



KfK 5071 B

Juli 1992

**Konstitutiv und induzierbar  
an die DNA bindende  
Transkriptionsfaktoren *in vivo*:  
Vermittler von positiver und  
negativer Genregulation**

H. König

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik  
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5071 B

**Konstitutiv und induzierbar an die DNA bindende  
Transkriptionsfaktoren *in vivo*:  
Vermittler von positiver und negativer  
Genregulation**

Harald König

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

## Zusammenfassung

Die Regulation der Transkription von Genen durch extrazelluläre Signale erfolgt über die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen DNA-Elementen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA)-Tumorpromotoren DNA-Protein-Interaktionen an den regulatorischen Elementen des *c-fos*-Protoonkogens und des über den Transkriptionsfaktor AP-1 (Fos/Jun) gesteuerten Kollagenase (Typ I)-Gens beeinflussen, und wie Glucocorticoide und das Adenovirus E1a (AdE1a)-Protein der Phorbol-12-myristat-13-acetat-Induktion AP-1-abhängiger Gene, über AP-1, entgegenwirken. Durch *in vivo* Dimethylsulfat (DMS)-"footprinting"-Analysen konnte gezeigt werden, daß sich die Besetzung des *c-fos*-"Serum Response Element" (SRE) mit einem Multiproteinkomplex *in vivo* während der transienten Induktion der *c-fos*-Transkription durch den Phorbol-12-myristat-13-acetat TPA nicht ändert. Die transiente Aktivierung des *c-fos*-Gens erfolgt somit über konstitutiv an die DNA bindende Proteinkomplexe. Das erhaltene DMS-Reaktivitätsmuster legt es nahe, daß sich in NIH 3T3-Maus-Fibroblasten ein ternärer Komplex aus "Serum Response Factor" (SRF), "Ternary Complex Factor" (p62<sup>TCF</sup>) und dem SRE *in vivo* ausbildet. In F9-Teratokarzinom-Stammzellen dagegen ist das erhaltene Muster mit der Abwesenheit von p62<sup>TCF</sup> im Proteinkomplex über dem SRE konsistent. Das endogene *c-fos*-Gen ließ sich in F9-Zellen jedoch, wie in NIH 3T3-Zellen, durch TPA induzieren und transient transfizierte, mutierte *c-fos*-Promotorkonstrukte, die keinen ternären Komplex mehr bilden können, waren in beiden Zelltypen in vergleichbarem Maße durch TPA oder Serum induzierbar wie die Wildtyp-Promotorkonstrukte. Diese Ergebnisse legen es nahe, daß die Bildung des ternären Komplexes, entgegen bisheriger Auffassungen, keine Voraussetzung für die transiente Induktion des *c-fos*-Gens durch Phorbol-12-myristat-13-acetat und Serum darstellt. Im 5'-flankierenden Bereich des Kollagenase-Gens führt TPA zu einer Besetzung mehrerer Proteinbindungsstellen, einschließlich der für die Phorbol-12-myristat-13-acetat-Induktion absolut notwendigen AP-1-Bindestelle (TRE). Die am TRE in lebenden Zellen erhaltenen DNA-Protein-Kontakte sind identisch mit denjenigen, die mit gereinigtem AP-1 *in vitro* erhalten wurden. Obwohl ein *in vitro* hergestellter Glucocorticoidrezeptor (GR) die DNA-Bindungs-fähigkeit von Jun-Jun-Homodimeren hemmt, interferiert er nicht mit der DNA-Bindung von Fos-Jun-Heterodimeren und mit derjenigen von gereinigtem AP-1 *in vitro*. Die Besetzung der AP-1-Bindestelle ändert sich auch *in vivo* unter Bedingungen der Glucocorticoidrepression nicht. In AdE1-transformierten Zellen ist die AP-1-Bindestelle dagegen nicht besetzt. Die Ergebnisse legen - im Gegensatz zur konstitutiven Proteinbindung an das *c-fos*-SRE - eine Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierte Bindung von Proteinen, einschließlich AP-1, an die Promotorregion des Kollagenase-Gens *in vivo* nahe. Der Glucocorticoidrezeptor bindet nicht direkt an das TRE und hemmt die Aktivität von AP-1, ohne mit dessen DNA-Bindung zu interferieren. AdE1a scheint dagegen die Bindung von AP-1 an das TRE *in vivo* zu verhindern.

