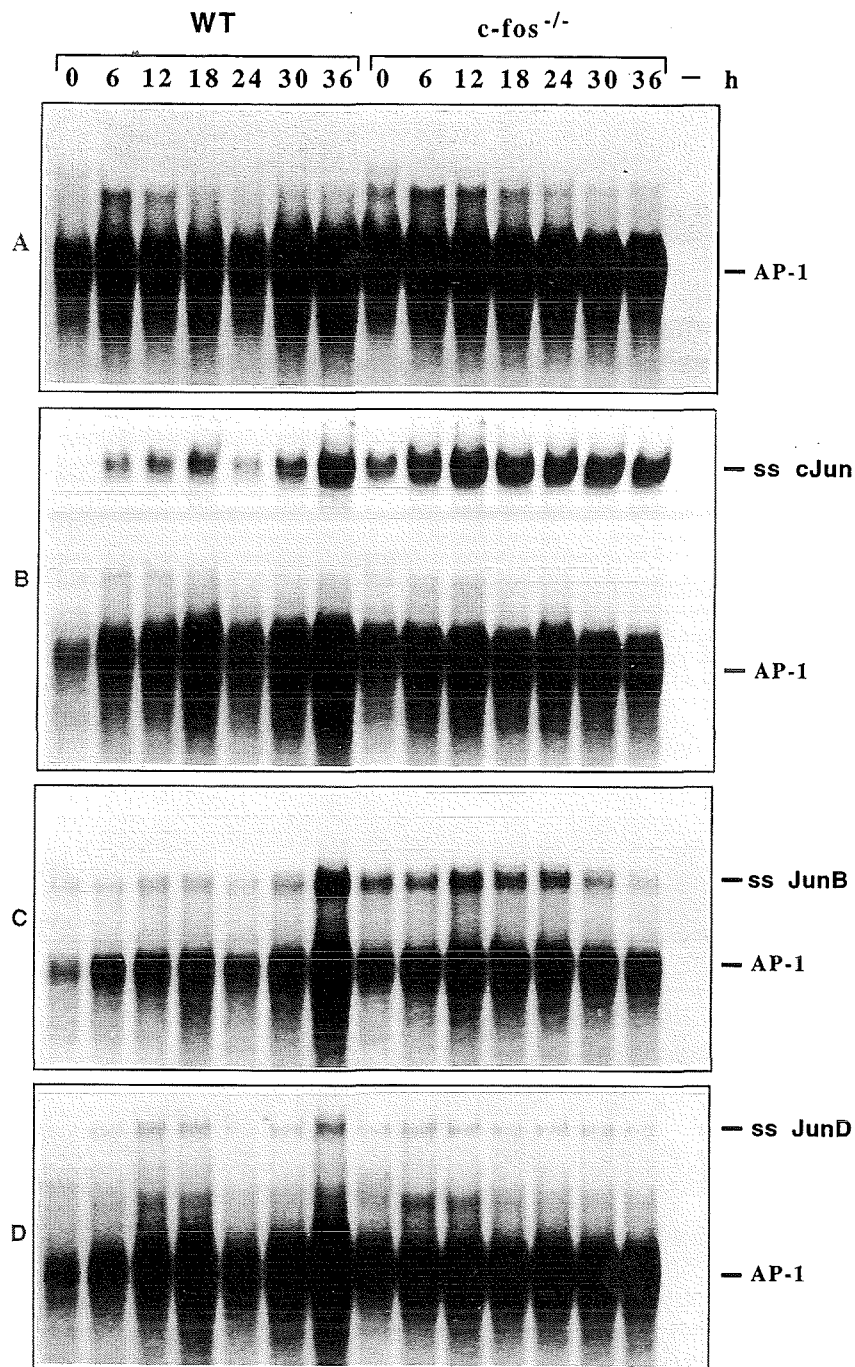
Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß in *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen UV-Strahlung keine langanhaltende Verstärkung der AP-1 DNA-Bindung verursacht und damit die transkriptionelle Aktivierung von AP-1 abhängigen Zielgenen ausbleibt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß zu späten Zeitpunkten nach der UV-Induktion der autokrine Mechanismus (EPIF) die AP-1 Aktivität erhöht und dadurch die Expression von Zielgenen stimuliert. Die fehlende EPIF-Aktivität in *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen (vgl. Abb. 27) wäre eine Erklärung für die nur marginale Induktion von Kollagenase I, Stromelysin-1 und Stromelysin-2 in diesen Zellen.

Welche AP-1 Komponenten sind für die verstärkte DNA-Bindung in UV-bestrahlten Wildtyp Zellen und damit für die verstärkte Expression von Kollagenase I, Stromelysin-1 und -2 verantwortlich? Um diese Frage zu beantworten, wurden Gelretardations-Experimente mit der mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe durchgeführt, die eine Vorinkubation der Proteinextrakte mit spezifischen Antiseren ( $\alpha$ -cJun,  $\alpha$ -Jun-B,  $\alpha$ -Jun-D,  $\alpha$ -cFos,  $\alpha$ -Fra-1 und  $\alpha$ -Fra-2) einschloß. Die resultierenden "Supershifts" (Abb. 36 und 37) belegen, daß in beiden Zelltypen alle AP-1 Proteine nach UV-Induktion, mit Ausnahme von FosB, das nicht an die mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe binden kann (vgl. Abb. 18), an der Komplexbildung beteiligt sind. In beiden Zelltypen konnten keine Fra-1-spezifischen "Supershifts" nachgewiesen werden (Abb. 37C). Im Vergleich zum Prä-Immunsereum (Abb. 37A) wurde jedoch eine reduzierte Menge an AP-1/DNA-Komplexen beobachtet. Dies deutet darauf hin, daß das verwendete Antiserum gegen Fra-1 die DNA-Bindung von Dimeren mit Fra-1 verhindert.

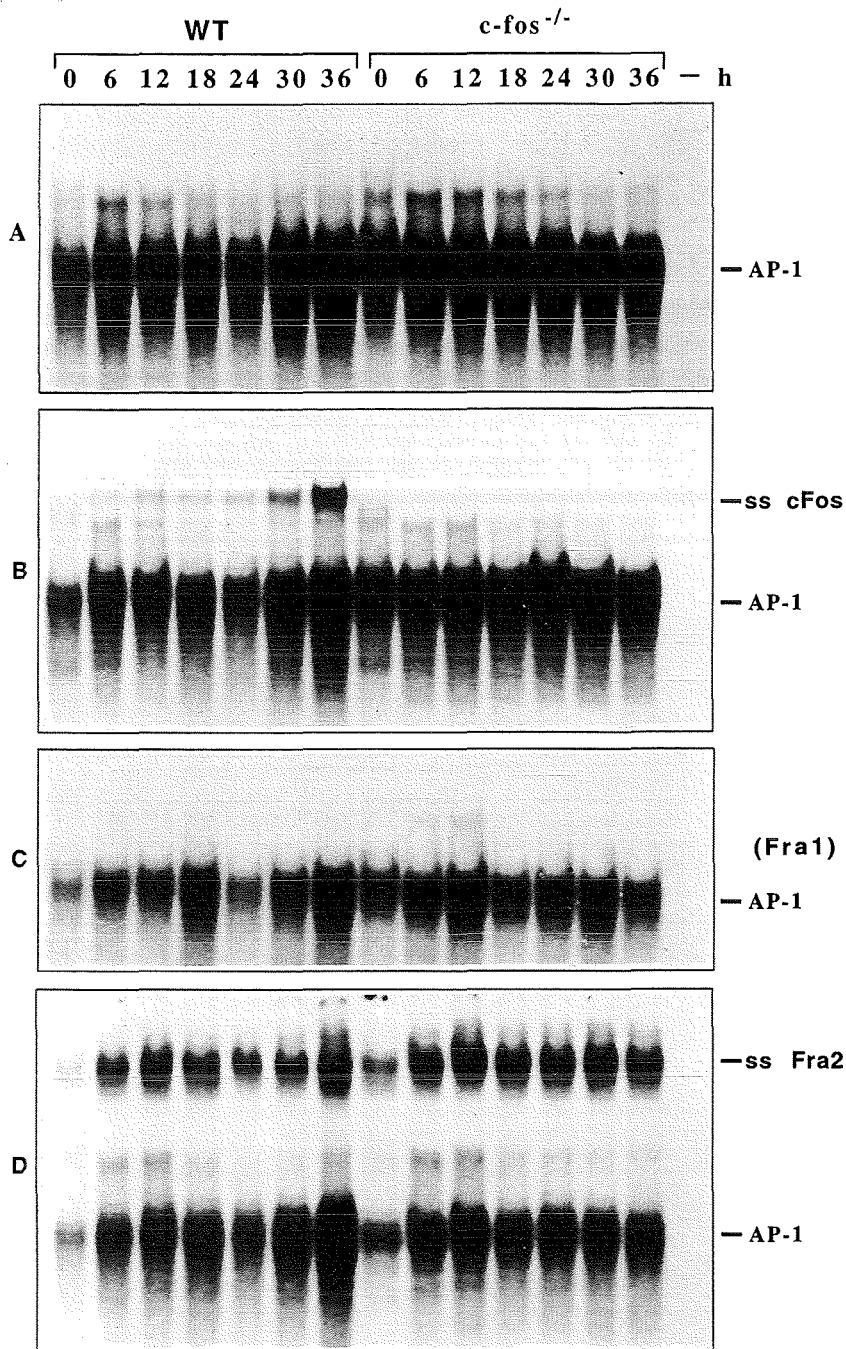
In Wildtyp Zellen wurde eine biphasische Kinetik der DNA-Bindung von verschiedenen AP-1 Komplexen festgestellt. 12 bis 18 h nach der UV-Bestrahlung sind verstärkt Dimere mit cJun, JunB, JunD (Abb. 36B, C, D) und Fra-2 (Abb. 37D) induziert, deren Mengen dann abnehmen, um nach 36 h ein weiteres Maximum zu erreichen. Außerdem werden zu diesem Zeitpunkt maximale Mengen an cFos/X Dimeren (Abb. 37B) festgestellt.

In *c-fos*  $-/-$  Zellen werden Dimere mit cJun, JunB (Abb. 36B, C) und Fra-2 (Abb. 37D) durch UV-Strahlung induziert, wobei im Verlauf von 36 h die Menge an cJun/X und Fra-2/X Komplexen unverändert ist und der Anteil von JunB/X Dimeren nach 36 h ein Minimum erreicht. Komplexe mit JunD werden in *c-fos*  $-/-$  Zellen nur marginal induziert.

Es treten also vor allem 36 h nach der UV-Bestrahlung quantitative Unterschiede auf. In Wildtyp Zellen finden sich zu diesem Zeitpunkt verstärkt Komplexe mit JunB und JunD, die in *c-fos*  $-/-$  Zellen fehlen. Zusammen mit cFos, das in *c-fos*  $-/-$  Zellen fehlt, aber in Wildtyp Zellen 36 h nach der UV-Bestrahlung in maximaler Menge im Komplex vorliegt, könnte dies die Ursache für die verringerte DNA-Bindung von AP-1 in cFos defizienten Zellen sein.



**Abb. 36: Jun Proteine sind an der UV-induzierten Bindungsaktivität von AP-1 beteiligt.** Gesamt-Proteinextrakt wurde aus unbestrahlten (0) und UVC-bestrahlten ( $40 \text{ J/m}^2$ ) Wildtyp (WT) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung präpariert. Je  $3 \mu\text{g}$  Proteinextrakt wurden mit Prä-Immunsereum (A) bzw. Antiseren gegen cJun (B), JunB (C) oder JunD (D) für 2 h auf Eis inkubiert und nachfolgend eine Gelretardations-Analyse mit der mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe durchgeführt. Die Positionen der gebildeten AP-1/DNA-Komplexe (AP-1) und der "Supershifts" (ss cJun, ss JunB, ss JunD) sind gekennzeichnet.

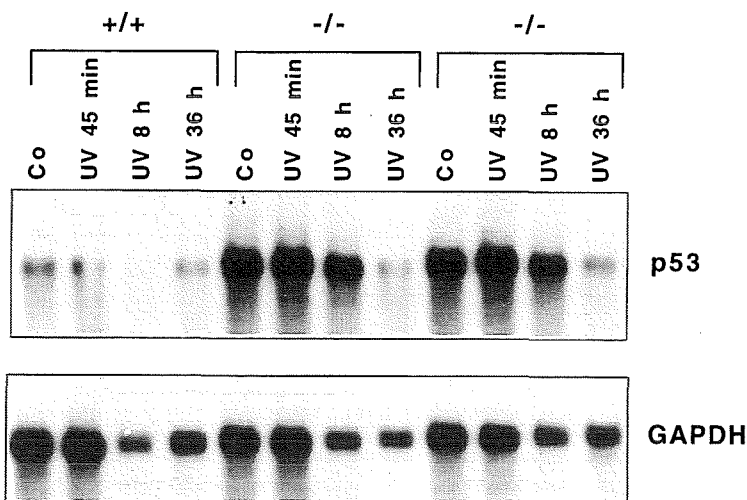


**Abb. 37: Fos Proteine sind an der UV-induzierten Bindungsaktivität von AP-1 beteiligt.** Gesamt-Proteinextrakt wurde aus unbestrahlten (0) und UVC-bestrahlten ( $40 \text{ J/m}^2$ ) Wildtyp (WT) und *c-fos*<sup>-/-</sup> Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung präpariert. Je  $3 \mu\text{g}$  Proteinextrakt wurden mit Prä-Immunsereum (A) bzw. Antiseren gegen cFos (B), Fra-1 (C) oder Fra-2 (D) für 2 h auf Eis inkubiert und nachfolgend eine Gelretardations-Analyse mit der mCol AP-1 Oligonukleotid-Probe durchgeführt. Die Positionen der gebildeten AP-1/DNA-Komplexe (AP-1) und der Supershifts (ss cFos, ss Fra-2) sind gekennzeichnet.

## *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen weisen eine erhöhte basale p53 Expression und eine verringerte UV-induzierte Stabilisierung von p53 auf

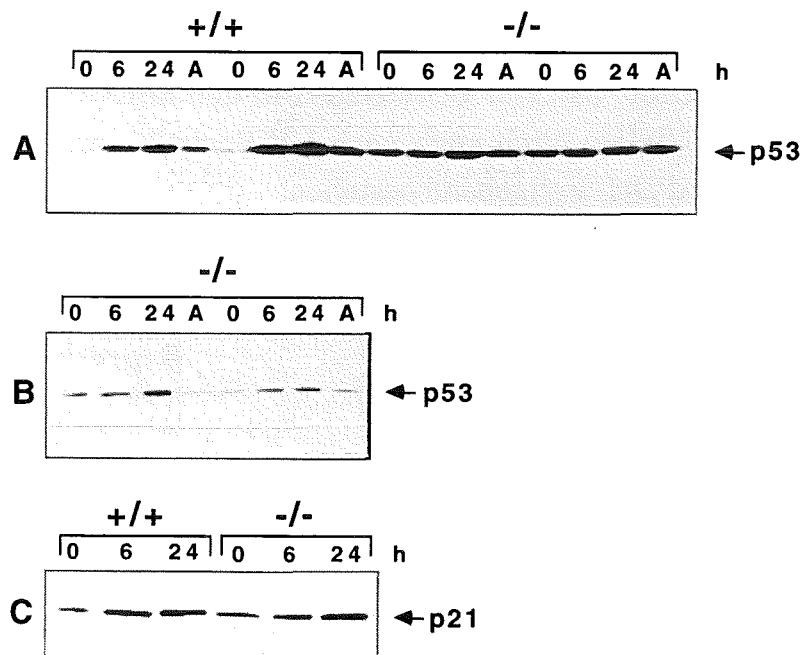
Eine Vielzahl von DNA-schädigenden Agenzien wie UV-Strahlung, Röntgenstrahlung oder Actinomycin D induzieren mittels post-tranlationaler Modifikationen eine Stabilisierung von p53 und bewirken dadurch einen Anstieg der zellulären p53 Proteinkonzentration (Maltzman und Czyzyk, 1984; Kastan et al., 1991; Fritsche et al., 1993). Abhängig vom Zelltyp oder vom physiologischen Zustand können die erhöhten Mengen an p53 einen Zellzyklus-Block in der G1-Phase oder Apoptose vermitteln (als Übersichtsartikel: White, 1996). Da die UV-Hypersensitivität von *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen sehr wahrscheinlich durch verstärkte Apoptose verursacht wird (Schreiber et al., 1995), war es naheliegend zu untersuchen, ob das Fehlen von *c-fos* Auswirkungen auf die Expression und Funktion von p53 hat.

In Northern Blot Analysen konnte nachgewiesen werden, daß in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, die basale Expression p53-spezifischer mRNA eindeutig erhöht ist (Abb. 38). Der Unterschied in den mRNA-Mengen zwischen Wildtyp und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen blieb auch nach UV-Bestrahlung (bezogen auf den internen Standard GAPDH) weitgehend bestehen.

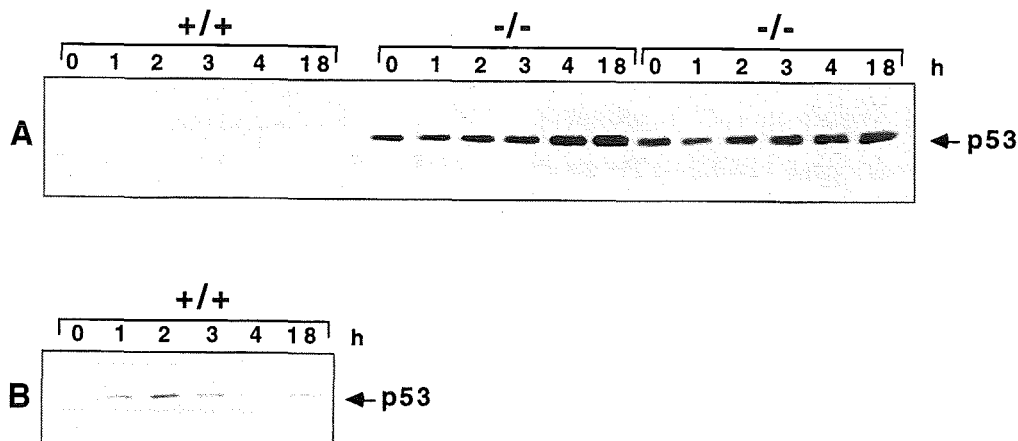


**Abb. 38: Basale p53 Expression ist erhöht in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen.** Wildtyp (+/+) und *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen (-/-; f1, f10) wurden mit UVC (40 J/m<sup>2</sup>; UV) bestrahlt oder nicht bestrahlt (Co). Aus den Zellen wurde zu den angegebenen Zeiten (45 min, 8 h, 36 h nach der Bestrahlung) Gesamt-RNA isoliert, jeweils 20 µg RNA in einem 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Menge an p53 und GAPDH spezifischer mRNA wurde durch Northern Blot Analyse bestimmt.

Die Bestimmung der p53 Proteinmenge im Western Blot demonstrierte, daß die erhöhten Transkriptmengen in unbehandelten *c-fos* *-/-* Zellen zu einer starken Akkumulation von p53 Protein führt, während in Wildtyp Zellen nur sehr geringe Mengen an p53 festgestellt wurden (Abb. 39 A). Durch UV-Strahlung wird in Wildtyp Zellen ein starker und langanhaltender Anstieg (24 h) der p53 Proteinmengen induziert (Abb. 39 A). Dagegen wird in *c-fos* *-/-* Zellen nach UV-Bestrahlung nur ein geringer Anstieg der p53 Proteinmengen beobachtet (Abb. 39 A und B). Ein ähnlicher Befund wurde nach  $\gamma$ -Bestrahlung festgestellt, wobei in Wildtyp Zellen nach 2 h eine starke p53-Stabilisierung induziert wurde, die in *c-fos* *-/-* Zellen nach 4 h und 18 h in geringerem Umfang auftrat (Abb. 40 A, B). Nur in Wildtyp Zellen konnte eine p53-Stabilisierung nach Behandlung mit Actinomycin D nachgewiesen werden (Abb. 39 B, C).



**Abb. 39: UV-induzierte Akkumulation von p53 und p21.** Wildtyp (+/+; WT56, f20) und *c-fos* *-/-* Zelllinien (-/-; f1, f10) wurden entweder nicht behandelt (0) oder UVC-bestrahlt ( $40 \text{ J/m}^2$ ) bzw. für 4 h mit Actinomycin D (A,  $5 \mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Aus den Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach der UV-Bestrahlung (6 h, 24 h) bzw. Actinomycin D Behandlung Kernextrakte präpariert.  $50 \mu\text{g}$  (A, C) oder  $20 \mu\text{g}$  (B) Kernextrakt wurde in einem 12.5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot). Der Immunnachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen p53 (A, B) bzw. p21 (C) und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern im ECL-System.



**Abb. 40: Akkumulation von p53 nach  $\gamma$ -Bestrahlung.** Wildtyp (+/+) und *c-fos* -/- Zellen (-/-; f1, f10) wurden  $\gamma$ -bestrahlt (20 Gy) bzw. nicht bestrahlt. Zu den angegebenen Zeiten nach der Bestrahlung (1, 2, 3, 4, 18 h) wurden Kernextrakte präpariert, jeweils 40  $\mu$ g in einem 12.5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Immunnachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen p53 (A) und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper im ECL-System. Ein längere Expositionszeit des Membranbereichs mit Wildtyp Kernextrakt ist in (B) gezeigt.

p53 kann in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen (z.B. p21, GADD45; Kastan et al., 1992; El-Deiry et al., 1993) induzieren. Da Unterschiede in der basalen Expression und der UV-induzierten Stabilisierung von p53 zwischen Wildtyp und *c-fos* -/- Zellen auftraten, wurde die p53 abhängige Genexpression in diesen Zellen überprüft. Durch Western Blot Analyse wurde die basale und UV-induzierte Expression des p53-abhängigen Zielgens p21 in Wildtyp und *c-fos* -/- Zellen bestimmt (Abb. 39 C). Dabei konnte in beiden Zelltypen eine vergleichbare Expression von p21 nachgewiesen werden, die nach UV-Bestrahlung nur leicht induziert war.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß ein cFos abhängiger Mechanismus die Aktivität des p53 Promotors reprimiert, was in einer verstärkten p53-Expression in *c-fos* -/- Zellen resultiert. Möglicherweise verhindern jedoch diese hohen p53 Konzentrationen eine ähnlich effiziente p53-Stabilisierung durch UV- und Röntgenstrahlung, wie sie in Wildtyp Zellen beobachtet wurde. Unabhängig davon wird in beiden Zelltypen das p53-abhängige Zielgen p21 sowohl basal als auch nach UV-Bestrahlung mit gleicher Effizienz exprimiert.

## DISKUSSION

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein dimerer Proteinkomplex, dessen einzelne Untereinheiten von den verschiedenen *jun* (*c-jun*, *junB*, *junD*), *fos* (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*) und CREB/ATF (ATF-a, ATF-2) Genfamilien kodiert werden. Diese Proteine bilden Homo- und Heterodimere, die sich in ihrer DNA-Bindungsaffinität, DNA-Sequenzspezifität und Transaktivierungseigenschaft unterscheiden. In Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine, Tumorpromotoren, DNA-schädigende Agenzien) reguliert AP-1 die Expression von Zielgenen (z.B. Kollagenase, Stromelysine). Angesichts der differentiellen transkriptionellen Regulation der *jun*, *fos* und CREB/ATF Gene und der Unterschiede in der Sequenzspezifität und Transaktivierungsfunktion der abgeleiteten Proteine, sowie der großen Anzahl kombinatorischer Möglichkeiten der Zusammensetzung von AP-1 Komplexen können Veränderungen in der Expression eines Zielgens allein keine ausreichenden Informationen liefern, welches spezifische AP-1 Dimer für diese Veränderungen verantwortlich ist.

Ziel dieser Arbeit war deshalb zum einen, definierte zelluläre Systeme zu etablieren, die eine gezielte Überexpression der einzelnen Jun Proteine und einer transdominant negativ wirkenden Jun-Mutante erlauben, um damit deren Funktion bei der Regulation von AP-1 abhängigen Zielgenen zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit konnte damit die postulierte autoregulatorische Aktivierung der *c-jun* Transkription in stabilen Zelllinien bestätigt werden. Zum anderen sollte in *cFos* defizienten Zellen untersucht werden, ob der Verlust von *cFos* Auswirkungen auf die TPA- und UV-induzierte Expression verschiedener Zielgene hat und ob die generelle Antwort der Zelle auf UV-Bestrahlung verändert ist.

Die Analyse der TPA-Induktion von *c-fos* *-/-* Zellen ermöglichte es drei Klassen von *cFos* regulierten Genen zu identifizieren. Dies sind einerseits Gene, deren Expression reduziert (Kollagenase I) oder induziert (92 kD-Typ IV Kollagenase) ist; andererseits Gene (CD44, Stromelysine), die, im Vergleich zu *c-fos* *+/+* Zellen, keine Unterschiede in der Expression aufweisen, da funktionelle Kompensation durch das *FosB* Protein auftritt. Der Verlust von *cFos* resultiert außerdem in einer signifikant reduzierten UV-Induktion von AP-1 abhängigen Zielgenen, die mit der Reduktion der DNA-Bindung und der Transaktivierungskapazität von AP-1 korreliert. Desweiteren weisen *c-fos* *-/-* Zellen eine UV-Hypersensitivität auf, die jedoch nicht auf Defizite bei der DNA-Reparatur, sondern auf verstärktes Zellsterben durch Apoptose zurückgeht und unabhängig von Faktoren ist, die von UV-bestrahlten Zellen sezerniert werden.



## Die Funktion von cJun und cFos in der Regulation von AP-1 abhängigen Zielgenen

Die transkriptionelle Aktivierung des *c-jun* Promotors wird hauptsächlich von zwei *cis*-Elementen, jun1 (TGACATCA) und jun2 (TTACCTCA) vermittelt, die während allen Aktivitätszuständen des Promotors konstitutiv von cJun/ATF-2 Komplexen besetzt sind (van Dam et al., 1990, 1993; Devary et al., 1991; Stein et al., 1992; Herr et al., 1994). Exogene Stimuli, wie z.B. UV-Strahlung, alkylierende Agenzien und TPA, induzieren die Hyperphosphorylierung und Aktivierung von Promotor-assoziierten cJun/ATF-2 Dimeren, was in einer schnellen Erhöhung der Transkriptionsrate von *c-jun* resultiert (van Dam et al., 1995).

In Übereinstimmung mit der postulierten autoregulatorischen Funktion von cJun bei der Aktivierung seines eigenen Promotors (Angel et al., 1988b) konnte in zwei stabilen Zelllinien (MBD  $\Delta$ vJ1 und MBD  $\Delta$ vJ2) demonstriert werden, daß durch die Cadmium induzierte Expression der transdominant negativ wirkenden Jun-Mutante die TPA-induzierte *c-jun* Expression teilweise gehemmt wird. Da in unstimulierten Zellen nur geringe Mengen an Jun, Fos und CREB/ATF Proteinen vorliegen, hätte man bei einer effizienten Überexpression eine vollständige Hemmung der TPA-induzierten *c-jun* Expression erwarten können. Unter den experimentellen Bedingungen konnte jedoch maximal eine 50 %ige Hemmung beobachtet werden, obwohl der verwendete Promotor prinzipiell eine starke Expression der Mutante erlaubt. Warum das verwendete MT IIa-Promotorfragment in den stabilen Zelllinien, im Vergleich zu transienten Transfektionen, weniger effizient durch Cadmium induzierbar war, konnte nicht schlüssig geklärt werden. Sehr wahrscheinlich war die Menge an exprimierter Jun-Mutante nicht ausreichend, um alle, bereits in Kontrollzellen vorliegenden Jun, Fos und CREB/ATF Proteine vollständig zu inaktivieren. Es ist daher auch nicht erstaunlich, daß nach zusätzlicher Neusynthese von Jun und Fos Proteinen (nach TPA-Behandlung) die TPA-induzierte Expression der späten Gene (z.B. Kollagenase) überhaupt nicht gehemmt wurde.

Ein weitaus erfolgreicherer System, um die spezifische Funktion einzelner AP-1 Proteine in der Genregulation zu untersuchen, war die Verwendung von cFos defizienten Zellen. In einer Reihe von früheren Studien wurde endogenes *c-fos* durch verschiedene Techniken inaktiviert: i) *anti-sense* mRNA Expression (Holt et al., 1986; Nishikura und Murray, 1987; Kerr et al., 1988; Schönthal et al., 1988). ii) Mikroinjektion von cFos spezifischen Antikörpern (Riabowol et al., 1988; Kovary und Bravo, 1991b). iii) *c-fos* mRNA Degradation mit Hilfe von Ribozymen (Scanlon

et al., 1991). iv) Überexpression einer auf cFos trans-dominant negativ wirkenden Mutante (Okuno et al., 1991).

Obwohl durch diese Experimente grundlegende Erkenntnisse zur Funktion von cFos während der Proliferation, Differenzierung und Transformation gewonnen wurden, gibt es widersprüchliche Daten, die auf die Methodik der indirekten Inaktivierung von *c-fos* zurückgeführt werden, z.B. Kreuzhybridisierung der antisense RNA mit Transkripten verwandter oder unbekannter Gene und Kreuzreaktion der Antikörper mit immunologisch ähnlichen Proteinen (Hu et al., 1994; Brüsselbach et al., 1995).

Die "gene targeting" Technik ermöglichte es *c-fos* direkt und selektiv auszuschalten (Wang et al., 1992; Johnson et al., 1992). Deshalb bieten *c-fos* +/+ und *c-fos* -/- Zelllinien, die aus Embryonen von Wildtyp und "knock out" Mäusen hergestellt wurden (Brüsselbach et al., 1995), das beste System, um die spezifische Funktion von cFos bei der AP-1 abhängigen Genregulation zu untersuchen.

In *c-fos* -/- Zellen ist, im Vergleich zum Wildtyp, die TPA-induzierte Expression der frühen Gene *c-jun* und *c-fos* sowohl quantitativ, als auch in der Induktionskinetik nicht verändert. Die transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* und *c-fos* durch TPA und UV wird durch Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von cJun/ATF-2 bzw. SRF/TCF Komplexen bewirkt, die konstitutiv an den *c-jun* bzw. *c-fos* Promotor binden (Herrera et al., 1989; König, 1991; van Dam et al., 1993; Zinck et al., 1993; Herr et al., 1994).

In *c-fos* +/+ und *c-fos* -/- Zellen gibt es sowohl im unbehandelten Zustand als auch zu verschiedenen Zeiten nach TPA-Induktion keine Unterschiede in der konstitutiven Bindung von Transkriptionsfaktoren an den *c-jun* Promotor. Diese Daten bestätigen zum einen frühere Beobachtungen, daß nicht cJun/cFos, sondern cJun/ATF-2 Dimere für die Induktion von *c-jun* verantwortlich sind (Herr et al., 1994). Zum anderen implizieren diese Daten, daß die TPA-induzierten Signalkaskaden, die zur Aktivierung von cJun/ATF-2 (und SRF/TCF am *c-fos* Promotor) führen, durch das Fehlen von cFos nicht gestört sind. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich *c-jun* und *c-fos* Expression in *c-fos* -/- Zellen wurden nach Serum, EGF und PDGF Stimulation festgestellt (Hu et al., 1994; Brüsselbach et al., 1995). Für das schnelle Abschalten der *c-fos* Genexpression (innerhalb von 90 Minuten) nach Mitogen- oder TPA-Induktion wurde ein Autorepressions-Mechanismus durch das cFos Protein postuliert (Sassone-Corsi et al., 1988a; Wilson und Treisman, 1988; König et al., 1989; Schönthal et al., 1989). Umgekehrt sollte dieser Mechanismus in *c-fos* -/- Zellen beeinträchtigt sein und TPA-

Behandlung in einer langanhaltenden Expression von *c-fos* resultieren. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine Möglichkeit wäre, daß andere Mitglieder der Fos Familie, die in *c-fos* *-/-* Zellen exprimiert werden, z.B. FosB, Fra-1 oder Fra-2, diese Funktion übernehmen. Diese Möglichkeit ist in Einklang mit dem Ergebnis, daß für die Autorepression eine Carboxy-terminale Domäne von cFos ausreichend ist und diese Domäne beim FosB und Fra-1 Protein konserviert ist (Gius et al., 1990; Mumberg et al., 1991).

AP-1 abhängige Zielgene sind durch die für die Induktion notwendige *de novo* Synthese von Jun und Fos Proteinen definiert. Exemplarisch für diese Klasse von Genen wurde in Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen die Expression verschiedener Matrixmetalloproteinase Gene (Gack et al., 1994) und des CD44 Gens (Hofmann et al., 1993) nach extrazellulären Stimuli vergleichend analysiert. Das in Wildtyp Zellen auftretende Expressionsmuster von Kollagenase I (interstitielle Kollagenase), Stromelysin-1 und -2 nach TPA-Induktion ist konsistent mit den Befunden von transformierten Maus-Lungenfibroblasten (Gack et al., 1994) und stimmt weitgehend mit den Expressionsdaten von Matrixmetalloproteinasen in Mensch und Ratte überein (Angel et al., 1987a; Breathnach et al., 1987). TNF- $\alpha$ , bFGF und IL-1 $\alpha$  steigern ebenso wie TPA die Transkriptionsrate der *jun* und *fos* Gene (Brenner et al., 1989; Ito et al., 1990; Fagarasan et al., 1990; Angel und Karin, 1991). Dadurch kommt es zur Neusynthese von AP-1 Proteinen, die als Dimere an die TRE-Sequenz in der Promotorregion von CD44 und Kollagenase I binden und deren Transkription aktivieren.

CD44, Stromelysin-1 und Stromelysin-2 weisen in *c-fos* *-/-* Zellen nach TPA-Induktion ein dem Wildtyp analoges Expressionsmuster auf. Dagegen ist die Expression der interstitiellen Kollagenase in *c-fos* *-/-* Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, sowohl basal als auch nach Induktion mit TPA, TNF- $\alpha$ , bFGF und IL-1 $\alpha$  eindeutig reduziert. Das Expressionsmuster dieser Gene in *c-fos* *-/-* Zellen demonstriert, daß cFos eine sehr spezifische Funktion bei der transkriptionellen Aktivierung von Kollagenase I einnimmt, daß jedoch bei der Expression von CD44, Stromelysin-1 und -2 funktionelle Redundanz auftritt. Der molekulare Mechanismus, der für diese differentielle Regulation von AP-1 Zielgenen verantwortlich ist, konnte durch *in vivo* und *in vitro* DNA-Bindungstudien aufgeklärt werden. Die *in vivo* Proteinbesetzung am Kollagenase Promotor in *c-fos* *-/-* Zellen unterscheidet sich weder qualitativ noch quantitativ von der in Wildtyp Zellen. Nach TPA-Induktion ist in beiden Zelltypen eine Zunahme der Proteinbindung am TRE feststellbar. Auch an den anderen bekannten Proteinbindungsstellen des Promotors treten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und cFos defizienten Zellen auf. Dies

ist ein Hinweis darauf, daß der Mechanismus der reduzierten Kollagenase-Promotoraktivität in *c-fos* *-/-* Zellen wahrscheinlich nicht von zusätzlichen Sequenzen distal und/oder proximal vom TRE gesteuert wird oder zumindest keine nachweisbare Veränderungen der *in vivo* Proteinbesetzung zur Folge hätte.

Bei transienten Transfektionen mit einem Maus Kollagenase Promotor-konstrukt ohne TRE (-500/-66-tk-CAT) wurde keine TPA-Induzierbarkeit nachgewiesen, während ein Konstrukt (-66/+29), das nur noch das TRE und proximale Sequenzen enthält, durch TPA induziert wurde. Da das Kollagenase I Gen in *c-fos* *-/-* Zellen auf niedrigem Niveau transkriptionell durch TPA induziert wird, sprechen diese Ergebnisse dafür, daß das TRE im Kollagenase I Promotor ursächlich für die reduzierte Expression der Kollagenase I in *c-fos* *-/-* Zellen verantwortlich ist. *In vitro* DNA-Bindungsstudien ergaben, daß die AP-1 Bindungsaktivität am Kollagenase-TRE eine transiente Kinetik aufweist und keine quantitativen Unterschiede in den AP-1-Bindungsaffinitäten zwischen *c-fos* *+/+* und *c-fos* *-/-* Zellen auftreten, was die *in vivo* Situation am TRE widerspiegelt. Die detaillierte Bestimmung der Zusammensetzung von *in vitro* gebundenen AP-1 Komplexen mit Hilfe spezifischer Antikörper machte deutlich, daß in beiden Zelltypen fast ausschließlich Jun/Fos Heterodimere an die TRE-Sequenzen binden. In unbehandelten Zellen konnten Dimere mit cFos und FosB nicht nachgewiesen werden. Es treten basal vor allem transkriptionell inaktive Komplexe mit JunB und Fra-2 auf. Nach TPA-Induktion können *in vitro* alle bekannten Jun und Fos Proteine im Komplex nachgewiesen werden. Generell binden nach TPA-Induktion in beiden Zelltypen bevorzugt JunB/X und Fra-2/X Dimere an die verschiedenen TRE-Sequenzen. In *c-fos* *-/-* Zellen ist der Anteil dieser Dimere noch größer im Vergleich zum Wildtyp. Nach TPA-Stimulation kommt es aber auch zu einer verstärkten Bindung von transaktivierungs-kompetenten Komplexen, die cFos und FosB enthalten.