## Abstract

### Transcription factors that bind constitutively or inducibly to DNA *in vivo*: mediators of positive and negative gene regulation

Transcriptional regulation of genes in response to extracellular signals is based on the interaction of transcription factors with regulatory DNA elements. In the work presented, it was investigated how phorbol ester tumor promoters affect DNA-protein interactions at regulatory DNA-elements of the *c-fos* proto-oncogene and of the collagenase (type I) gene, which is regulated by the transcription factor AP-1 (Fos/Jun), and by which mechanisms glucocorticoids and the adenovirus (Ad) E1a protein antagonize the phorbol ester induction of AP-1-dependent genes. By genomic dimethyl sulfate (DMS) footprinting analyses it was shown that the occupation of the *c-fos* serum response element (SRE) *in vivo* by a multiprotein complex was unaltered in the course of the transient induction of *c-fos* transcription by the phorbol ester TPA. Thus, transient transcriptional activation of the *c-fos* gene seems to be mediated by protein complexes that are constitutively bound to DNA. The DMS-reactivity pattern obtained in murine NIH 3T3 fibroblasts suggests the formation of a ternary complex *in vivo* composed of the serum response factor (SRF), ternary complex factor (p62<sup>TCF</sup>) and the SRE. In F9 teratocarcinoma stem cells, however, the pattern obtained is consistent with the absence of p62<sup>TCF</sup> in the complex over the SRE. Nevertheless, inducibility of the endogenous *c-fos* gene was not impaired and mutated *c-fos* promoter constructs unable to form a ternary complex were inducible by serum or TPA to the same extent as the wild-type constructs upon transient transfection into both cell-types. The data suggest that - in contrast to previous views - ternary complex formation is not a prerequisite for the induction of *c-fos* transcription by serum or phorbol esters. In the 5'-flanking region of the collagenase gene, treatment of cells by TPA led to the occupation of several protein binding sites including the AP-1 binding site (TRE), which is absolutely necessary for the induction of the gene by phorbol esters. The DNA-protein contacts obtained in living cells are identical to those caused by affinity-purified AP-1 *in vitro*. Although *in vitro* synthesized glucocorticoid receptor disrupted the DNA-binding of Jun/Jun homodimers, it did not interfere, however, with the DNA-binding capability of either Fos/Jun heterodimers or of affinity-purified AP-1. Consistently, the occupation of the AP-1 binding site *in vivo* was not altered under conditions of glucocorticoid-mediated repression of collagenase transcription. In Ad E1-transformed cells, the AP-1 binding site was not occupied. In contrast to the constitutive protein-binding to the *c-fos* SRE, the results on the collagenase gene suggest the phorbol ester-induced binding of proteins, including AP-1, to the collagenase promoter region *in vivo*. The glucocorticoid receptor does not interact directly with the TRE but inhibits the activity of AP-1 without abolishing its DNA-binding capability. In contrast, AdE1a seems to prevent AP-1 from binding to the TRE *in vivo*.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	II
<b>Abkürzungen</b> .....	VII
<b>Einleitung</b> .....	1
<b>Material und Methoden</b>	
I. <u>Allgemeine Arbeitsmethoden</u>	
Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren .....	6
Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen .....	6
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	6
Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen .....	6
Dephosphorylierung von DNA-Strangenden .....	7
Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese .....	7
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	8
Präparation und Reinigung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden .....	8
Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase .....	9
Präparation von Zellkernextrakten .....	9
Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele .....	11
II. <u>DNA-Klonierungstechniken</u>	
Ligation von DNA-Fragmenten .....	11
Klonierung von Oligonukleotiden .....	12
Präparation und Transformation kompetenter E. coli Bakterien .....	12
Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien .....	13

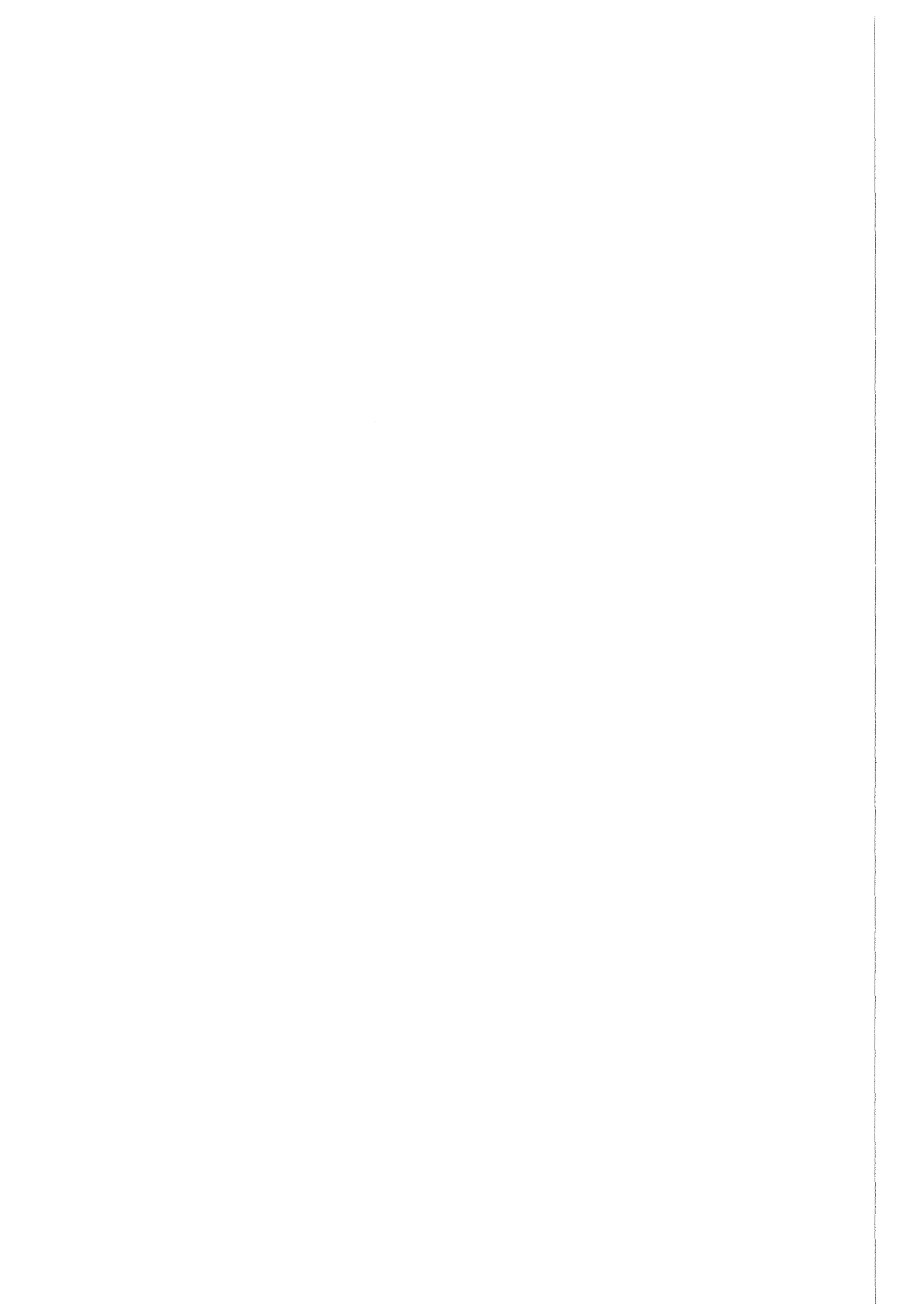
III. <u>Zellkultur und Transfektionen</u>	
A. Zellkultur .....	14
Trypsinieren von Zellen .....	14
Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	14
Verwendete Zelllinien .....	15
B. Transfektionen .....	16
IV. <u>Analytische Methoden</u>	
Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA ("supercoil sequencing") .....	16
Gelretardationsanalyse .....	18
Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität (CAT-"Assay") .....	19
Messung der Transkriptionsrate durch "Nuclear run-on"-Analysen .....	20
<i>In vivo</i> Dimethylsulfat-"footprinting" durch ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion .....	23
<i>In vivo</i> "footprinting" mit UV-Strahlung ("photo- footprinting") .....	26
<i>In vitro</i> Dimethylsulfat-"footprinting" .....	28
RNase-Protektionsanalyse zur Quantifizierung von mRNA .....	30
<i>In vitro</i> Transkription und <i>in vitro</i> Translation .....	32
Coomassie-Färbung von Proteinen, die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt wurden .....	33
Silber-Färbung von Proteinen, die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt wurden .....	33
Transfer von gelaufgetrennten Proteinen auf Membranen und Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper ("Western blotting") .....	34
Herstellung von anti-trpE-SRF-Antiseren in Kaninchen .....	35
Immunpräzipitationen .....	37
Zweidimensionale Peptidkartierung von <sup>32</sup> P-markiertem SRF .....	37