Dies ist von entscheidender Bedeutung, da bezüglich der FosB/Jun Dimere qualitative Unterschiede in der Bindung an die TRE-Sequenzen auftreten. FosB/X Dimere binden *in vitro* nur an die TRE-Sequenz des CD44 Promotors und an ein Konsensus-TRE, das homolog zu entsprechenden Sequenzen im Stromelysin-1 Promotor ist. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß FosB/Jun Dimere das Fehlen von cFos/Jun Dimeren kompensieren können. Im Gegensatz dazu binden Komplexe mit FosB nicht an die TRE-Sequenz im Kollagenase I Promotor der Maus und sind daher prinzipiell nicht in der Lage cFos/Jun Dimere zu ersetzen. Als direkte Folge der TRE-Sequenz-spezifischen Bindung von FosB/Jun Komplexen ist es nicht möglich durch Überexpression von FosB ein Maus Kollagenase Promotor-konstrukt (-66/+29 mCol-CAT) zu transaktivieren. Im Unterschied dazu, kann

FosB Promotorkonstrukte mit Konsensus-TRE (-73/+63 huCol-CAT, 3xTRE-CAT) gleich effektiv wie cFos aktivieren. Die fehlende Transaktivierung des Maus Kollagenase I Promotors durch FosB ist daher eine überzeugende Erklärung für die stark reduzierte Kollagenase I Expression in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen.

Was ist der molekulare Mechanismus für die Unterschiede in der Bindung von FosB an die Kollagenase I oder Stromelysin-1 TRE-Motive, obwohl beide Bindungsstellen die Konsensus-Sequenz aufweisen?

Die AP-1 Bindestelle des Maus Kollagenase I Gens besitzt in seinen flankierenden Sequenzen vier zusätzliche Nukleotide, die zusammen mit der Konsensus-Sequenz ein perfektes Palindrom ergeben. Bei *in vitro* DNA-Bindungs- und Kompetitionsstudien mit einem Konsensus-TRE erwies sich dieses perfekte Palindrom als eine hochaffine Jun/Fos-Bindestelle (Schorpp et al., 1995). Es ist plausibel anzunehmen, daß die erweiterte palindromische TRE-Sequenz der Maus Kollagenase I auch mit einer hohen Spezifität der bindenden Komplexe gekoppelt ist und es sterisch bedingt zu einem selektiven Ausschluß der Bindung von FosB/Jun-Komplexen kommt. Diese Annahme wird durch Studien gestützt, die bestätigen, daß benachbarte Sequenzen eine wichtige Funktion für die Bindung von AP-1 haben. Zum Beispiel rufen flankierende Sequenzen des TREs, die sich in nur einer Base unterscheiden, signifikante Veränderungen in der Bindungsaffinität von verschiedenen AP-1 Spezies hervor (Ryseck und Bravo, 1991). Weiterhin wurde gezeigt, daß an die AP-1 Bindestelle des Interleukin 2 und des Involucrin Promotors nur bestimmte Jun/Fos Dimere binden (Boise et al., 1993; Welter et al., 1995).

Da vor allem Dimere, die Fra-2 und Fra-1 enthalten, an das Kollagenase-TRE binden, stellt sich die Frage, warum Fra-1 und Fra-2 nicht in der Lage sind die Funktion von cFos bei der transkriptionellen Regulation des Kollagenase I Gens in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen zu übernehmen. Die entscheidende Ursache hierfür liegt in den Transaktivierungseigenschaften dieser Proteine. Zahlreiche Untersuchungen belegen, daß sowohl Fra-1 als auch Fra-2, im Gegensatz zu cFos und FosB schwache Transaktivatoren sind und auch geringe transformierende Eigenschaften besitzen (Nakabeppu et al., 1991; Mumberg et al., 1991; Suzuki et al., 1991; Wisdom und Verma, 1993; Bergers et al., 1995).

Die hier vorgestellten Daten und die in der Literatur beschriebenen Befunde machen deutlich, daß die reduzierte transkriptionelle Aktivierung (basal und nach TPA, TNF- $\alpha$ , bFGF, Il-1 $\alpha$ ) der interstitiellen Kollagenase der Maus in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen in der erweiterten palindromischen AP-1 Bindungsstelle begründet ist. FosB/Jun-Dimere, können nicht an diese Sequenz binden und den Ausfall von cFos/Jun-Dimeren kompensieren. Die noch nachweisbare Kollagenase I Expression in *c-fos*

-/- Zellen geht höchstwahrscheinlich auf die Aktivierung durch den Jun-Partner in Fra-2/Jun und Fra-1/Jun Komplexen zurück. Die AP-1 Bindungsstellen im CD44 und Stromelysin-1 Promotor erlauben die Bindung von FosB/Jun-Dimeren. Auf Grund des Transaktivierungspotentials von FosB ist somit in *c-fos* -/- Zellen eine vollständige funktionelle Kompensation von cFos/Jun Komplexen möglich. Die regulatorischen Sequenzen des Stromelysin-2 Promotors der Maus sind bisher nicht identifiziert worden. Ein TRE-Sequenzmotiv konnte jedoch im Promotor des Stromelysin-2 Gens der Ratte gefunden werden (Breathnach et al., 1987). Deshalb ist es wahrscheinlich, daß auch der Maus Promotor eine AP-1-Bindungsstelle aufweist. Da die TPA-induzierte Expression von Stromelysin 2 in *c-fos* -/- Zellen im gleichen Ausmaß wie im Wildtyp erfolgt, sollten auch an diese Bindungsstelle Dimere, die FosB enthalten, binden können.

In Wildtyp und cFos defizienten Zellen konnte die TPA-induzierte Expression von Kollagenase I und Stromelysin-1 durch Dexamethason gehemmt werden, während die CD44 Expression nahezu unbeeinflusst blieb. Die Repression von Kollagenase I und Stromelysin-1 durch Dexamethason in Mauszellen ist konsistent mit den Daten aus anderen Zellsystemen (Frisch und Ruley, 1987; Offringa et al., 1988; Jonat et al., 1990). Der Mechanismus der Repression beruht wahrscheinlich auf einer Modulation der Transaktivierungseigenschaften von AP-1 Komplexen durch den aktivierten Glucocorticoidrezeptor ohne deren DNA-Bindung zu verändern (König et al., 1992). Dabei entscheidet jedoch die Zusammensetzung der Dimere, ob es zu einer Hemmung (cJun/cFos) oder Verstärkung (cJun/cJun, cJun/Fra-1) der Promotoraktivität (z.B. beim Proliferin oder Kollagenase Promotor) kommt (Diamond et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995).

Da die Maus Kollagenase I Expression unabhängig von FosB/Jun Dimeren erfolgt, demonstriert die beobachtete Hemmung der Expression durch Dexamethason in *c-fos* -/- Zellen, daß AP-1 Komplexe mit Fra-1 oder Fra-2 in der Lage sind, eine Repression durch den aktivierten Glucocorticoidrezeptor zu vermitteln. Eine aktivierende Wirkung von Dexamethason, die für cJun/Fra-1 Dimere am Proliferin Promotor beschrieben wurde, scheint am Kollagenase Promotor nicht aufzutreten. Möglicherweise sind die überlappenden TRE- und GRE-Sequenzen im Proliferin Promotor dafür verantwortlich, während im Kollagenase Promotor ein einzelnes TRE-Motiv vorliegt.

Die Expression der 72-kD TypIV Kollagenase IV (Gelatinase A) wird sowohl in Wildtyp als auch in *c-fos* -/- Zellen nur marginal durch TPA induziert. Die geringe TPA-Antwort in Mauszellen ist in Übereinstimmung mit der marginalen TPA-

Induktion des Gens in menschlichen Zellen und in transformierten Maus-Lungenfibroblasten (Huhtala et al., 1991; Gack et al., 1994). Für die menschliche Kollagenase IV (72 kD) konnte die ausbleibende TPA-Antwort mit dem Fehlen einer AP-1 Bindestelle im Promotor des Gens korreliert werden (Huhtala et al., 1991). Auf Grund des hohen Homologiegrades (96 %) zwischen der menschlichen und der murinen Kollagenase IV (72 kD) Sequenz könnte die geringe TPA-Antwort in Mauszellen ebenfalls auf dem Fehlen eines TREs in der Promotorregion beruhen (Reponen et al., 1992).

Eine andere Arbeitsgruppe, die unabhängig von Brüsselbach et al. (1995) immortalisierte *c-fos* *-/-* Zellen etablierte, machte die Beobachtung, daß in diesen Zellen die Expression sowohl von Kollagenase I als auch von Stromelysin-1 durch PDGF und EGF nicht induzierbar ist und nach TPA-Induktion beide Gene nur schwach exprimiert werden (Hu et al., 1994). Außerdem wurde nachgewiesen, daß keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen bei der Expression von Metallothionein I und II nach Cadmium-Induktion auftreten. Die Expressionsdaten der Kollagenase I stimmen daher mit den hier vorgestellten Ergebnissen überein, während die Befunde bezüglich Stromelysin-1 widersprüchlich sind. Die Autoren argumentieren, daß es cFos abhängige (Kollagenase I, Stromelysin-1) und unabhängige Wege (Metallothionein I und II) der transkriptionellen Aktivierung von AP-1 Zielgenen gibt, wobei cFos jedoch nicht im Kontext von AP-1 entscheidend ist, sondern eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit einem hypothetischen Kofaktor und der basalen Transkriptionsmaschinerie spielt. Dabei soll cFos speziell beim Kollagenase I und Stromelysin-1 Promotor effizienter als andere AP-1 Faktoren mit dem Koaktivator interagieren. Diese Hypothese beruht vor allem darauf, daß die Gesamt-AP-1 Bindungsaktivität in *c-fos* *-/-* Zellen keinen quantitativen Unterschied zum Wildtyp aufweist (Hu et al., 1994).

Die in dieser Arbeit verwendeten MT IIa-Promotorkonstrukte (320- $\Delta$ MT, 212- $\Delta$ MT; Abb.1) belegen eindeutig, daß deren Induktion durch Cadmium unabhängig von AP-1 ist. Da einerseits die Expression von MT I und MT II durch Cadmium, andererseits die Expression von Stromelysin-1 und Kollagenase I durch Wachstumsfaktoren oder TPA induziert wurde, ist die Hypothese von Hu et al. (1994) nicht schlüssig. Außerdem konnte ich durch transiente Transfektionen nachweisen, daß die Überexpression von cFos und FosB ein Promotorkonstrukt (-73/+63 huCol-CAT), das dem Stromelysin-1 Promotor entspricht, gleich effizient aktiviert, was nach dem postulierten Mechanismus von Hu et al. (1994) nicht möglich sein sollte. Darüberhinaus wird dieses Konstrukt bei transienten Transfektionen in Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen im gleichen Ausmaß aktiviert

(Brüsselbach et al., 1995). Vielmehr könnten die Unterschiede zwischen den beiden *c-fos* *-/-* Zelllinien auf Unterschiede in der basalen Expression bzw. der Induktion von *fosB* beruhen. Eine, im Vergleich zu den hier verwendeten Zellen, reduzierte Expression von *fosB* könnte für ein Ausbleiben der kompensatorischen Wirkung bei der Expression von Stromelysin-1 verantwortlich sein. Für diese These spricht die von Hu et al. (1994) beschriebene Reduktion (ca. 20 %) der *fosB* mRNA-Menge in *c-fos* *-/-* Zellen (im Vergleich zum Wildtyp) nach Induktion mit TPA, PDGF und EGF.

Die durch meine Daten postulierte fehlende funktionelle Redundanz zwischen cFos und FosB, in Bezug auf die Induktion der Kollagenase I, wird durch Befunde aus *c-fos* *-/-* Mäusen belegt. Zum einen zeigten *in situ* Hybridisierungen im Knochengewebe von *c-fos* *-/-* Mäusen eine gut erkennbare Verminderung der Kollagenase I Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp (Gack, 1994). Zum anderen konnte bei Northern Blot Analysen mit RNA aus Maus-Embryonen (Tag 16.5 und 18.5 der Embryogenese) ebenfalls eine reduzierte Kollagenase I Expression in *c-fos* *-/-* Embryonen festgestellt werden (Dr. P. Angel, persönliche Mitteilung). Es scheint also, daß auch im Gesamtorganismus kein Mechanismus (FosB unabhängig) auftritt, der den Ausfall von cFos in Bezug auf die Kollagenase-Expression vollständig kompensieren kann. Dies unterstreicht die spezifische Funktion von cFos bei der Regulation des Kollagenase I Gens *in vivo*. Entsprechend dem Expressionsmuster von CD44 in *c-fos* *-/-* Zellen konnte in *c-fos* *-/-* Mäusen (Tag 18.5 der Embryogenese) kein Effekt auf die Expression von CD44 festgestellt werden, was die funktionelle Kompensation von cFos durch FosB bei der Regulation dieses Gens *in vivo* bestätigt (Dr. P. Angel, persönliche Mitteilung).

In transgenen Mäusen, die *c-fos* überexprimieren, ist die Kollagenase Expression im Knochen stark erhöht (Gack et al., 1994). Die Lokalisation der erhöhten bzw. der reduzierten Kollagenase Expression korreliert mit den phänotypischen Veränderungen der *c-fos* überexprimierenden (Knochentumore) bzw. der *c-fos* *-/-* Mäuse (Osteopetrose). Das primäre Gewebe der veränderten Kollagenase Expression ist bei beiden Phänotypen der Knochen. Deshalb könnte Kollagenase als gewebespezifisches Markergen für die biologische Aktivität von cFos *in vivo* dienen.

Da *fosB* *-/-* Mäuse keine phänotypischen Veränderungen aufweisen (M. Schreiber, persönliche Mitteilung) muß man annehmen, daß der Ausfall von FosB vollständig durch cFos bzw. Fra-1 und Fra-2 ersetzt werden kann. Es wäre nun interessant in *fosB* *-/-* Zellen die Expression AP-1 abhängiger Zielgene zu untersuchen. Zu erwarten wäre, daß weder Kollagenase I noch CD44, Stromelysin-1



oder Stromelysin-2 in ihrer Expression beeinflußt sind. Außerdem könnten *c-fos* *-/-* *fosB* *-/-* Doppel-"knock out"-Mäuse darüber Aufschluß geben, ob der Ausfall der funktionellen Redundanz durch FosB (z.B. bei der Expression von CD44 und Stromelysinen) in zusätzlichen phänotypischen Veränderungen resultiert.

Neben der Funktion von cFos die Expression von Zielgenen zu induzieren, kann cFos die transkriptionelle Aktivierung von Genen reprimieren. Beispiele dafür sind die Repression der induzierten *c-fos* Transkription (Autorepression; Sassone-Corsi et al., 1988; Wilson und Treisman, 1988; König et al., 1989; Schönthal et al., 1989), die Hemmung der Transaktivierungsfunktion von Myogenin und MyoD durch direkte Protein/Protein-Interaktion (Li et al., 1992) und die TGF- $\beta$  induzierte Repression durch einen cFos abhängigen Mechanismus, der über das TIE-Sequenzmotiv ( TGF- $\beta$  Inhibitory Element) von Zielgenen vermittelt wird (Kerr et al., 1990).

Es besteht daher die Möglichkeit, daß cFos-abhängige Mechanismen, die die transkriptionelle Aktivierung von Genen hemmen, in *c-fos* defizienten Zellen aufgehoben sind. Interessanterweise konnte ich eine stark erhöhte basale und TPA-induzierte Expression der 92-kD Typ IV Kollagenase (Gelatinase B) in *c-fos* *-/-* Zellen nachweisen. Dieser Befund konnte mit Hilfe von Zymogramm-Analysen auf Proteinebene bestätigt werden, wobei in Kulturüberständen von *c-fos* *-/-* Zellen eine verstärkte Gelatinase B Aktivität gefunden wurde (Dr. C. Mauch, persönliche Mitteilung). Durch transiente Überexpression von exogenem cFos (pMV-cFos) konnte die basal vorhandene mRNA-Menge in *c-fos* *-/-* Zellen partiell reduziert werden. Der erreichte Wert lag noch deutlich über der Transkriptmenge, die in Wildtyp Zellen (mit pMV-0 infiziert) bestimmt wurde. Es war aber auch in *c-fos* *+/+* Zellen möglich, die basale Expression von 92 kD-Typ IV Kollagenase durch exogenes cFos zu vermindern. Diese Ergebnisse implizieren, daß die transkriptionelle Aktivierung der Gelatinase B durch cFos reprimiert wird und infolge dessen in *c-fos* *-/-* Zellen eine verstärkte Expression auftritt.

Die Promotorregion des menschlichen und des murinen Gelatinase B Gens sind stark homolog. In beiden Promotoren wurden zwei Konsensus AP-1 Bindungsstellen sowie *cis*-Elemente für NF $\kappa$ B, PEA3 und SP-1 identifiziert (Huhtala et al., 1991; Sato und Seiki, 1993; Masure et al., 1993). Die distale TRE-Sequenz im menschlichen Promotor ist essentiell für die TPA-Induktion von Gelatinase B (Sato und Seiki, 1993). Entsprechende Studien für den Maus Promotor sind bisher nicht veröffentlicht. Auf Grund der Homologie zwischen Mensch und Maus Promotor ist es aber sehr wahrscheinlich, daß durch das entsprechende Element die TPA-Induktion der Gelatinase B im Maussystem

vermittelt wird und daher das beobachtete Expressionsmuster dieses Gens in Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen nach TPA-Behandlung erklärbar ist.

Welcher Mechanismus ist für die gesteigerte Expression von Gelatinase B in *c-fos* *-/-* Zellen verantwortlich? Eine Möglichkeit wäre, daß sich durch das Fehlen von *c-fos* bevorzugt solche AP-1 Dimere formieren, die im Kontext dieses Promotors eine starke Transaktivierungsfunktion einnehmen. Ein Hinweis dafür sind transiente Transfektionen mit Promotor-CAT Konstrukten (Promotorsequenzen des menschlichen Gens) und Überexpression von cJun, JunB oder cFos, die zeigten, daß der Promotor durch cFos nur marginal transaktiviert wird, während cJun und JunB starke Transaktivatoren sind (Sato et al. 1993). Andererseits wäre denkbar, daß ein Repressor, dessen Expression oder Aktivität von cFos abhängig ist, an der Regulation der Gelatinase B Expression beteiligt ist. Eine eindeutige Aufklärung, welcher Mechanismus vorliegt, könnten *in vivo footprint* Analysen der Proteinbesetzung am Promotor, transiente Transfektionen mit Promotor-Deletionsmutanten und Charakterisierung der AP-1 Komplexe, die an die Gelatinase B TRE-Sequenzen binden, ergeben.

### **Die Rolle von cFos bei der UV-Antwort und der UV-induzierten Expression AP-1 abhängiger Zielgene**

UV-Strahlung induziert in Säugetierzellen ein komplexes genetisches Programm, das zusammenfassend als UV-Antwort bezeichnet wird (Karin und Herrlich, 1989). Die biologische Funktion der UV-Antwort ist aber noch weitgehend ungeklärt. Die UV-induzierte genetische Antwort der Zelle beinhaltet unter anderem die Expression von *c-fos* und *c-jun* sowie AP-1 abhängigen Zielgenen, darunter Kollagenase I, Metallothionein IIa, Stromelysin-1 und -2 (Angel et al., 1986; Büscher et al., 1988; Devary et al., 1991; Herrlich et al., 1992). cFos defiziente Zellen sind daher ein ideales System, um die biologischen Konsequenzen aus dem Verlust einer einzelnen Komponente der UV-Antwort auf zellulärer Ebene zu untersuchen, bzw. die Funktion von cFos bei der UV-induzierten Expression von AP-1 Zielgenen zu studieren.

Die Überlebensfähigkeit von UV-bestrahlten *c-fos* *-/-* Zellen (gemessen an der Fähigkeit zur Koloniebildung und zur Proliferation) war signifikant reduziert im Vergleich zu Wildtyp Zellen. Dabei beruht die UV-Hypersensitivität der *c-fos* *-/-* Zellen primär auf einem verstärkten Absterben der Zellen nach UV-Bestrahlung. Dadurch wurde demonstriert, daß die UV-induzierte Expression von cFos essentiell ist, um Säugetierzellen gegen die zytotoxischen Effekte von UV-Strahlung zu schützen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten von Devary et al. (1992), die

zeigen, daß Tyrosinkinase-Inhibitoren die UV-induzierte AP-1 Aktivität blockieren und damit die Sensitivität von Zellen gegenüber UV-Strahlung erhöhen. Einen ähnlichen Befund liefern Hefemutanten, bei denen die Funktion von GCN4 (ein AP-1 Faktor in Hefe) mit der Resistenz gegenüber UV-Strahlung korreliert (Engelberg et al., 1994).

Eine reduzierte Überlebensfähigkeit der *c-fos* *-/-* Zellen scheint spezifisch für UV-Strahlung zu sein, da keine Unterschiede im Überleben zwischen beiden Zelltypen nach  $\gamma$ -Bestrahlung festgestellt wurden. Der Grund hierfür könnte in prinzipiellen Unterschieden bei der DNA-schädigenden Wirkung von Röntgenstrahlung (Doppelstrangbrüche) und UV-Strahlung (Pyrimidindimere) liegen. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere DNA-schädigende Substanzen (z.B. MMS, Mitomycin C), die keine Doppelstrangbrüche erzeugen, ähnliche Effekte wie UV-Strahlung hervorrufen.

Durch Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese (unscheduled DNA synthesis, UDS) auf Einzelzellebene konnte nachgewiesen werden, daß UV-induzierte DNA-Läsionen in *c-fos* *-/-* Zellen gleich effizient durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt werden wie in Wildtyp Zellen. Dieser Befund ist konsistent mit den Daten der UDS-Bestimmung in Massenkultur und der Reaktivierung von *in vitro* UV-bestrahlten Reporterplasmiden (Schreiber et al., 1995). Auch hier wurden bei der DNA-Reparaturfähigkeit keine Unterschiede zwischen beiden Zelltypen festgestellt. Alle bisher bekannten UV-sensitiven Zelllinien, für die eine genetische Ursache identifiziert wurde, weisen Defizite bei der DNA-Reparatur auf, z.B. Zellen von Xeroderma pigmentosum Patienten (Lehmann, 1982). *c-fos* *-/-* Zellen sind daher das erste Beispiel, daß UV-Hypersensitivität durch einen einzelnen Gen-Defekt verursacht wird, ohne jedoch die DNA-Reparatureffizienz zu verändern. Der Verlust von cFos scheint also keinen Einfluß auf die Expression oder Aktivität von Reparaturenzymen zu haben. Diese Hypothese ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die wenigsten der UV-induzierbaren Genprodukte an der Reparatur geschädigter DNA beteiligt sind (Holbrook und Fornace, 1991; Herrlich et al., 1992).

UV-Strahlung führt nicht nur zu DNA-Schäden, sondern kann auch andere zelluläre Komponenten (z.B Proteine, Lipide, RNA) schädigen (Kochevar, 1990). Es wäre also möglich, daß cFos/AP-1 abhängige Prozesse notwendig sind, um solche Komponenten zu beseitigen und/oder neu zu synthetisieren.

Wie bereits erwähnt, äußert sich die UV-Hypersensitivität der *c-fos* *-/-* Zellen primär in einem verstärkten Absterben der Zellen nach UV-Bestrahlung. Der signifikant erhöhte Anteil an hypodiploiden Zellen (sub-2N=47%) und die

charakteristische DNA-Fragmentierung demonstrierten, daß in *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen nach UV-Bestrahlung eine verstärkte Rate an Apoptose vorliegt (Schreiber et al., 1995). Daß eine erhöhte apoptotische Aktivität die molekulare Ursache der UV-Hypersensitivität ist, konnte durch transiente Überexpression des anti-apoptischen Gens *bcl-2* (Korsmeyer, 1992) belegt werden, da dadurch das Absterben UV-bestrahlter *cFos* defizienter Zellen signifikant reduziert wurde (Schreiber et al., 1995).

Interessanterweise war in unbehandelten *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen, im Vergleich zu Wildtyp Zellen, die *p53* Transkriptmenge erhöht. Ausgehend von der unterschiedlichen basalen Expression beider Zelltypen wurde nur eine geringe transkriptionelle Aktivierung des *p53* Gens nach UV-Bestrahlung festgestellt. In Übereinstimmung mit der Tatsache, daß DNA-schädigende Agenzien durch post-translationale Modifikationen die Stabilisierung des *p53*-Proteins induzieren (Maltzman und Czyzyk, 1984; Kastan et al., 1991; Fritsche et al., 1993; Zhan et al., 1993), konnte in Wildtyp Zellen ein starker Anstieg der *p53*-Proteinmenge nach UV- und Röntgenstrahlung beobachtet werden. In *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen wurden schon im unstimulierten Zustand stark erhöhte *p53*-Proteinmengen festgestellt, die nach UV- und Röntgenstrahlung in weit geringerem Ausmaß als beim Wildtyp anstiegen. Eine Actinomycin D induzierte *p53*-Stabilisierung (Fritsche et al., 1993) konnte nur in Wildtyp Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten implizieren, daß das Fehlen von *cFos* zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivierung des *p53* Gens und Expression des Proteins führt, aber nur eine verminderte Rate der Stabilisierung des basal akkumulierten *p53*-Proteins durch UV- und Röntgenstrahlung möglich ist.

Die Promotor-Region des *p53* Gens enthält eine TRE-ähnliche Sequenz, die in einer Base von der Konsensus-Sequenz abweicht (Ginsberg et al., 1990). Bei transienten Transfektionen mit einem Promotor-CAT-Konstrukt (3 Kopien des *p53*-TREs mit dem TK-Promotor fusioniert) wurde eine induzierte CAT-Aktivität nach Kotransfektion eines *c-jun* Expressionsvektor detektiert. In Abwesenheit von kotransfiziertem *c-jun* wies dieses Reporterplasmid jedoch eine stark reduzierte Aktivität, im Vergleich zur Transfektion mit einem TK-CAT-Plasmid (ohne *p53*-TREs), auf. Die Autoren ziehen daraus die Schlußfolgerung, daß das TRE-ähnliche Sequenzmotiv des *p53* Gens eine reprimierende Funktion bei der Regulation der Genexpression einnimmt (Ginsberg et al., 1990). Auf Grund dessen wäre es denkbar, daß durch das Fehlen von *cFos* verstärkt solche AP-1 Isoformen (*cJun/X*) an dieses Motiv binden, die in der Lage sind die Aktivität des *p53*-Promotors zu erhöhen.

Das p53 Gen ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren (Vogelstein, 1990; Hollstein et al., 1991). In nahezu allen Fällen liegen diese Mutationen in der DNA-Bindedomäne von p53 und führen zu einer Inaktivierung der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung und verhindern dadurch die Expression von p53 abhängigen Zielgenen (Bargonetti et al., 1993; Pavletich et al., 1993; Wang et al., 1993; Halazonetis und Kandil, 1993; Cho et al., 1994). Die durch die Mutationen ausgelösten Konformationsänderungen des p53 Proteins gehen oft mit einer Stabilisierung des Proteins einher. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Anhäufung von p53-Protein in *c-fos* *-/-* Zellen auf einer Mutation von p53 beruht, die während der Etablierung der Zellen entstand. Es gibt aber mehrere Hinweise, die das Auftreten einer mutierten Form von p53 unwahrscheinlich machen: i) UV- und Röntgenstrahlung bewirken eine weitere Stabilisierung von p53, was bei einer mutierten Form nicht möglich sein sollte (Smith et al., 1995). ii) Zellen mit mutiertem p53 haben große Defizite bei der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden (Smith et al., 1995), was bei *c-fos* *-/-* Zellen nicht der Fall war. iii) Es wurde zwischen Wildtyp und *c-fos* *-/-* Zellen kein Unterschied in der basalen und UV-induzierten Expression des p53 abhängigen Zielgens p21/CIP1/WAF1 festgestellt. Dies ist konsistent mit früheren Befunden, die zeigten, daß Wildtyp p53 notwendig ist, um p21 zu induzieren (El-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993). iv) Durch Überexpression von exogenem cFos in *c-fos* *-/-* Zellen konnte eine fast vollständige Wiederherstellung der Resistenz gegenüber den zytotoxischen Effekten von UV-Strahlung erreicht werden (Schreiber et al., 1995). Dadurch konnte zum einen demonstriert werden, daß die UV-Hypersensitivität cFos spezifisch ist, zum anderen, daß keine sekundäre Mutationen (z.B. mutiertes p53), die mit dem Phänotyp korrelieren könnten, in *c-fos* *-/-* Zellen vorliegen.

Welche Rolle spielt die p53 vermittelte Apoptose beim programmierten Zelltod von UV-bestrahlten *c-fos* *-/-* Zellen? Neuere Arbeiten zeigen, daß p53 durch Sequenz-spezifische Bindung die Transkription des bax Gens (induziert Apoptose) aktiviert und die Transkription des bcl-2 Gens (verhindert Apoptose) durch einen bisher unbekanntem Mechanismus reprimiert (Miyashita et al., 1994a, b; Miyashita und Reed, 1995; Han et al., 1996). Es wäre daher möglich, daß die konstitutiv erhöhten p53-Proteinmengen in *c-fos* *-/-* Zellen zu einer Repression von bcl-2 führen, was nach UV-Bestrahlung der Zellen zu einer verstärkten Apoptose führt. Diese These wird durch den Befund unterstützt, daß ektopische Überexpression von *bcl-2* in *c-fos* *-/-* Zellen das UV-induzierte Absterben der Zellen reduziert (Schreiber et al., 1995).

Unabhängig davon welcher molekulare Mechanismus für die UV-Hypersensitivität der *c-fos* *-/-* Zellen verantwortlich ist, resultierte das Fehlen von cFos in einer starken Verringerung der UV-induzierten Expression von Kollagenase I, Stromelysin-1 und Stromelysin-2. Im Gegensatz dazu wurden in Wildtyp Zellen 36 h nach der UV-Bestrahlung, in Übereinstimmung mit Befunden aus Zellsystemen von Mensch und Maus (Angel et al., 1987a; Gack et al., 1994), eine starke Induktion dieser Gene festgestellt. Der Unterschied in der UV-Induzierbarkeit endogener, AP-1 abhängiger Gene spiegelt sich auch in der Transaktivierung eines 5xTRE-CAT Reporterplasmids wider. Während in Wildtyp Zellen eine fast 3-fache UV-Induktion beobachtet wurde, konnte in *c-fos* *-/-* Zellen nur eine marginale Induktion detektiert werden (Schreiber et al., 1995). *In vitro* DNA-Bindungstudien ergaben, daß in cFos defizienten Zellen die DNA-Bindung von AP-1 an das TRE der interstitiellen Kollagenase und an ein Konsensus-TRE 36 h nach der UV-Bestrahlung bereits auf basale Werte gesunken ist, während bei Wildtyp Zellen zu diesem Zeitpunkt der Maximalwert (4-fach induziert) vorliegt. Diese Diskrepanz in der UV-induzierte DNA-Bindung von AP-1 Komplexen beruht darauf, daß in Wildtyp Zellen (36 h nach UV-Induktion) verstärkt Komplexe mit cFos, JunB und JunD vorliegen, diese aber in *c-fos* *-/-* Zellen fehlen bzw. wenig UV-induzierbar sind. Auf Grund dieser Befunde muß man annehmen, daß in UV-bestrahlten Wildtyp Zellen ein molekularer Mechanismus aktiviert wird, der eine verstärkte AP-1 DNA-Bindung bewirkt und der in *c-fos* *-/-* Zellen zumindest zu späten Zeiten nach der UV-Bestrahlung außer Funktion ist.

Analog zur TPA-Induktion, war die UV-induzierte Expression der frühen Gene *c-fos* und *c-jun* in cFos defizienten Zellen nicht verändert. Dieser Befund demonstriert, daß UV-induzierte Signalketten, die zur Hyperphosphorylierung und Aktivierung von SRF/TCF und cJun/ATF-2 Komplexen (binden konstitutiv am *c-fos* bzw. am *c-jun* Promotor) führen (Herrera et al., 1989; Sachsenmaier et al., 1994; van Dam et al., 1995; Cavigelli et al., 1995), in *c-fos* *-/-* Zellen nicht beeinträchtigt sind.

Die UV-Induktion der menschlichen Kollagenase I wird durch einen autokrinen Mechanismus vermittelt (Schorpp et al., 1984; Krämer et al., 1993). Ein ähnlicher Mechanismus könnte im Maussystem vorliegen. Tatsächlich sezernieren UV-bestrahlte Wildtyp Zellen Faktoren, die in unbehandelten Zellen die Expression der Kollagenase I induzieren können. Konditionierte Kulturüberstände von *c-fos* *-/-* Zellen sind dagegen nicht in der Lage die Kollagenase I Expression in Zielzellen zu induzieren. Diese Befunde legen nahe, daß cFos eine funktionelle Rolle bei der UV-induzierten Freisetzung von Faktoren spielt, die für die autokrine Induktion von

AP-1 Zielgenen erforderlich sind. Das Fehlen dieser Faktoren scheint aber nicht die ausschlaggebende Ursache für die UV-Hypersensitivität von *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen zu sein, da eine Kokultivierung mit Wildtyp Zellen keinen Effekt auf den Phänotyp hatte. Offensichtlich ist auch in Anwesenheit der von Wildtyp Zellen sezernierten Faktoren das cFos Protein notwendig, um die UV-Hypersensitivität aufzuheben.

Insgesamt kann aus diesen Daten die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die beobachtete, stark reduzierte Expression von Kollagenase I, Stromelysin-1 und Stromelysin-2 in UV-bestrahlten *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen exemplarisch für solche Genprodukte steht, die für das Überleben einer Zelle nach UV-Bestrahlung wichtig sind. Diese Genprodukte sind aber sicherlich nicht kausal an der UV-Hypersensitivität beteiligt. *c-fos* <sup>-/-</sup> Zellen sind jedoch ein sehr attraktives System, um jetzt diejenigen Gene zu identifizieren, deren Produkte beim Schutz der Zelle gegenüber UV-Strahlung oder generell gegenüber zellulärem Streß eine Rolle spielen. Die Isolierung und Charakterisierung solcher Gene bzw. das Verständnis der Wirkungsweise der abgeleiteten Genprodukte könnte auch wesentlich zur Aufklärung der durch Strahlung oder andere genotoxischen Substanzen induzierten Karzinogenese beitragen.

## MATERIAL & METHODEN

### Inhaltsverzeichnis

<b>Material</b> .....	88
Chemikalien und Bezugsquellen.....	88
Radiochemikalien.....	90
Geräte und Verbrauchsmaterial.....	90
Cytokine und Wachstumsfaktoren.....	91
Enzyme.....	91
Antikörper und Seren.....	91
Proben für Northern Blot Analysen.....	92
Expressionsvektoren und Reporterplasmide.....	92
Allgemein verwendete Lösungen und Puffer.....	92
Zelllinien und Kulturbedingungen.....	93
Bakterien und Kulturbedingungen.....	93
Oligonukleotide.....	93
<b>Methoden</b> .....	94
Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren.....	94
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	94
Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	95
Dephosphorylierung von DNA.....	95
Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden.....	95
Ligation von DNA-Fragmenten.....	95
Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese.....	95
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	96
Herstellung kompetenter E.coli Bakterien.....	96
Transformation kompetenter Bakterien.....	97
Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien ("Minipräp").....	97
Präparation großer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien ("Maxipräp").....	97
Einfrieren von Bakterien.....	98
Hybridisieren von komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotid-DNA.....	98
Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase.....	98



Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-DNA mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment).....	99
Radioaktive Markierung von DNA-Sonden .....	99
Präparation von Zellextrakten.....	99
Proteinbestimmung.....	100
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	100
Identifizierung von immobilisierten Proteinen durch Antikörper in der Western Blot Analyse.....	101
Präparation von RNA.....	101
Bestimmung der mRNA-Menge durch Northern Blot Analyse.....	102
RNase-Protektionsanalyse.....	103
Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität ("CAT-Assay").....	103
In vivo footprint Analyse durch Ligations-vermittelte PCR.....	104
Gelretardations-Analyse .....	106
Zellkultur.....	106
Transiente Transfektion von Zellen .....	106
Stabile Transfektion.....	107
Ernten retroviraler Zellkulturüberstände und transiente Infektion von Zellen .....	107
Behandlung von Zellen .....	107
Radioaktive Markierung von Zellen mit <sup>35</sup> S-Methionin .....	108
Überlebenskurven nach $\gamma$ -Bestrahlung .....	108
Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese nach UV-Bestrahlung (UDS) .....	108

## Material

### *Chemikalien und Bezugsquellen*

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt, autoklaviert und bei geeigneter Temperatur gelagert.