## Ergebnisse

A. <u>Präformierte DNA-Protein-Komplexe <i>in vivo</i> in der Regulation des c-fos-Protoonkogens</u> .....	40
--	----



1. <i>In vivo</i> DNA-Protein-Interaktionen am c-fos-SRE .....	41
1.1 F9-Teratokarzinom-Stammzellen zeigen im Unterschied zu NIH 3T3-Zellen keine ternäre Komplexbildung <i>in vivo</i> .....	45
1.2 Die <i>in vivo</i> Proteinbindung am SRE ändert sich während der Induktion der c-fos-Transkription durch Phorbolster nicht .....	50
2. Die Bildung des ternären Komplexes ist keine Voraussetzung für die Induktion von c-fos durch Phorbolster oder Serum .....	52
3. Untersuchung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von SRF während der Induktion von c-fos durch Phorbolster .....	56
<b>B. <u>Induzierte DNA-Protein-Komplexe <i>in vivo</i> in der antagonistischen Regulation des Kollagenase-Gens durch Phorbolster und Glucocorticoide bzw. AdE1a</u></b> .....	60
1. Die Aktivierung der Transkription des Kollagenase-Gens durch TPA geht mit der Bindung von Proteinen an den Promotor des Gens <i>in vivo</i> einher .....	62
2. Die TPA-induzierten EMS-Reaktivitätsveränderungen am TRE <i>in vivo</i> beruhen auf der Interaktion mit AP-1 .....	66
3. Mögliche Mechanismen für den Antagonismus zwischen Glucocorticoidrezeptor und AP-1 .....	68
4. Der Glucocorticoidrezeptor interferiert nicht mit der DNA-Bindung von Fos/Jun und gereinigtem AP-1 <i>in vitro</i> .....	69
5. Glucocorticoid-Behandlung reprimiert die Phorbolster-induzierte Transkription des Kollagenase-Gens, ohne die Besetzung des TRE <i>in vivo</i> zu verändern .....	74
6. In Adenovirus E1-transformierten Zellen findet keine Besetzung des TRE <i>in vivo</i> statt .....	77
<b>Diskussion</b> .....	80
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	98



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b p	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	Intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynucleosidtriphosphate
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEAE-Papier	Diethylaminoethyl-Papier
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-Aminoethylether)-Tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum

g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- 2-ethansulfonsäure
J	Joule
k b	Kilobasen (1000 Basen)
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m A	Milliampere
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
M	Molarität
N	Normalität
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethan- sulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
r p m	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl- ethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol- 13-Acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan
tRNA	transfer RNA
u	Units (Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolette Strahlung
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
W	Watt

## Einleitung

Interaktionen zwischen Proteinen und DNA und die daraus resultierenden Strukturen sind die Grundlage für die Entschlüsselung der genetischen Information in jeder Zelle.