Acetyl-Coenzym A	Sigma, München
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Pharmacia, Freiburg
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
BES	Sigma, München
BIORAD-Proteinassay	Biorad, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Casaminosäuren	Difco, Detroit
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTAB	Sigma, München
DEAE-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMS	Fluka, Buchs
DMSO	Fluka, Buchs
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DMEM-Medium	Gibco, Karlsruhe
DTT	Boehringer, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Eichproteine, vorgefärbt	Biorad, München
EM-1 Photoemulsion	Amersham-Buchler, Braunschweig
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
FCS	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

F12-Medium	Gibco, Karlsruhe
G418	Gibco, Karlsruhe
G-50 Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glyoxal (30%)	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma, München
Guanidinhydrochlorid	Sigma, München
Guanidinthiocyanat	Fluka, Buchs
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Detroit
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumsarcosyl	Geigy, Leverkusen
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Oligo-dT-Zellulose	Pharmacia, Freiburg
PEG	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piperidin	Fluka, Buchs
PIPES	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, München
poly dI/dC	Boehringer, Mannheim
"Prime It <sup>TM</sup> Random Primer Kit"	Stratagene, Heidelberg
Propanol	Merck, Darmstadt
"QIAquick Gel Extraction Kit"	Diagen, Hilden
RNase A	Sigma, München
RPMI (defizient)	Sigma, München
Sperma DNA (aus Hering)	Sigma, München
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Biorad, München
TPA	Sigma, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Biorad, München

Trypsin	Gibco, Karlsruhe
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### ***Radiochemikalien***

$^{14}\text{C}$ -Eichproteine (0.37-1.85 MBq/mg)
D-threo-(dichloracetyl- $^{14}\text{C}$ )-Chloramphenicol (7.4MBq/ml)
$\alpha$ - $^{32}\text{P}$ - dCTP (370 MBq/ml)
$\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -CTP (740 MBq/ml)
$\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (370 MBq/ml)
L- $^{35}\text{S}$ -Methionin (370MBq/ml)
Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin (185MBq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

### ***Geräte und Verbrauchsmaterial***

Axioskop Mikroskop	Zeiss, Jena
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
$\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Quelle	Atomic Energy, Canada
DC-Platten (Kieselgel-beschichtet)	Macherey-Nagel, Düren
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
Elektrophoreseapparaturen	Biorad, München
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	BRL, Eggenstein
Geltrockner	Kodak, New Haven
Kontron-Hermle Centrikon H-401 Zentrifuge	Biorad, München
Mikrozentrifugenröhrchen	Hermle, Gosheim
NACS-Prepac-Säulen	Greiner, Nürtingen
	BRL, Eggenstein
Nylonmembran (Hybond N <sup>+</sup> )	Amersham-Buchler, Braunschweig
Petrischalen (Bakterien)	Greiner, Nürtingen
Perkin Elmer Cetus 9600 Thermocycler	Perkin Elmer
Phosphoimager Fujix BAS 1000	Fuji Photo Film Co., Japan
Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon)	Millipore, Bedford
Röntgenfilme	Amersham-Buchler, Braunschweig
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena

Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron, Gosheim
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Transferapparat für Western Blot	Biorad, München
Transilluminator (IL-350M)	Bachhofer, Reutlingen
Ultrazentrifugen (L8-70)	Beckmann, Stuttgart
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vakuum-Konzentrator (Speed Vac)	Savant, Farmingdale
Whatman 3MM <sup>®</sup>	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen (Quick Seal)	Beckmann, Stuttgart

### ***Cytokine und Wachstumsfaktoren***

Il-1 $\alpha$ (murin, rekombinant, aus E.coli, spezifische Aktivität: ca. $1 \times 10^8$ U/mg)	IC Chemikalien, Ismaning
TNF- $\alpha$ (murin, rekombinant, aus E.coli, spezifische Aktivität: ca. $1 \times 10^8$ U/mg)	Calbiochem, La Jolla
bFGF (human, rekombinant, aus E.coli, spezifische Aktivität: ca. $1 \times 10^8$ U/mg)	British Biotechnology, Abingdon

### ***Enzyme***

Alle Enzyme und entsprechende 10x Reaktionspuffer wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), USB (Cleveland/Bad Homburg) und Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

### ***Antikörper und Seren***

cJun, JunD, FosB und Fra2 spezifische Antiseren aus Kaninchen wurden von Dr.C. Pfarr (Institut Pasteur, Paris) zur Verfügung gestellt.

Anti-Jun (Castorp) und Anti-Fos (FosX) Kaninchenserum wurde von Dr. H. J. Rahmsdorf (Forschungszentrum, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen (Prä-Immunsrum) wurde von Dr. P. Angel (Forschungszentrum, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

Anti-p53 (PAB 122, monoklonal, IgG) wurde von Dr. C. Blattner (Forschungszentrum, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

Kaninchen Anti-p21 (polyklonal, IgG), Kaninchen Anti-cFos (polyklonal, IgG) Kaninchen Anti-Fra1 (polyklonal, IgG) und Kaninchen Anti-JunB (polyklonal, IgG) wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) bezogen.

Ziegen-Antiseren (HRP konjugiert) gegen Maus IgG und gegen Kaninchen IgG, wurden von der Firma Dako (Hamburg) bezogen.

***Proben für Northern Blot Analysen***

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

*v-fos* (viral): PstI-Fragment des Plasmids pUC9/*v-fos* (Rahmsdorf et al., 1987)

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

Kollagenase I (Maus): PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mColl-1 (Gack et al., 1994)

72-kD TypIV Kollagenase (Maus): PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mColl-IV-72kD (Gack et al., 1994)

Stromelysin-1 (Maus): PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mStrom-1 (Gack et al., 1994)

Stromelysin-2 (Maus): EcoRI-Fragment des Plasmids pBl-mStrom-2 (Gack et al., 1994)

92-kD TypIV Kollagenase (Maus): EcoRI/HindIII-Fragment des Plasmids pBl-M92-KD-2 (Reponen et al., 1994)

CD44 (Maus): BamHI/EcoRI-Fragment des Plasmids pBl-mCD44 (M. Hofmann, unveröffentlicht), erhalten von Dr. M. Hofmann (Forschungszentrum, Karlsruhe)

***Expressionsvektoren und Reporterplasmide***

RSV-*cFos*, RSV-O, RSV-MBD  $\Delta vJ$ , -73/+63 huCol-CAT, -60/+63 huCol-CAT, 3xTRE-CAT und tk-CAT (Angel et al., 1987a, b; Angel et al., 1988a, b; König et al., 1989; Stein et al., 1993) wurden von Dr. P. Angel (Forschungszentrum, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. RSV-*FosB* wurde von Dr. H. v. Dam (Universität, Leiden) zur Verfügung gestellt. -500/-66 mCol-tk-CAT und -66/+29 mCol-CAT wurden von Dr. M. Schorpp (Forschungszentrum, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

***Allgemein verwendete Lösungen und Puffer***

**100x Denhardts:** 2% BSA, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% Ficoll

**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

**20x SSC:** 3 M NaCl, 0.25M Na-Citrat, pH 6.5

**TBE:** 90 mM Tris, 90 mM Borat, 2.5 mM EDTA

## ***Zelllinien und Kulturbedingungen***

GM637-Zellen (SV40-transformierte, menschliche Hautfibroblasten) und NIH 3T3-Zellen (embryonale Maus-Fibroblasten, entsprechen der NIH 3T3-Zelle der American Type Culture Collection) wurden in DMEM Medium ergänzt mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Beide Zelllinien wurden mir von Dr. P. Angel (Forschungszentrum, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

ROS 17/2.8 Zellen (Ratten-Osteosarkom-Zelllinie; Price und Baukol, 1980) wurden in F-12-Medium ergänzt mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Diese Zelllinie wurde von Dr. L. Defize (Hubrecht Laboratorium, Utrecht) zur Verfügung gestellt.

3T3-ähnliche Wildtyp (WT56, f20) und c-fos -/- (f1, f10) Zelllinien (Brüsselbach et al., 1995) wurden von Dr. E. F. Wagner (IMP, Wien) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM Medium ergänzt mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Produzentenzelllinien für Retroviren (pMVcFos und pMV-0; Superti-Furga et al., 1991) wurden mir von M. Schreiber (IMP, Wien) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM Medium ergänzt mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 6% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte und 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen der Zellen wurden an einer Sterilbank mit sterilen Medien, Puffern und Glaswaren durchgeführt.

## ***Bakterien und Kulturbedingungen***

Der E.coli-Stamm XL-1Blue (Bullock et al., 1987) wurde für Klonierungen und Amplifikation von Plasmiden verwendet. Die Kultivierung erfolgte in TY-Medium (1% Bacto-Trypton, 1% Bacto-Hefeextrakt, 0.1% Casaminsäuren, 0.5% NaCl). Für die Präparation kompetenter Bakterien wurde PSI-Medium (2% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 0.4% MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, pH 7.7) verwendet.

## ***Oligonukleotide***

### **Oligonukleotide für *in vivo* footprint-Analysen:**

25mer Linker: 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3'

11mer Linker: 5'-GAATTCAGATC-3'

Maus c-jun-Gen:

nicht-kodierender Strang:

Primer 1: 5'-GTAGGAGAAAGAAGGGCC-3'

Primer 2: 5'-GAGAAAGAAGGGCCCGACTGTA-3'

Primer 3: 5'-GAAAGAAGGGCCCACTGTAGGAGCGC-3'

Gen der interstitiellen Kollagenase der Maus:  
nicht-kodierender Strang:

Primer 1: 5'-GAAAATGCTGAGGCTGTTTATTTTGC-3'

Primer 2: 5'-CAGATGAGTTTTGATATTCCCCCACTGA-3'

Primer 3: 5'-GATATTCCCCCACTGAAAGTAGAGATGCCTTC-3'

### **Oligonukleotide für Gel-Retardations-Analysen:**

huCol AP-1 5'-AGCTAGCATGAGTCAGACAC-3'  
5'-AGCTGTGTCTGACTCATGCT-3'

mCol AP-1 5'-AGCTAAAGTGGTGACTCATCACTAT-3'  
5'-AGCTATAGTGATGAGTCACCACTTT-3'

mCD44 5'-AGCTTGGCTGCTTAGTCACAGCCCC-3'  
5'-AGCTGGGGCTGTGACTAAGCAGCCA-3'

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen TIB Molbiol (Berlin), Stratagene (Heidelberg) und MWG Biotech (Ebersberg) bezogen

## **Methoden**

### ***Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren***

Zur Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde ein Volumen Phenol zugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24 :1) wurde nochmals gemischt und die Phasen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000 UpM, 2 min, RT) getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 :1) in gleicher Weise extrahiert.

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde (wenn nicht anders angegeben) mit 3 M Natriumacetat (pH 4.8) auf eine Endkonzentration von 0.3 M versetzt und mit 2.5 Volumina Ethanol gemischt. Die Präzipitation erfolgte für 15 min bei -80 °C oder mindestens 30 min bei -20 °C. Das Präzipitat wurde anschließend bei 13000 UpM 10-20 min lang abzentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und im Vakuum-Konzentrator ("Speed Vac") getrocknet.

### ***Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren***

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml einzelsträngige Oligonukleotid-DNA.



### ***Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen***

Im allgemeinen wurde die DNA in dem vom Hersteller des Enzyms vorgeschlagenen Reaktionspuffer mit 2-3 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease pro  $\mu\text{g}$  DNA gemischt. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 37 °C (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) für mindestens 1 h.

### ***Dephosphorylierung von DNA***

Linearisierte Plasmid-DNA wurde mit 1 U Alkalischer Phosphatase pro  $\mu\text{g}$  DNA und dem entsprechenden Reaktionspuffer gemischt. Bei der Dephosphorylierung von überhängenden Enden wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert, wobei nach 30 min erneut dieselbe Menge Enzym zugegeben wurde. Sollten nicht überstehende Enden dephosphoryliert werden, erfolgte die Inkubation zunächst für 15 min bei 37 °C und anschließend 15 min bei 56 °C. Nach Zugabe derselben Menge Enzym wurde der Vorgang wiederholt. In beiden Fällen wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung (f.c.: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) beendet und 15 min bei 68 °C inkubiert. Danach wurde Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert.

### ***Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden***

Getrocknete DNA wurde mit 14  $\mu\text{l}$  Wasser, 2  $\mu\text{l}$  10 mM DTT, 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix und 2  $\mu\text{l}$  Klenow-Puffer (0.7 M Tris pH 7.4, 70 mM  $\text{MgCl}_2$ ) versetzt und nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ $\mu\text{l}$ ) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Ansatzvolumen mit Wasser erhöht, eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die DNA mit Ethanol präzipitiert.

### ***Ligation von DNA-Fragmenten***

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im gewünschten Verhältnis gemischt und in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  mit 1- 3 U T4-DNA-Ligase und Ligase-Puffer (f.c.: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM ATP) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 12-16 h bei 15 °C oder für mehrere Stunden bei RT.

### ***Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese***

#### **A. Agarosegel**

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0.8-1.5%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TBE durch Kochen gelöst, mit 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid versetzt und in Gegenwart eines Kammes in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden in Ladepuffer (f.c.: 10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) aufgenommen und in die Taschen des mit TBE überschichteten Gels pipettiert. Die

Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz über einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 302 nm) sichtbar gemacht.

#### B. Denaturierendes Polyacrylamidgel

Für die denaturierende Gelelektrophorese von DNA- oder RNA-Fragmenten wurden 6%ige Polyacrylamidgele (6% Acrylamid/Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 90 mM Tris-HCl pH 8.3, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, 0.1% APS, 0.02% TEMED) hergestellt (zwischen zwei Glasplatten mit 0.5 mm dicken Abstandshaltern). Nach der Polymerisation wurde das Gel ohne Proben für 30 min bei 1500 V in 1x TBE vorlaufen gelassen. Die Proben wurden in Formamid-Ladepuffer (80% Formamid, 1 mM EDTA, 0.02% Bromphenolblau, 0.02% Xylencyanol) aufgenommen, 5 min bei 95 °C inkubiert, 5 min auf Eis gestellt und anschließend in die, mit 1x TBE gespülten Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 1500 V für ca. 2 h bis die Bromphenolblaufront das Gel verlassen hatte. Nach dem Lauf wurde eine Glasplatte abgenommen, das Gel auf 3MM Papier abgezogen, getrocknet, ein Röntgenfilm aufgelegt und bei -80 °C exponiert.

#### *Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen*

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde durch Fluoreszenz über einen UV-Transilluminator (254nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell unterhalb des Fragmentes ein Spalt in die Agarose geschnitten. In diesen Spalt wurde ein Stückchen DEAE-Papier gesteckt und anschließend die Elektrophorese fortgesetzt, bis das Fragment vollständig an das DEAE-Papier gebunden war. Zur Elution des DNA-Fragmentes wurde das DEAE-Papierstückchen zerkleinert, in ein 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und in 1.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 und 1 mM EDTA für 20 min bei 37°C inkubiert. Um das Eluat vom Papier zu trennen, wurde mit einer Injektionsnadel ein Loch in den Boden des Reaktionsgefäßes gestochen, das Gefäß in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gestellt und kurz abzentrifugiert. Die Lösung mit dem DNA-Fragment wurde anschließend Phenol/Chloroform gereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

Alternativ dazu wurde das zu isolierende DNA-Fragment unter Verwendung des "QIAquick Gel Extraktion Kit" gemäß den Herstellerangaben präpariert.

#### *Herstellung kompetenter E.coli Bakterien*

Der Bakterienstamm E. coli XL1 blue wurde auf einer Agarplatte mit TY-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6 ml Kultur (PSI-Medium) angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600} = 0,28$  inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 100 ml PSI-Medium wurde die Kultur bis zur  $OD_{600} = 0,48$  weiter inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrikon H-401, Rotor A 6.9, 5000 UpM, 10 min, 4 °C) wurden diese in 10 ml, 4 °C kalten und sterilfiltriertem TFB-1-Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Kaliumazetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.8 mit 0.2 M Essigsäure eingestellt) aufgenommen und für 3 h auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 5000 UpM), in 10ml eiskaltem TFB-2-Puffer (10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM

RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glyzerin) resuspendiert und in 50 µl Aliquots abgefüllt. Die schockgefrorenen Bakterien (2 min flüssiger Stickstoff) wurden bei -80 °C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

### ***Transformation kompetenter Bakterien***

50 µl kompetente Bakterien wurden mit Plasmid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen vermischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 37 °C für 3 min und Inkubation für 2 min auf Eis wurden 1 ml SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose) zugegeben und die Kultur für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte (1.5% Bacto-Agar in TY-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

### ***Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien ("Minipräp") nach Del Sal und Schneider, 1987***

1.5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (in TY-Kulturmedium mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden 5 min bei 4000 UpM abzentrifugiert, in 200 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 0,1% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.0) resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl Lysozym (10 mg/ml) 10min bei RT inkubiert. Nach Kochen (45 sec) im Wasserbad wurde 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Die pelletierten Zelltrümmer wurden mit einem Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 8 µl 5% CTAB in 0.5 M NaCl versetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 UpM wurde die Plasmid-DNA in 300 µl 1.2 M NaCl gelöst und mit 2.5 Volumen Ethanol präzipitiert (10 min, -80 °C). Nach erneuter Zentrifugation wurde des Pellet gewaschen (70% Ethanol), getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

### ***Präparation großer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien ("Maxipräp")***

250 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (in TY-Kulturmedium mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden bei 4 °C und 5000 UpM für 10 min abzentrifugiert (Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Rotor A 6.9) und in 5 ml Lysozym-Puffer (2 mg/ml Lysozym, 100 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min bei RT unter Schütteln inkubiert und für weitere 10 min bei 70°C erhitzt. Nachfolgend wurde der Ansatz in einer Beckmann L8-70-Ultrazentrifuge für 60 min bei 32000 UpM und 4 °C zentrifugiert (Rotor SW 40). Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 10 ml PEG-Puffer (20% PEG 6000, 1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) und 90-minütiger Inkubation bei RT präzipitiert und durch Zentrifugation (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 4000 UpM, 5 min, RT) sedimentiert. Das Pellet wurde 30 min bei 37 °C in 3 ml TE-puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) gelöst. Diese Ansätze wurden mit 4.2 g Cäsiumchlorid versetzt, bei 37 °C gelöst, 150 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und in "Quick Seal" Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einer Beckmann L8-70-Ultrazentrifuge (mit

Vertikalrotor VTi65) 16 h lang bei 55000 UpM (20 °C) zentrifugiert. Durch die Ausbildung eines Dichtegradienten fokussierte die intakte und die in Einzelsträngen vorliegende Plasmid-DNA in zwei distinkten Banden, so daß die intakte DNA mittels einer Spritze abgezogen und unter identischen Bedingungen für weitere 6 h im Dichtegradienten zentrifugiert werden konnte. Nach erneutem Abziehen der Plasmid-DNA wurden zwei Teile Wasser zu der Lösung pipettiert und diese, zur Entfernung des Ethidiumbromids, einige Male mit Wasser-gesättigtem Butanol extrahiert. Die klare DNA-Lösung wurde mit 2.5 Volumen Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 90000 UpM, 10 min, 4 °C) wurde das DNA-Pellet gewaschen (Ethanol 80%), getrocknet und in einem kleinen Volumen Wasser gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert.

### ***Einfrieren von Bakterien***

900 µl einer Bakterienkultur, die über Nacht bei 37°C unter Schütteln gewachsen war, wurden mit 100 µl DMSO vermischt und bei -80°C gelagert.

### ***Hybridisieren von komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotid-DNA***

Zum Hybridisieren komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotide, die für Gel-Retardationsexperimente verwendet wurden, wurden je 250 pmol Einzelstrang-DNA in 100 µl 60 mM KCl, 12% Glycerol, 12 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Tris pH 7.9 aufgenommen. Das Eppendorfgefäß mit der Probe wurde in ein Becherglas (2 l) mit 95°C heißem Wasser gesetzt und über Nacht bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Linker-Oligonukleotid-DNA, die bei *in vivo footprint*-Experimenten eingesetzt wurde, wurde durch Hybridisierung der 25mer und 11mer großen Linkereinzelstränge erhalten. Dazu wurden beide Oligonukleotide in einer Konzentration von je 20 pmol/µl in 250 mM Tris-HCl pH 7.7 zusammengegeben und für 5 min auf 95°C erhitzt. Das Eppendorfgefäß mit der Reaktions-Lösung wurde danach in ein Becherglas mit 500 ml Wasser gesetzt und langsam auf 4 °C abgekühlt. Hybridisierte Oligonukleotid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

### ***Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase***

Zur radioaktiven Markierung von "Primern" für *in vivo footprint*-Analysen wurden in einem 20 µl Ansatz 20 pmol einzelsträngige Oligonukleotid-DNA mit 12 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und 20 U T4-Polynukleotidkinase in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.1 mM Spermidin, 0.1 mM EDTA) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Das markierte Oligonukleotid wurde anschließend Phenol/Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 10 µg Hefe- oder E.coli-tRNA mit Ethanol präzipitiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 13000 UpM) wurde das Pellet gewaschen (Ethanol 80%), getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

### ***Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-DNA mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)***

Diese Art der Markierung wurde für Oligonukleotid-DNA verwendet, die in Gelretardations-Experimenten eingesetzt wurde. Doppelsträngige Oligonukleotid-DNA mit 5'-Überhängen (2.5 pmol) wurden mit 2 µl Reaktionspuffer (700 mM Tris pH 7.5, 70 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix ohne dCTP, 3 µl α-<sup>32</sup>P-dCTP und 1 µl Klenow DNA-Polymerase I (5 U/µl) gemischt, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und 1 h bei RT inkubiert.

Die markierte Oligonukleotid-DNA wurde über eine NACS-Prepac-Säule von nicht eingebauten Radionukleotiden abgetrennt. Dazu wurde die NACS-Prepac-Säule mit 1 ml Lösung E (1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) gewaschen und zweimal mit 1 ml Lösung A (0.1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) äquilibriert. Die radioaktiv markierte Probe wurde, nach Zugabe von 380 µl Lösung A, auf die Säule gegeben und langsam durchtropfen gelassen. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit 2x 1 ml Lösung A von der Säule gewaschen. Anschließend wurde die radioaktiv markierte DNA mit 4x 100 µl Lösung E eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und in Anwesenheit von 10 µg t-RNA mit Ethanol präzipitiert. Nach dem Waschen (80% Ethanol) und Trocknen wurde die Probe in 100 µl Wasser aufgenommen, was einer Endkonzentration von 25 fmol/µl entspricht. 1 µl der Probe hatte im allgemeinen eine Aktivität von 5x 10<sup>4</sup> bis 1x 10<sup>5</sup> cpm.

### ***Radioaktive Markierung von DNA-Sonden***

50-100 ng eines gereinigten cDNA-Fragments wurden mit 5 µl α-<sup>32</sup>P-dCTP unter Verwendung des "Prime it-Kit" gemäß den Herstellerangaben radioaktiv markiert. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide wurden durch Gelfiltration (G-50-Sephrose) abgetrennt.

### ***Präparation von Zellextrakten***

#### **A. Kernextrakte (Dignam et al., 1983)**

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 3 ml PBS (Gummischaber) abgeschabt und in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Die Zellen wurden 5 min bei 4 °C und 1500 UpM zentrifugiert und das Volumen des Zellsedimentes bestimmt. Die Zellen wurden in ca. 300 µl (3-faches Sedimentvolumen) Puffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1mM PMSF) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch fünfmaliges Auf- und Abziehen in einer Einmalspritze (1 ml, 27G-Kanüle) aufgebrochen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 13000 UpM (30 sec) sedimentiert, in 40-100 µl (ca. 1.5-faches Sedimentvolumen) Puffer C (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% Glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und die Kernproteine durch Inkubation für 30 min auf Eis unter mehrmaligem Auf- und Abziehen (Eppendorf-Pipette, 1000 µl) extrahiert. Anschließend wurden die unlöslichen

Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 13000 UpM, 4 °C). Der Überstand wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### B. Gesamt-Zellextrakte

Die Zellen wurden wie in Punkt A beschrieben, gewaschen, abgeschabt und abzentrifugiert. Danach wurde das Sediment im gleichen Volumen Lysispuffer (600 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM DTT) resuspendiert und der Ansatz unter wiederholtem Mischen für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer vom Gesamt-Zellextrakt durch Zentrifugation bei 13000 UpM (4 °C) für 30 min abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, das Volumen bestimmt und mit dem gleichen Volumen Glycerolpuffer (40% Glycerin, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM DTT) gemischt und aliquotiert bei -80 °C gelagert. Die so präparierten Gesamt-Proteinextrakte wurden bei allen Gelretardations-Analysen eingesetzt.

### *Proteinbestimmung*

2-5 µl einer Proteinlösung wurden mit 200 µl einer 1:5 mit Wasser verdünnten "Proteinassay"-Lösung der Firma Biorad gemischt und die Absorption bei 600 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Zur Eichung wurden serielle Verdünnungen von BSA hergestellt.

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

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Lämmli (1970). Die verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem 10 oder 12.5%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel. Die Trenngellösung wurde durch Mischen von Trenngelpuffer, H<sub>2</sub>O, Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, SDS- und APS-Lösung hergestellt und hat eine Endkonzentration von 10 oder 12.5% PAA, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS. Nach Zugabe von TEMED (0.01% f.c.) wurde die Trenngellösung zwischen zwei, durch Abstandhalter getrennte, Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel (5% PAA, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.01% TEMED) auf das Trenngel gegossen und in Gegenwart eines entsprechenden Kammes polymerisiert.

Die Proteinproben wurden in Lämmli-Probenpuffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% β-Mercaptoethanol, 0.01% Bromphenolblau; f.c.) aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0.1% SDS) bei konstanter Stromstärke von 25 mA bis die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden vorgefärbte Eichproteine in einer Spur des Gels aufgetrennt. Im Falle der Auftrennung von <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proteinen wurden <sup>14</sup>C-markierte Eichproteine verwendet. Gele mit radioaktiv-markierten Proteinen wurden für 30 min fixiert (40% Methanol, 10% Essigsäure), in H<sub>2</sub>O gewaschen (2x, 15 min) und für 30 min aktiviert (1 M Natriumalicylat, 3% Glycerin). Danach wurden die Gele getrocknet und autoradiographiert.

### ***Identifizierung von immobilisierten Proteinen durch Antikörper in der Western Blot Analyse***

Zur Identifizierung von Proteinen wurden diese nach Auftrennung durch SDS-PAGE, elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Die in Methanol aktivierte und in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,001% SDS, 20% Methanol) äquilibrierte Membran wurde auf das gleichermaßen äquilibrierte Gel gelegt, zwischen zwei Lagen feuchtes 3 MM Whatman-Papier gepackt und in einem mit Schwämmen versehenen Gelhalter fixiert. Diese Transfereinheit wurde vertikal in eine mit Blotting-Puffer gefüllte Transferkammer eingesetzt, wobei die Membran zur Anode orientiert war. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C, 150 mA konstanter Stromstärke für 4-16 h.

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran kurz mit TBS (25 mM Tris-HCl pH 8.1, 125 mM NaCl) gewaschen und für mindestens 30 min in einer Trockenmilchlösung (4% Trockenmilchpulver in TBS, 0.5% Tween 20; TM-TBS) unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zusammen mit dem Primärantikörpern (1:500 - 1: 1000 verdünnt in TM-TBS) in eine Plastikfolie eingeschweißt und für mindestens 1 h unter Rotation inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 4-maliges Waschen entfernt. Nachfolgend wurde die Membran in analoger Weise mit einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:5000) für mindestens 30 min inkubiert. Nach dem Waschen mit TM-TBS (4x, je 2 min) und TBS (2x, je 2min) wurden die spezifischen Proteine mittels ECL-Reaktion ("Enhanced Chemoluminescence"), die gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, nachgewiesen.

### ***Präparation von RNA***

#### **A. Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987)**

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 ml Lösung D (4 M GiSCN, 25 mM NaCitrat pH 7.0, 0.5% Na-Sarcosyl, 0.1 M Mercaptoethanol) lysiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst und mittels einer Injektionsspritze nach mehrmaligem Auf- und Abziehen in ein steriles 12ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 µl 2 M Ammoniumacetat (pH 4.0) wurde mit 2 ml wassergesättigtem Phenol ausgeschüttelt, 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol 49:1 zugegeben, nochmals ausgeschüttelt und das Gemisch für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 10000 UpM, 10 min, 4 °C) wurde die wässrige Phase abgezogen und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol für 1 h bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, das RNA-Pellet 2x mit Ethanol (70%) gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in 100 µl Wasser gelöst (5 min, 65 °C) und die Konzentration bestimmt.

#### **B. polyA<sup>+</sup> RNA**

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in der Kulturschale (Ø 14 cm) mit 5 ml STE-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) mit 300 µg/ml Proteinase K und 0.5% SDS lysiert. Die Lysate wurden mittels einer Injektionsspritze nach mehrmaligem Auf- und Abziehen in ein steriles Plastikröhrchen überführt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Homogenate mit NaCl zu einer Endkonzentration von 0.5 M versetzt und in

Gegenwart von 100 mg Oligo-dT-Zellulose in HSB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) pro Probe für 12-16 h bei RT rotiert. Die an die Oligo-dT-Zellulose gebundene mRNA wurde durch Zentrifugation (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 1700 UpM, 2 min, RT) sedimentiert und viermal mit je 10 ml HSB-Puffer gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte, indem die Oligo-dT-Zellulose dreimal mit 2 ml Wasser gewaschen und die Eluate in einem sterilen Zentrifugenröhrchen auf Eis gesammelt wurden. Davon wurden 400 µl im Spektralphotometer zur Bestimmung der RNA-Konzentration gemessen. Die verbleibende RNA-Lösung wurde mit 10 µg t-RNA, Na-Acetat pH 4.8 (0.2 M f.c.) und Ethanol präzipitiert (-20 °C, 12-16 h). Danach wurde die RNA durch Zentrifugation (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 9000 UpM, 20 min, 4 °C) pelletiert, mit Ethanol (80%) gewaschen und getrocknet.

### ***Bestimmung der mRNA-Menge durch Northern Blot Analyse***

Die angegebenen Mengen an Gesamt-RNA oder polyA<sup>+</sup> RNA wurden im Vakuum-Konzentrator eingetrocknet und in Denaturierungspuffer (21% deionisierte Glyoxallösung, 73% DMSO, 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.9) aufgenommen. Die Proben wurden für 8 min bei 50 °C inkubiert und danach für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1/6 Volumen RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4% Bromphenolblau, 0.5 µg/µl Ethidiumbromid) wurden die Proben in einem 1.4%iges Agarosegel in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.9 in einer horizontalen Gelkammer aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 2-3 h bei 75V und RT, bis die Bromphenolblaufront ca. 9 cm weit gewandert war. Während der Elektrophorese wurde der Laufpuffer zwischen Anode und Kathode zirkuliert.

Anschließend wurde die aufgetrennte RNA mittels Kapillarblot (Transferpuffer 20x SSC) auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran übertragen. Nach erfolgtem Transfer (12-16h) wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 2400-Autocrosslink-Modus) fixiert und die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (Prähybridisierung), wurde die Membran für mindestens 1 h im Plastikbeutel mit 20 ml Hybridisierungslösung (6x SSC, 5x Denhardt's Lösung, 0.5% SDS, 100 µg/ml Sperma-DNA aus Hering) bei 65 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Probe wurde diese denaturiert (5 min bei 95 °C) und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Probe (2x 10<sup>6</sup> cpm/ml) in die auf 5 ml reduzierte Hybridisierungslösung im Plastikbeutel pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte für 12-16 h unter Schütteln bei 65 °C. Überschüssige Probe wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Puffern sinkender Salzkonzentration entfernt (zweimal je 15 min mit 2 x SSC, 0.1% SDS; einmal 30 min mit 1 x SSC, 0.1% SDS; einmal 15 min mit 0.5 x SSC, 0.1% SDS). Die noch feuchte Membran wurde wieder in einen Plastikbeutel eingeschweißt und die radioaktiven Signale durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur Hybridisierung mit anderen Proben wurde die Membran für 15 min in 0.1% SDS in H<sub>2</sub>O bei 95 °C inkubiert und einer erneuten Prähybridisierung unterzogen.



### ***RNase-Protektionsanalyse***

#### **A. Präparation von $^{32}\text{P}$ -markierten Riboproben durch *in vitro* Transkription**

Als Matrize für die *in vitro* Transkription dienten linearisierte Plasmide, bei denen in umgekehrter Orientierung Gen-Fragmente (*c-jun*, MT IIa, Kollagenase I, CAT; Angel et al., 1987a; P. Angel, unveröffentlicht) von einem SP6-Bakteriophagen-Promotor aus transkribiert werden können. Zur Synthese der *antisense* RNA-Probe wurden 6  $\mu\text{l}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -CTP, 4  $\mu\text{l}$  5x SP6-Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Spermidin), 2  $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4  $\mu\text{l}$  NTP-Lösung (2.5 mM ATP; 2.5 mM UTP; 2.5 mM GTP), 1  $\mu\text{l}$  250  $\mu\text{M}$  CTP, 1  $\mu\text{l}$  RNasin, 1  $\mu\text{l}$  Matrizen-DNA (500 ng/ $\mu\text{l}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  SP6-RNA-Polymerase (50 U/ $\mu\text{l}$ ) gemischt und für 60 min bei 40 °C inkubiert. Zur Entfernung der Matrizen-DNA wurden der Reaktion 5  $\mu\text{l}$  10x DNase-Puffer (500 mM Tris pH 7.5, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 24  $\mu\text{l}$  Wasser und 1  $\mu\text{l}$  RNase-freie DNase I (1 U/ $\mu\text{l}$ ) zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{g}$  Hefe-tRNA, 150  $\mu\text{l}$  4 M Ammoniumacetat (4 M) und 200  $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben und Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen, mit Ethanol präzipitiert, gewaschen (70% Ethanol) und getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 40  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und 1  $\mu\text{l}$  davon im Scintillationsmeßgerät gemessen. 1  $\mu\text{l}$  der Probe hatte im allgemeinen eine Aktivität von ca.  $2 \times 10^6$  cpm.

#### **B. Hybridisierung der radioaktiv markierten Riboproben mit Gesamt-RNA**

20  $\mu\text{g}$  Gesamtzell-RNA wurden zur Entfernung von eventuell noch vorhandenen DNA-Spuren mit DNase I behandelt. Dazu wurden der RNA-Lösung 5  $\mu\text{l}$  10x DNase-Puffer, 1  $\mu\text{l}$  DNase I und 1  $\mu\text{l}$  RNasin zugesetzt, der Ansatz mit Wasser auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde mit Ethanol präzipitiert und das gewaschene Pellet im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer (80% Formamid, 20% 2 M NaCl, 200 mM PIPES pH 6.4; 5 mM EDTA) aufgenommen, der  $1 \times 10^6$  cpm Riboprobe enthielt. Die Ansätze wurden 5 min bei 85 °C denaturiert und zur Hybridisierungsreaktion für 12-16 h bei 45°C inkubiert. Dannach wurden die Hybridisierungsansätze mit 300  $\mu\text{l}$  RNase-Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaAcetat pH 7.0, 5 mM EDTA, 600 U/ml RNase T1, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A) gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Verdaureaktion wurde mit 3.2  $\mu\text{l}$  SDS (20%) gestoppt, mit 2.5  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 5  $\mu\text{g}$  Hefe-tRNA wurde mit Ethanol präzipitiert und mit Ethanol (70%) gewaschen. Die Proben wurden im Vakuum-Konzentrator getrocknet, das Pellet in 4  $\mu\text{l}$  Formamid-Ladepuffer (80% Formamid, 1 mM EDTA, 0.02% Bromphenolblau, 0.02% Xylencyanol) gelöst und in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 5000 cpm endmarkierter puc9/Hae3-Marker verwendet. Das getrocknete Gel wurde bei -80 °C unter Verwendung einer Verstärkerfolie autoradiographiert.

### ***Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität ("CAT-Assay")***

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Gummispatel in 1 ml PBS abgeschabt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 5

min bei 6000 UpM abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100  $\mu$ l 0.25 M Tris pH 7.8 resuspendiert. Durch dreimaliges Schockfrieren (flüssiger Stickstoff) und Auftauen bei 37 °C wurden die Zellen aufgebrochen und anschließend die Zell-trümmer abzentrifugiert (10 min, 13000 UpM). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 5  $\mu$ l des Zellextrakts für die Proteinbestimmung verwendet.

Die spezifische Enzymaktivität wurde bestimmt, indem gleiche Mengen an Protein in 80  $\mu$ l 0.25 M Tris pH 7.8 mit 2  $\mu$ l  $^{14}$ C-Chloramphenicol (Substrat) und 20  $\mu$ l 4 mM Acetyl-Coenzym-A (Acetylgruppen-Donor) gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert wurden. Durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat wurde die Reaktion gestoppt und das Chloramphenicol und seine acetylierten Produkte durch starkes Mischen aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (5 min, 13000 UpM) getrennt und die Ethylacetat-Phase abgenommen. Das Ethylacetat wurde im Vakuumkonzentrator eingetrocknet, das Pellet in 20  $\mu$ l Ethylacetat aufgenommen und punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch aufsteigende Chromatographie in 150 ml Chloroform/Methanol (9:1). Nach ca. 45 min wurde die DC-Platte getrocknet, ein Röntgenfilm aufgelegt und bei RT exponiert.

Nach Entwicklung des Films konnten die Signale auf dem Röntgenfilm den Positionen der acetylierten Formen des Chloramphenicols auf den DC-Platten zugeordnet werden. Das nicht-acetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am langsamsten. Die 1'-acetylierte, 3'-acetylierten und die 1',3'-diacetylierten Formen sind polarer und laufen deshalb höher. Durch Quantifizierung des acetylierten und nicht-acetylierten Anteils des Chloramphenicols konnte die Aktivität des CAT-Enzyms berechnet werden.

### ***In vivo footprint-Analyse durch Ligations-vermittelte PCR (Mueller und Wold, 1989)***

A. *In vivo* Methylierung von DNA durch Dimethylsulfat (DMS) in lebenden Zellen und Präparation genomischer DNA

Die Zellen von zwei Gewebekulturschalen ( $\varnothing$  14cm) pro Meßpunkt wurden einmal mit warmen PBS gewaschen und für 2 min mit 0.5% DMS in DMEM/10 mM HEPES-KOH pH 7.5 bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 5 ml Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.7, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% SDS) lysiert und das Lysat mit 300  $\mu$ g/ml Proteinase K bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Lysat wurde Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert, gewaschen (Ethanol 70 %) und getrocknet.