Im Zellkern eukaryontischer Zellen entstehen durch die Wechselwirkungen von genomischer DNA mit Histon-Oktameren Nukleosomen (Richmond et al., 1984), die zu 30nm Chromatinfasern (Felsenfeld & McGhee, 1986), zu Chromatinschleifen und schließlich zu kondensierten Strukturen, wie sie in Metaphasechromosomen auftreten, verpackt sein können (Rattner & Lin, 1985). Die Verpackung der genomischen DNA in Chromatinstrukturen ermöglicht erst die Unterbringung des gesamten Genoms im Zellkern; sie ist jedoch auch an der Steuerung der Genexpression beteiligt (als Übersichtsartikel s. Eissenberg et al., 1985; Wolffe, 1990).

Der erste Schritt in der Entschlüsselung und damit der Expression genetischer Information ist die Transkription von Genen. Sequenzspezifische DNA-bindende Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, steuern dabei über ihre Bindung an regulatorische DNA-Elemente von Genen deren Transkription durch RNA-Polymerasen (als Übersichtsartikel s. Maniatis et al., 1987; Ptashne, 1988; Mitchell & Tjian 1989; Ptashne & Gann, 1990). Die Regulation der Transkription von Genen ist die Grundlage der differentiellen Genexpression. Die zeitlich und räumlich differenziert auftretende Aktivität von Transkriptionsfaktoren stellt somit eine wesentliche Grundlage für die embryonale Musterbildung und die Ontogenese mehrzelliger Organismen dar (als Übersichtsartikel s. Biggin and Tjian, 1989; Kessel & Gruss, 1990; Melton, 1991).

Transkriptionsfaktoren sind das letzte Glied in den Signaltransduktionsketten, über die extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder Morphogene, aber auch "unphysiologische" Signale wie Strahlung, chemische Karzinogene oder Tumorpromotoren in den Zellkern eukaryontischer Zellen übermittelt werden und dort zu Veränderungen im genetischen Programm der Zelle führen (z.B. Herrlich & Ponta, 1989).

Im Gegensatz zu den Mechanismen über die Wachstumsfaktoren

und Hormone Gene aktivieren, ist über die Vorgänge durch die chemische Karzinogene und Tumorpromotoren das genetische Programm der Zelle ändern und zur Transformation von Zellen führen relativ wenig bekannt (Rahmsdorf & Herrlich, 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel von Tumorpromotoren des Phorbol-12-myristat-13-acetat-Typs untersucht wie extrazelluläre Signale über Transkriptionsfaktoren die Transkription von Genen aktivieren, und wie Glucocorticoidhormone bzw. das transformierende Adenovirus Ela (AdEla)-Protein mit der durch Phorbol-12-myristat-13-acetat induzierten Aktivierung der Transkription interferieren. Phorbol-12-myristat-13-acetat-Tumorpromotoren, wie beispielsweise TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) aktivieren Protein-kinase C (Nishizuka, 1984, 1986 und 1988) und führen ähnlich wie die Behandlung von Zellen mit Serum oder Wachstumsfaktoren zu massiven Veränderungen in der Genaktivität (als Übersichtsartikel s. Rahmsdorf & Herrlich, 1990). Wie Serumwachstumsfaktoren aktivieren sie innerhalb von Minuten die Transkription einer ganzen Reihe von Genen, die als sehr frühe Gene oder "immediate early genes" (IEG) bezeichnet werden (Greenberg & Ziff, 1984; Lau & Nathans, 1987; Almendral et al., 1988). Die Aktivierung der Transkription dieser Gene ist transient und kann ohne Neusynthese von Proteinen erfolgen (Greenberg & Ziff, 1984; Greenberg et al., 1986). Im Falle des c-fos-Gens erfolgt die Abschaltung der Transkription durch einen autoregulatorischen Mechanismus (Schönthal et al., 1988b und 1989; Sassone-Corsi et al., 1988; Wilson & Treisman, 1988). Sowohl die schnelle Induktion als auch die sich daran anschließende Abschaltung der c-fos-Transkription erfolgen über dasselbe regulatorische DNA-Element, das "Serum Response Element" (SRE) (Treisman, 1985 und 1986; König et al., 1989; Rivera et al., 1990). Einige der IEG, wie die Protoonkogene c-fos, c-jun und verwandte Gene kodieren Transkriptionsfaktoren (Curran & Franza, 1988). Die Produkte der "immediate early"-Gene können an der Umwandlung kurzfristig wirkender extrazellulärer Signale in längeranhaltende Veränderungen im genetischen Programm der Zelle beteiligt sein, in dem sie andere Gene regulieren (Herrlich & Ponta, 1989). Die Produkte der c-fos- und der c-jun-Protoonkogene bilden den Transkriptionsfaktor AP-1