B. *In vitro* Methylierung von deproteiniertes genomischer DNA (nach Maxam und Gilbert, 1980)

100-200  $\mu$ g genomische DNA aus unbehandelten Zellen wurden in 200  $\mu$ l Cacodylat-Puffer (50 mM Na-Cacodylat, 1 mM EDTA pH 8.0) aufgenommen. Die Methylierung erfolgte durch Zugabe von 1  $\mu$ l DMS bei RT und wurde nach 30 sec mit 50  $\mu$ l Stopplösung (1.5 M Na-Acetat pH 7.0, 1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) beendet. Die DNA wurde mit 750  $\mu$ l eiskaltem Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Das Präzipitat wurde in 250  $\mu$ l 0.3 M Na-Acetat pH 7,0 aufgenommen, nochmals mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet.

### C. Piperidin-Spaltung von *in vivo* und *in vitro* methylierter genomischer DNA (Maxam und Gilbert, 1980)

Die getrocknete DNA wurde in 100  $\mu$ l 10%igem Piperidin gelöst und für 30 min bei 90 °C (in verschraubbaren Eppendorfgläsern, da Piperidin bei hohen Temperaturen leicht flüchtig ist) inkubiert. Nach dem Abkühlen der Reaktionen auf Eis wurden 200  $\mu$ l 0.3 M Na-Acetat pH 7.0 zugegeben und die DNA mit 900  $\mu$ l Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde 2x mit 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in Wasser resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

### D. Selektive Amplifikation und radioaktive Markierung von Piperidin-Spaltprodukten

Für die Erststrangsynthese wurden 3-15  $\mu$ g Piperidin-behandelte genomische DNA und 0.6 pmol Primer 1 in 15  $\mu$ l 40 mM Tris-HCl pH 7.7 und 50 mM NaCl für 3 min bei 95 °C denaturiert und danach zur Hybridisierung des Primers für 30 min bei 45 °C inkubiert. Danach wurden 8.8  $\mu$ l Sequenase-Mischung (20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 200  $\mu$ M dNTPs 13U/ $\mu$ l Sequenase Version 2.0) zugegeben, durch Pipettieren gemischt und die Reaktionen weitere 15 min bei 45 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 6  $\mu$ l 310 mM Tris-HCl pH 7.7 zugegeben und die Ansätze 15 min bei 67 °C inkubiert, um die Sequenase zu inaktivieren.

Für die Ligation des Linker-Oligonukleotids wurden die Proben auf Eis gestellt und 20  $\mu$ l Verdünnungspuffer (17.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 42.3 mM DTT, 125  $\mu$ g/ml BSA) sowie 25  $\mu$ l Ligationspuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 3 mM ATP, 50  $\mu$ g/ml BSA), 5  $\mu$ l hybridisiertes Linker-Oligonukleotid (20 pmol/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (10 U/ $\mu$ l) zugegeben. Diese Ansätze wurden bei 15 °C für 3-15 h inkubiert.

Nach der Ligation wurden die Reaktionen in Gegenwart von 10  $\mu$ g t-RNA mit Ethanol präzipitiert und mit 80% Ethanol gewaschen. Für die PCR-Reaktionen wurden die getrockneten Präzipitate in 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. Zu der DNA-Lösung wurden 20  $\mu$ l 5x Taq-Puffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Gelatine), 5  $\mu$ l Primer 2 (2 pmol/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l des 25mer Linker-Oligonukleotids (2 pmol/ $\mu$ l), 8  $\mu$ l eines dNTP-Mix (Konzentration jedes dNTPs 2.5 mM) und 1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) zugegeben und gemischt. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus 1 min Denaturierung bei 94 °C, 2 min Hybridisierung bei 63 °C und 3 min Kettenverlängerung bei 75 °C. Diese Inkubationen wurden 20x wiederholt. Die Proben wurden danach auf Eis abgekühlt und jeweils 2 pmol <sup>32</sup>P-endmarkierter Primer 3 (2-5 x 10<sup>6</sup> cpm), 5 U Taq-DNA-Polymerase und 2  $\mu$ l 2.5 mM dNTP-Mix zugegeben. Die Reaktionen wurden dann für 2 min bei 95 °C, 2 min bei 66 °C und 10 min bei 75 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend durch Abschrecken in Eiswasser gestoppt. Nach Zugabe von 295  $\mu$ l Stopplösung (260 mM Na-Acetat, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM EDTA pH 8.0) wurden die Reaktionen mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert, gewaschen (Ethanol 70%) und getrocknet. Die Proben wurden in 6  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer (80% Formamid, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.02% Bromphenolblau, 0.02% Xylencyanol) gelöst und 2.5  $\mu$ l davon in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (1500 V, ca. 3 h). Die Autoradiographie erfolgte bei -80 °C mit Verstärkerfolie.

### ***Gelretardations-Analyse***

Die DNA-Bindungsreaktionen wurden in einem Ansatzvolumen von 20  $\mu$ l durchgeführt. Dazu wurden 2-10  $\mu$ g Gesamt-Proteinextrakt in Reaktionspuffer (f.c.; 5% Glycerin, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g poly(dI-dC), 1  $\mu$ g BSA) für 30 min bei RT mit 25 fmol radioaktiv markierter Oligonukleotid-DNA (ca. 50000 cpm) inkubiert. Wurden in der Gelretardations-Analyse Antikörper verwendet, so wurden diese zunächst mit Gesamt-Proteinextrakt für 2 h auf Eis vorinkubiert und anschließend die Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze über ein nicht-denaturierendes 4%iges Polyacrylamidgel in Tris-Glycin-Puffer (190 mM Tris, 25 mM Glycin, 1 mM EDTA, 2.5% Glycerin) bei RT aufgetrennt (30 mA, ca 3 h). Als Laufpuffer wurde Tris-Glycin-Puffer ohne Glycerin verwendet. Vor Probenauftrag wurde das Gel mit 30 mA für 30 min vorlaufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf 3MM-Papier abgezogen, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

### ***Zellkultur***

#### **A. Trypsinieren und Passagieren von Zellen**

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gespült und mit 0.25% Trypsin (1 ml pro 9cm bzw. 2 ml pro 14cm Gewebekulturschale) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden in 5-10 ml Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 1500 UpM, 3 min, RT). Das Sediment wurde in frischem Medium aufgenommen, gut suspendiert und die Zellen in der gewünschten Verdünnung ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer eingesetzt.

#### **B. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsinisiert, abzentrifugiert und in eiskaltem Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO resuspendiert (ca. 1-5x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml) und auf Einfrier-Ampullen verteilt. Diese wurden zunächst 1 h auf Eis inkubiert, dann in einem Styropor-Behälter für 3 Tage bei -80 °C aufbewahrt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium (37 °C) resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in frischem Medium aufgenommen und ausgesät.

### ***Transiente Transfektion von Zellen***

Kalziumphosphat Methode (Graham und van der Eb, 1973; modifiziert nach Chen und Okayama, 1987)

GM637 und NIH 3T3 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von 1x10<sup>6</sup> pro Zellkulturschale (Ø 9cm, 10 ml Medium) ausgesät. Ein Transfektionsgemisch aus Plasmid-DNA in 250 mM CaCl<sub>2</sub> wurde unter vorsichtigem Schütteln tropfenweise in ein Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen an 2x BBS-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM BES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6.95 mit NaOH bei RT eingestellt) pipettiert. Für die Transfektion von NIH 3T3 wurde 2x HBS-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.05 mit NaOH bei RT

eingestellt) verwendet. Das Calciumphosphat/DNA-Präzipitat bildete sich während einer 30 minütigen Inkubation bei RT und wurde anschließend tropfenweise in das Zellkulturmedium verteilt. Die Zellen wurden für 12 bis 16 h im Brutschrank bei 35 °C und 3% CO<sub>2</sub> (GM637) oder 37 °C und 6% CO<sub>2</sub> (NIH 3T3) inkubiert, danach das Präzipitat durch Waschen mit PBS (37 °C) entfernt und frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin unter Standardbedingungen (37 °C, 6% CO<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Im Falle von NIH 3T3 Zellen wurde nach dem Absaugen des Präzipitats ein Glycerinschock durchgeführt, indem die Zellen für 2 min mit 15% Glycerin in PBS behandelt wurden. ROS 17/2.8 Zellen wurden in gleicher Weise wie NIH 3T3, mit Ausnahme des Glycerinschocks, transient transfiziert.

### ***Stabile Transfektion***

GM637 Zellen wurden entsprechend dem Protokoll für transiente Transfektionen pro Petrischale (Ø 9cm) mit 10 µg der verschiedenen Expressionsplasmide (linearisiert) transfiziert. Nach dem Entfernen des Präzipitats wurden die Zellen zur Selektion stabiler Transfektanten in Medium mit G418 (800 µg/ml) kultiviert. Nach ca. 10-14 Tagen hatten sich ca. 50-100 G418-resistente Kolonien gebildet. Pro Ansatz wurden 20-30 Einzelklone isoliert und vermehrt.

### ***Ernten retroviraler Zellkulturüberstände und transiente Infektion von Zellen***

Produzentenzelllinien für Retroviren (pMVcFos und pMV-0; Superti-Furga et al., 1991) wurden in Gewebekulturschalen (Ø 14cm) mit 20 ml Medium zu ca. 50 % Konfluenz ausgesät. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und zentrifugiert (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 4000 UpM, 10 min, RT). Der Überstand wurde in Gegenwart von Polybren (8 µg/ml) auf die zu infizierenden Zellen (logarithmisch wachsend) gegeben. Nach 2 h wurden die Zellen in gleicher Weise mit frischen Überständen der Produzentenzelllinien versetzt. Der Vorgang wurde nach weiteren 2 h wiederholt und die Zellen in diesem Medium für 20 h bis zur Ernte weiterkultiviert.

### ***Behandlung von Zellen***

Die Behandlung von Zellen mit Phorbolster-Tumorpromotoren, Wachstumsfaktoren, Cytokinen bzw. Actinomycin D erfolgte durch Verdünnung von konzentrierten Stammlösungen in das Zellkulturmedium.

Zur UVC-Bestrahlung von Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, in einem sterilen Röhrchen aufbewahrt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Bestrahlung erfolgte ohne PBS mit einer UVC-Lampe (Maximalemission bei 256 nm, 15 W) und einer Dosis von 40 J/m<sup>2</sup>. Dazu wurde die Lampe in einem Abstand von 32 cm zur Kulturschale montiert und die Zellen für 21 sec bestrahlt. Anschließend wurde das ursprüngliche Kulturmedium zurückgegeben. Mit den Kontrollzellen wurde, abgesehen von der Bestrahlung, ebenso verfahren.

Zur  $\gamma$ -Bestrahlung wurde eine  $\text{Co}^{60}$ -Strahlungsquelle (Dosisleistung 4.8 Gy/min) verwendet. Die Behandlung der Zellen mit ionisierenden Strahlen konnte direkt im Zellkulturgefäß durchgeführt werden.

### ***Radioaktive Markierung von Zellen mit $^{35}\text{S}$ -Methionin***

Die Zellen, die in Kultur radioaktiv markiert werden sollten, wurden mit 37 °C warmen PBS gewaschen (2x). Anschließend wurde ein möglichst geringes Volumen an Markierungsmedium (Methionin defizientes RPMI + 0.4 mM L-Leuzin + 0.4 mM L-Lysin-HCl + 2 mM Glutamin + 0.5% FCS) auf die Zellen gegeben, um eine hohe Konzentration an Isotop zu erzielen. Dem Medium wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin (7.4 MBq/ml) zugesetzt und die Zellen für 3 h im Brutschrank des Isotopenlabors (6%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) inkubiert. Um flüchtige, radioaktive Abbauprodukte des Methionins zu binden, wurden die Zellkulturschalen auf ein Aktivkohlbett gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Markierungsmedium mit sezernierten Proteinen abgenommen und für 10 min (RT) bei 13000 Upm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit TCA (12.5 % f.c.) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min (RT) bei 13000 Upm (Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Ethanol (80%) gewaschen, getrocknet und für die SDS-PAGE eingesetzt.

### ***Überlebenskurven nach $\gamma$ -Bestrahlung***

24 h vor der  $\gamma$ -Bestrahlung wurden für jeden Dosis-Wert 300 Zellen in 3cm-Kulturschalen (doppelte Ansätze) ausgesät. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 12 Tage weiterkultiviert, wobei alle 3 Tage das Kulturmedium erneuert wurde. Danach wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gespült und die aus Einzelzellen entstandenen Kolonien mit Ethanol bedeckt. Nach 15 min waren die Kolonien fixiert und wurden mit einer Färbe-Lösung (0.5% Kristallviolett, 5% Giemsa; in Wasser) angefärbt (15 min). Nach Abnahme der Färbelösung wurden die Kulturgefäße mehrmals mit Wasser gespült und über Nacht getrocknet. Die Überlebensrate wurde ermittelt aus dem Quotient der gezählten Kolonien eines Bestrahlungswertes zur Kolonienzahl der unbestrahlten Kontrolle.

### ***Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese nach UV-Bestrahlung (UDS)***

Zur Bestimmung der UDS wurden die Zellen mit einer Dichte von 2000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf 2-Kammer-Objektträger (chamber slides) ausplattiert und für 36 h kultiviert. Die Zellen wurden danach mit PBS gewaschen und UVC-bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 2 h mit Medium inkubiert, das 10  $\mu\text{Ci/ml}$  Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin, 1  $\mu\text{M}$  Fluordesoxyuridin 10% FCS (dialysiert gegen PBS) enthielt. Nach der zweistündigen Markierungsperiode wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min in Bouin's Fixierlösung (15 Teile gesättigte Pikrinsäure, 5 Teile 37%iges Formaldehyd, 1 Teil Eisessig) fixiert. Die Präparate wurden dann bis zur vollständigen Entfernung der durch die Fixierlösung verursachten

Gelbfärbung mit Wasser (2x) und Ethanol (je 1x mit 70%, 80%, 90% und 3x mit 100% Ethanol) gewaschen und luftgetrocknet.

Danach wurden die Präparate mit einer Photoemulsion (EM-1, Amersham) beschichtet. Dazu wurde die Photoemulsion in der Dunkelkammer in einem Wasserbad auf 42 °C erwärmt und die Objektträger nacheinander durch vorsichtiges Eintauchen gleichmäßig mit der Emulsion beschichtet. Anschließend wurden die Objektträger im Dunkeln 2 h getrocknet, dann lichtdicht verpackt und für 8 Tage bei 4 °C exponiert.

Nach Ablauf der Expositionsdauer wurden die Objektträger in folgenden Lösungen entwickelt: 16% Kodak D-19 Entwickler (3 min), 1% Eisessig (1 min), 30% Natriumthiosulfat (3 min) und Wasser (2x 10 min, 1x 30min). Die Präparate wurden getrocknet, für 2 min mit 5 % Giemsa (in 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gefärbt und 2 min gewässert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit einem Deckglas versehen und im Axioskop-Mikroskop im Hellfeld analysiert.

Zur quantitativen Auswertung der UDS-Aktivität wurde ein automatisches Bildverarbeitungssystem verwendet. Mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Videokamera (Sony CCD/RGB) wurden zunächst Bilder der Präparate bei 300-facher Vergrößerung an den Computer übertragen. Die darauf sichtbaren Zellkerne wurden nachfolgend durch entsprechende Software (Colourmorph Version 4.2, Perceptive Instruments) am Bildschirm markiert und dadurch deren Schwärzung (verursacht durch den Einbau von radioaktivem Thymidin infolge UV-induzierter UDS) in relativen Grauwerten ermittelt. Dabei wurden nur Zellkerne, die sich eindeutig nicht in der S-Phase befanden, ausgewertet (leicht unterscheidbar von schwarzen S-Phase Kernen).

## **LITERATUR**

Abate, C., Patel, L., Rauscher III, F. J. und Curran, T. (1990). Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science* **249**: 1157-1161.

Abate, C., Luk, D. und Curran, T. (1991). Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: Interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3624-3632.

Abdel-Hafiz, H. A.-M., Heasley, L. E., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Kroll, D. J., Johnson, G. L. und Hoeffler, J. P. (1992). Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol. Endocrinol.* **6**: 2079-2089.

Angel, P., Pötting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Schorpp, M. und Herrlich, P. (1986). Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1760-1766.

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. J., 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.

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.* **213**: 131-138.

Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1991). IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* **64**: 983-993.



- Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1992). AP-1 (Fos-Jun) regulation by IP-1: effect of signal transduction pathways and cell growth. *Oncogene* **7**: 2271-2280.
- Bannister, A. J., Oehler T., Wilhelm D., Angel P. und Kouzarides T. (1995). Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CPB induced stimulation *in vivo* and CBP binding *in vitro*. *Oncogene* **11**: 2509-2514.
- Bargonetti, J., Manfredi, J. J., Chen, X. B., Marshak, D. R. und Prives, C. (1993). A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* **7**: 2565-2574.
- Benbrook, D. M. und Jones, N. C. (1990). Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**: 295-302.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscot, S. J., Weintraub, H. und Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* **68**: 507-519.
- Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., Wrighton, C. und Busslinger, M. (1995). Transcriptional activation of the *fra-1* gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3748-3758.
- 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.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. und Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**: 1386-1392.
- Boise, L. H., Petryniak, B., Mao, X., June, C. H., Wang, C.-Y., Lindstein, T., Bravo, R., Kovary, K., Leiden, J. M. und Thompson, C. B. (1993). The NFAT-1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1911-1919.
- Bos, T. J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R. und Vogt, P. K. (1988). v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell* **52**: 705-712.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H. K., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M. und Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* **64**: 573-584.
- Breathnach, R., Matrisian, L. M., Gesnel, M.-C., Staub, A. und Leroy, P. (1987). Sequence coding for part of oncogene-induced transin are highly conserved in a related rat gene. *Nucl. Acids Res.* **15**: 1139-1151.
- 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.