(Aktivatorprotein 1) (Curran & Franza, 1988 und Referenzen darin), der die Transkription anderer Gene, z. B. die der Metalloproteinasen Stromelysin und Kollagenase (Typ I) über ein DNA-Element reguliert, das als TRE (TPA-responsives Element) bezeichnet wird (Angel et al., 1987a, b). Die Induktion der Transkription dieser Gene erfolgt langsamer als die der IEG (über Stunden) und ist wie im Falle des Kollagenase-Gens von der Neusynthese von Proteinen abhängig (Angel et al., 1987a; diese Arbeit).

Es ist seit langem bekannt, daß die tumorpromovierenden und inflammatorischen Wirkungen von Phorbolestern durch Glucocorticoidhormone gehemmt werden können (Nelson, 1962; Belman & Troll, 1972; Scribner & Slaga, 1973). Interessanterweise konnten während der letzten Jahre mehrere Gruppen zeigen, daß die Phorbolster-induzierte AP-1-Aktivität und die Transkription AP-1-abhängiger Gene durch das Adenovirus Ela-Protein (Offringa et al., 1988; Offringa et al., 1990) und durch Glucocorticoide gehemmt werden kann (Frisch & Ruley, 1987; Offringa et al., 1988; Mordacq & Linzer, 1989; Diamond et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Schüle et al., 1990). Die Glucocorticoid-vermittelte Hemmung des Kollagenase-Gens erfolgt durch einen Mechanismus, der den Glucocorticoidrezeptor benötigt und wird, wie die Repression durch AdEla, über die DNA-Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors AP-1, das TRE, vermittelt (Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Schüle et al., 1990; Offringa et al., 1990).

Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten denkbar wie Phorbolster die Transkription über ein regulatorisches DNA-Element aktivieren können. Zum einen könnte die Bindung des Transkriptionsfaktors an sein entsprechendes DNA-Element nach Phorbolster-Behandlung von Zellen induziert werden (durch posttranslationale Modifikationen, durch Induktion der Synthese des Faktors oder durch beides). Zum anderen ist eine konstitutive Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Elemente denkbar und die Regulation der Transkription erfolgt über eine Modulation des Transaktivierungspotentials der Faktoren, d. h. ihrer Fähigkeit mit der Transkriptionsmaschinerie zu interagieren. (Dies könnte durch

posttranslationale Modifikationen oder durch die Interaktion mit anderen Proteinen bewerkstelligt werden.) Dieselben Schritte kommen umgekehrt auch als Angriffspunkte für negativ wirkende Signale in Frage.

Die Interaktionen von DNA-Sequenzen mit sequenzspezifischen DNA-bindenden Proteinen wurden anfänglich durch *in vitro* DNase I-Protektions ("footprinting")-Analysen (Galas & Schmitz, 1978) oder Gelretardationsexperimente (Fried & Crothers, 1981; Garner & Revzin, 1981) mit Extrakten aus Zellkernen untersucht. Solche *in vitro* Experimente haben zur Identifizierung und Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren und deren DNA-Bindungsstellen in Promotoren und Enhancern von Genen einen großen Beitrag geleistet. In Anbetracht der komplexen Organisation der genomischen DNA in Chromatinstrukturen stellt sich allerdings die Frage inwieweit von solchen *in vitro* Experimenten auf die tatsächliche Bindung von Transkriptionsfaktoren *in vivo*, z. B. nach Einwirkung von extrazellulären Signalen auf Zellen oder in verschiedenen Differenzierungsstadien von Zellen, geschlossen werden kann.