- Brüsselbach, S., Möhle-Steinlein, U., Wang, Z.-Q., Schreiber, M., Lucibello, F. C., Müller, R. und Wagner, E. F. (1995). Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene* **10**: 79-86.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**: 376-381.
- Busslinger M. und Bergers G. (1994). Identification of AP-1-regulated genes. In: "The Fos and Jun families of Transcription Factors". Angel P. und Herrlich P. (Eds.), CRC-Press, Inc., 133-150.
- 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.
- Carr, A. M. und Hoekstra, M. F. (1995). The cellular responses to DNA damage. *Trends in cell biology* **5**: 32-40.
- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.-X. und Karin, M. (1995). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* **14**: 5957-5964.
- Chatton, B., Bocco, J. L., Goetz, J., Gaire, M., Lutz, Y. und Kedinger, C. (1994). Jun and Fos heterodimerize with ATFa, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene* **9**: 375-385.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2745-2752.
- Chiu, R., Angel, P. und Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, cJun. *Cell* **59**: 979-986.
- Cho, Y. J., Gorina, S., Jeffrey, P. D. und Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**: 346-355.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol/chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Cohen, D. R., Ferreira, P. C. P., Gentz, R., Franza Jr., B. R. und Curran, T. (1989). The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.* **3**: 173-184.
- de Groot, R., Auwerx, J., Bourouis, M. und Sassone-Corsi, P. (1992). Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the Drosophila kinase shaggy. *Oncogene* **7**: 841-847.
- Del Sal, G. und Schneider, C. (1987). A simple and fast method for preparing single stranded DNA template suitable for sequencing. *Nucl. Acids Res.* **15**: 10047.

Deng, T. und Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* **7**: 479-490.

Deng, T. und Karin, M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* **371**: 171-175.

Dérijard, 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.

Deutsch, P. J., Hoeffler, J. P., Jameson, J. L. und Habener, J. F. (1988). Cyclic AMP and phorbol ester-stimulated transcription mediated by similar DNA elements that bind distinct proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7922-7926.

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.

Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K. und Yamamoto, K. R. (1990). Transcription factor interactions: Selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* **249**: 1266-1272.

Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. und Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* **11**: 1475-1489.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.

Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K. und Karin, M. (1994). The UV response involving the ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* **77**: 381-390.

Fagarasan, M. O., Aiello, F., Muegge, K., Durum, S. und Axelrod, J. (1990). Interleukin 1 induces  $\beta$ -endorphin secretion via *Fos* and *Jun* in AtT-20 pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7871-7874.

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 glyceraldehyd-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.

- Frisch, S. M., Reich, R., Collier, I. E., Genrich, L. T., Martin, G. und Goldberg, G. I. (1990). Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene* **5**: 75-83.
- Frisch, S. M. und Ruley, H. E. (1987). Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* **262**: 16300-16304.
- Fritsche, M., Haessler, C. und Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **8**: 307-318.
- 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.
- Gentz, R., Rauscher III, F. J., Abate, C. und Curran, T. (1989). Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* **243**: 1695-1699.
- Ginsberg, D., Oren, M., Yaniv, M. und Piette, J. (1990). Protein-binding elements in the promotor region of the mouse p53 gene. *Oncogene* **5**: 1285-1290.
- Gius, D., Cao, X., Rauscher, F. J., Cohen, D. R., Curran, T. und Sukhatme, V. P. (1990). Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions: The C terminus represses immediate-early gene expression via CARG elements. *Mol Cell. Biol.* **10**: 4243-4255.
- Glover, J. N. und Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**: 257-261.
- 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 promotor when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6777-6781.
- Greenberg, M. E. und Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* **311**: 433-438.
- Grigoriadis, A. E., Wang, Z.-Q., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H. A. und Wagner, E. F. (1994). C-Fos: A key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**: 443-448.
- Gruda, M. C., Kovary, K., Metz, R. und Bravo, R. (1994). Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation *in vitro* by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene* **9**: 2537-2547.
- Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B. und Davis, R. J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**: 389-393.

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.

Hai, T. und Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 3720-3724.

Halazonetis, T. D. und Kandil, A. N. (1993). Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J.* **12**: 5057-5064.

Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. und White, E. (1995). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* **10**: 461-477.

Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Rüther, U., Wagner, E. F. und Thoenen, H. (1990). Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3899-3903.

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.

Herr, I. (1995). Mechanismen der Transkriptionskontrolle des Proto-Onkogens c-jun. Dissertation am Institut für Genetik (Forschungszentrum Karlsruhe), ISSN 0947-8620, FZKA 5566 B.

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. 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.

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 Dev.* **7**: 2135-2148.

Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. und Wagner, E. F. (1993). c-Jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**: 179-181.

Hirai, S.-I., Bourachot, B. und Yaniv, M. (1990). Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* **5**: 39-46.

- Hirai, S.-I., Ryseck, R.-P., Mehta, F., Bravo, R. und Yaniv, M. (1989). Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* **8**: 1433-1439.
- Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, U., Zimmer, S. G., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R. B., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993). A link between RAS and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res.* **53**: 1516-1521.
- 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.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53.
- Holt, J. T., Venkat Gopal, T., Moulton, A. D. und Nienhus, A. W. (1986). Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4794-4798.
- Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, E., Johnson, R. und Spiegelman, B. M. (1994). Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J.* **13**: 3094-3103.
- Huhtala, P., Tuuttila, A., Chow, L. T., Lohi, J., Keski-Oja, J. und Tryggvason, K. (1991). Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* **266**: 16485-16490.
- Ito, E., Sweterlitsch, L. A., Tran, P. B.-V., Rauscher, F. J. und Narayanan, R. (1990). Inhibition of PC-12 cell differentiation by the immediate early gene *fra-1*. *Oncogene* **5**: 1755-1760.
- Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. und Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* **71**: 577-586.
- Johnson, R. S., van Lingen, B., Papaioannou, V. E. und Spiegelman, B. M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* **7**: 1309.
- 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.
- 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.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**: 6304-6311.

Kastan, M. B., Zhan, Q., El Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. und Fornace Jr, A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* **71**: 587-597.

Kelley, S. L., Basu, A., Teicher, B. A., Hacker, M. P., Hamer, D. H. und Lazo, J. S. (1988). Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* **241**: 1813-1815.

Kerr, L. D., Holt, J. T. und Matrisian, L. M. (1988). Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science* **242**: 1424-1427.

Kerr, L. D., Miller, D. B. und Matrisian, L. M. (1990). TGF- $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a fos binding sequence. *Cell* **61**: 267-278.

Keyse, S. M. (1993). The induction of gene expression in mammalian cells by radiation. *Seminars in Cancer Biology* **4**: 119-128.

Kim, S.-J., Lafyatis, R., Kim, K. Y., Angel, P., Fujiki, H., Karin, M., Sporn, M. B. und Roberts, A. B. (1990). Regulation of collagenase gene expression by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Cell Regulation* **1**: 269-278.

Kochevar, I. (1990). UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochem. Photobiol.* **52**: 795-800.

Korsmeyer, S. J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* **80**: 879-886.

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. *Nucl. Acids Res.* **19**: 3607-3611.

König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1992). Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J.* **11**: 2241-2246.

Kouzarides, T. und Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* **336**: 646-651.

Kovary, K. und Bravo, R. (1991a). Expression of different Jun and Fos proteins during the G<sub>0</sub>-to-G<sub>1</sub> transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2451-2459.

Kovary, K. und Bravo, R. (1991b). The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4466-4472.

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.

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 cJun kinases. *Nature* **369**: 156.

Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. und Verma, I. M. (1988). Induction of proto-oncogene Jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature* **334**: 629-631.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.

Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. und Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* **325**: 368-372.

Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.

Lehman, A. R. (1982). The cellular and molecular responses of ataxia telangiectasia cells to DNA damage. In: "Ataxia-Telangiectasia". Bridges, B.A. and Harnden, D.G. (Eds.), John Wiley, New York 83-102.

Li, L., Chambard, J.-C., Karin, M. und Olson, E. (1992). Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: The amino terminus of Jun can mediate repression. *Genes Dev.* **6**: 676-689.

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.

Livingstone, C., Patel, G. und Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**: 1785-1797.

Lucibello, F. C., neuberg M., Jenuwein, T. und Müller R. (1991). Multiple regions of v-Fos protein involved in the activation of AP-1 dependent transcription: Is trans-activation crucial for transformation? *New Biol.* **3**: 671-6

Maltzman, W. und Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1689-1694.

Masure, S., Nys, G., Fiten, P., van Damme, J. und Opdenakker, G. (1993). Mouse gelatinase B cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophages and gene organisation. *Eur. J. Biochem.* **218**: 129-141.

Matsui, M. S. und De Leo, V. A. (1990). Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* **11**: 229-234.



Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavage. *Meth. Enzymol.* **65**: 499-560.

Mechta F. und Yaniv M. (1994). Structure and Regulation of the *c-jun* Promotor. In: "*The Fos and Jun families of Transcription Factors*". Angel P. und Herrlich P. (Eds.), CRC-Press, Inc., 115-129.

Medcalf, R. L., Rüegg, M. und Schleuning, W.-D. (1990). A DNA motif related to the cAMP-responsive element and an exon-located activator protein-2 binding site in the human tissue-type plasminogen activator gene promoter cooperate in basal expression and convey activation by phorbol esters and cAMP. *J. Biol. Chem.* **265**: 14618-14626.

Mermoud, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J. und Tijan, R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* **58**: 741-753.

Miner, J. N. und Yamamoto, K. R. (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev.* **6**: 2491-2501.

Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M. und Reed, J. C. (1994a). Identification of a p53-dependent negative response element in the *bcl-2* gene. *Cancer Res.* **54**: 3131-3135.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. und Reed, J. C. (1994b). Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799-1805.

Miyashita, T. und Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* **80**: 293-299.

Morgan, I. M., Asano, M., Havarstein, L. S., Ishikawa, H., Hiiragi, T., Ito, Y. und Vogt, P. K. (1993). Amino acid substitutions modulate the effect of Jun on transformation, transcriptional activation and DNA replication. *Oncogene* **8**: 1135-1140.

Mueller, P. R. und Wold, B. (1989). In vivo Footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246**: 780-786.

Müller, R. und Wagner, E. F. (1984). Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of *c-fos* proto-oncogenes. *Nature* **311**: 438-442.

Mumberg, D., Lucibello, F. C., Schuermann, M. und Müller, R. (1991). Alternative splicing of *fosB* transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes Dev.* **5**: 1212-1223.

Nakabeppu, Y. und Nathans, D. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* **64**: 751-759.

- Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F. und Johnsen, M. (1991). Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* **6**: 1583-1592.
- Neuberg, M., Adamkiewicz, J., Hunter, J. B. und Müller, R. (1989). A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site. *Nature* **341**: 243-245.
- Nikolakaki, E., Coffey, P. J., Hemelsoet, R., Woodgett, J. R. und Defize, L. H. K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells. *Oncogene* **8**: 833-840.
- 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.
- Nordheim A., Janknecht R. und Hipskind R.A. (1994). Transcriptional Regulation of the Human c-fos Proto-Oncogene. In: "*The Fos and Jun families of Transcription Factors*". Angel P. und Herrlich P. (Eds.), CRC-Press, Inc., 97-113.
- Oehler, T. und Angel, P. (1992). A common intermediary factor (p52/54) recognizing "acidic-blob"-type domains is required for transcriptional activation by the Jun proteins. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5508-5515.
- Oehler, T., Pintzas, A., Stumm, S., Darling, A., Gillespie, D. und Angel, P. (1993). Mutation of a phosphorylation site in the DNA binding domain is required for redox-independent transactivation of AP1-dependent genes by v-Jun. *Oncogene* **8**: 1141-1147.
- Offringa, R., Smits, A. M. M., Houweling, A., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1988). Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucl. Acids Res.* **16**: 10973-10984.
- Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**: 527-538.
- Okuno, H., Suzuki, T., Yoshida, T., Hashimoto, Y., Curran, T. und Iba, H. (1991). Inhibition of *jun* transformation by a mutated *fos* gene: design of an anti-oncogene. *Oncogene* **6**: 1491-1497.
- Okuno, H., Akahori, A., Sato, H., Xanthoudakis, S., Curran, T. und Iba, H. (1993). Escape from redox regulation enhances the transforming activity of Fos. *Oncogene* **8**: 695-701.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R. und Kim, P. S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**: 538-542.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford III, W. F. und Kim, P. S. (1989). Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* **245**: 646-648.

O'Shea, E., Rutkowski, R. und Kim, P. S. (1992). Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* **68**: 699-708.

Pavletich, N. P., Chambers, K. A. und Pabo, C. O. (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the 4 conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* **7**: 2556-2564.

Pertovaara, L., Sistonen, L., Bos, T. J., Vogt, P. K., Keski-Oja, J. und Alitalo, K. (1989). Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor  $\beta$  stimulation. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1255-1262.

Price, P. A. und Baukol, S. A. (1980). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **225**: 11660-11663.

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.

Pulverer, B. J., Hughes, K., Franklin, C. C., Kraft, A. S., Leever, S. J. und Woodgett, J. R. (1993). Co-purification of mitogen-activated protein kinases with phorbol ester-induced c-Jun kinase activity in U937 leukaemic cells. *Oncogene* **8**: 407-415.

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

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.

Rainegaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. und Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **270**: 7420-7426.

Rauscher III, F. J., Cohen, D. R., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. und Franza Jr., B. R. (1988a). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**: 1010-1016.

Rauscher III, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. und Spiegelman, B. M. (1988b). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* **52**: 471-480.

Reponen, P., Sahlberg, C., Huhtala, P., Hurskainen, T., Thesleff, I. und Tryggvason, K. (1992). Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J. Biol. Chem.* **267**: 7856-7862.

Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I. und Tryggvason, K. (1994). High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclasts lineage during mouse development. *J. Cell Biol.* **124**: 1091-1102.

- Riabowol, K. T., Schiff, J. und Gilman, M. Z. (1992). Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 157-161.
- Riabowol, K. T., Vosatka, R. J., Ziff, E. B., Lamb, N. J. und Feramisco, J. R. (1988). Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 1670-1676.
- Rozek, D. und Pfeifer, G. P. (1993). In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5490-5499.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuern, E. und Nathans, D. (1989). Jun-D: a third member of the Jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 1500-1503.
- Ryseck, R.-P., Hirai, S. I., Yaniv, M. und Bravo, R. (1988). Transcriptional activation of c-jun during the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> transition in mouse fibroblasts. *Nature* **334**: 535-537.
- Ryseck, R. P. und Bravo, R. (1991). cJun, JunB and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* **6**: 533-542.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* **78**: 963-972.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C. und Verma, I. M. (1988a). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* **334**: 314-319.
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L. J., Lamph, W. W. und Verma, I. M. (1988b). Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the "leucine zipper" domain. *Nature* **336**: 692-695.
- Schreiber M., Baumann B., Cotten M., Angel P. und Wagner E. F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* **14**: 5338-5349.
- Sato, H., Kita, M. und Seiki, M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa Type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous retinoblastoma control elements. *J. Biol. Chem.* **268**: 23460-23468.
- Sato, H. und Seiki, M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8**: 395-405.
- Scanlon, K. J., Jiao, L., Funato, T., Wang, W., Tone, T., Rossi, J. J. und Kashani-Sabet, M. (1991). Ribozyme-mediated cleavage of c-fos mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 10591-10595.

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.

Schorpp, M., Mattei, M.-G., Herr, I., Gack, S., Schaper, J. und Angel, P. (1995). Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene. *J. Biochem.* **308**: 211-217.

Schuermann, M., Hunter, J. B., Hennig, G. und Müller, R. (1991). Non-leucine residues in the leucine repeats of Fos and Jun contribute to the stability and determine the specificity of dimerization. *Nucl. Acids Res.* **19**: 739-746.

Schuermann, M. (1994). The Fos Family: Gene and Protein Structure, Homologies, and Differences. In: "*The Fos and Jun families of Transcription Factors*". Angel P. und Herrlich P. (Eds.), CRC-Press, Inc., 15-35.

Schüle, R., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Bolado, J., Pike, J. W. und Evans, R. M. (1990a). Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* **61**: 497-504.

Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M. und Evans, R. M. (1990b). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**: 1217-1226.

Schütte, J., Minna, J. D. und Birrer, M. J. (1989a). Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms Rat-1a cells as a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2257-2261.

Schütte, J., Viallet, J., Nau, M., Segal, S., Fedorko, J. und Minna, J. (1989b). jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**: 987-997.

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.

Sherman, M. L., Datta, R., Hallahan, D. E., Weichselbaum, R. R. und Kufe, D. W. (1990). Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 5663-5666.

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.

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.

Smith, M. L., Chen, I.-T., Zhan, Q., O'Connor, P. M. und Fornace, A. J. J. (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* **10**: 1053-1059.

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- $\kappa$ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* **12**: 3879-3891.

Superti-Furga, G., Bergers, G., Picard, D. und Busslinger, M. (1991). Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 5114-5118.

Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1992). Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev.* **6**: 1810-1819.

Suzuki, T., Okuno, H., Yoshida, T., Endo, T., Nishina, H. und Iba, H. (1991). Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucl. Acids Res.* **19**: 5537-5542.

Teurich, S. und Angel, P. (1995). The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem. Senses* **20**: 251-255.

Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.* **6**: 2711-2717.

Turner, R. und Tjian, R. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**: 1689-1694.

Unlap, T., Franklin, C. C., Wagner, F. und Kraft, A. S. (1992). Upstream regions of the c-jun promoter regulate phorbol ester-induced transcription in U937 leukemic cells. *Nucl. Acids Res.* **20**: 897-902.

van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1990). Differential effects of the adenovirus E1A oncogene

on members of the AP-1 transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5857-5864.

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 Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. und Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* **14**: 1798-1811.

Vogelstein, B. (1990). A deadly inheritance. *Nature* **348**: 681-682.

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

Wang, Z.-Q., Ovitt, C., Grigoriadi, A. E., Möhle-Steinlein, U., Rütther, U. und Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**: 741.

Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J. E., Mayr, G., Anderson, M. E., Schwedes, J. F. und Tegtmeyer, P. (1993). p53 domains - identification and characterization of 2 autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev.* **7**: 2575-2586.

Welter, J. F., Crish, J. F., Agarwal, C. und Eckert, R. L. (1995). Fos-related Antigen (*Fra-1*), *junB*, and *junD* activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP-1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *J. Biol. Chem.* **270**: 12614-12622.

White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* **10**: 1-15.

Wilhelm, D., van Dam, H., Herr, I., Baumann, B., Herrlich, P. und Angel, P. (1995). Both ATF-2 and cJun are phosphorylated by stress-activated protein kinases in response to UV irradiation. *Immunobiol.* **193**: 143-148.

Wilson, T. und Treisman, R. (1988). C-terminal mutations block down-regulation of *c-fos* transcription following serum stimulation. *EMBO J.* **7**: 4193-4202.

Wisdom, R. und Verma, I. M. (1993). Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7429-7438.

Wisdom, R., Yen, J., Rashid, D. und Verma, I. M. (1992). Transformation by FosB requires a transactivation domain missing in FosB2 that can be substituted by heterologous activation domains. *Genes & Dev.* **6**: 667-675.

Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan., Y.-C. und T., C. (1992). Redox-activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* **11**: 3323-3335.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. und Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Science* **366**: 701-704.

Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. und Karin, M. (1990a). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**: 1205-1215.

Yang-Yen, H.-F., Chiu, R. und Karin, M. (1990b). Elevation of AP-1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New Biol.* **2**: 351-361.

Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R.-P., Schuermann, M., Müller, R. und Bravo, R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* **8**: 805-813.

Zhan, Q., Carrier, F. und Fornace Jr., A. J. (1993). Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4242-4250.

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.