Die Methode der genomischen Sequenzierung (Church & Gilbert, 1984) und die davon abgeleitete Methode des *in vivo* (genomischen) "footprinting" mit Dimethylsulfat (DMS) (Ephrussi et al., 1985; Becker et al., 1986 und 1987) ermöglichte zum erstenmal die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen in intakten, lebenden Zellen. Solche Experimente sind jedoch wegen der großen Komplexität des Säugetiergenoms technisch sehr schwierig. So sind trotz der Wichtigkeit solcher Experimente weniger als zehn Gene auf diese Weise analysiert worden seit die Methode vor acht Jahren eingeführt wurde. Paul Mueller und Barbara Wold entwickelten 1989 eine Technik ("ligation mediated PCR"), die mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion die Sensitivität der Methode stark erhöht hat (Mueller & Wold, 1989; Pfeifer et al., 1989). Genomische DMS-"footprinting"-Analysen haben gezeigt, daß die Anwesenheit eines bestimmten Transkriptionsfaktors im Zellkern und seine Bindung an seine entsprechende DNA-Sequenz in Zellkernextrakten keine Rückschlüsse darauf zuläßt, ob dieser Faktor *in vivo* an seine Erkennungssequenz bindet, und, daß ubiquitär vorkommende



Proteinfaktoren in zelltypspezifischer Weise an DNA-Sequenzen binden können (Ephrussi et al., 1985; Becker et al., 1987; Mueller & Wold, 1989; Pfeifer et al., 1990). Diese Ergebnisse unterstreichen, daß *in vitro* Daten nicht unbedingt die *in vivo* Situation widerspiegeln müssen.

In der vorliegenden Arbeit habe ich deshalb untersucht, ob und wie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen DNA-Elemente von zwei Genen durch die Behandlung von Zellen mit dem Phorbolster-Tumorpromotor TPA *in vivo* beeinflußt wird: An das "Serum Response Element" (SRE) des *c-fos*-Gens, dessen Transkriptionsinduktion proteinsyntheseunabhängig ist; und an den Promotor des Kollagenase (Typ I)-Gens, bei dem die Transkriptionsaktivierung durch Phorbolster von Proteinsynthese und dem Transkriptionsfaktor AP-1 (von dem das *c-fos*-Genprodukt einen Teil darstellt) abhängig ist. Verbunden damit war die Frage, wie Glucocorticoide bzw. AdE1a mit der AP-1-vermittelten Phorbolsterinduktion der Kollagenase-Transkription interferieren.

# **Material und Methoden**

## **I. Allgemeine Arbeitsmethoden**

### **Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren**

Zu der nukleinsäurehaltigen, wässrigen Lösung wurde dasselbe Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) gegeben und gut gemischt. Die entstandene Emulsion wurde zur Trennung der Phasen kurz zentrifugiert und die wässrige (Ober-) Phase zur weiteren Verwendung abgenommen.

### **Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen**

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde (wenn nicht anders angegeben) mit 3M Natriumacetat (pH 4.8) auf eine Endkonzentration von 0.2M Natriumacetat gebracht und 2.5 Volumina Ethanol oder 1 Volumen Isopropanol zugesetzt. Die Präzipitation erfolgte für 30 min bis übernacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder für 5-15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (nur Ethanolpräzipitation). Das Präzipitat wurde anschließend bei 10,000g 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 260nm photometrisch bestimmt. Eine Extinktion bei 260nm von 1 entspricht  $50\mu\text{g/ml}$  (doppelsträngiger) DNA,  $40\mu\text{g/ml}$  Ribonukleinsäure oder  $20\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotid-DNA.

### **Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen**

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salz-Lösungen ein für die jeweilige

Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu, entsprechend den Herstellerangaben, eingestellt. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2-3u Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei  $37^\circ\text{C}$  für 2h bis übernacht.

### **Dephosphorylierung von DNA-Strangenden**

Linearisierte DNA wurde mit 20u intestinaler alkalischer Phosphatase aus Kälbern (CIP, Boehringer Mannheim) in 50mM Tris-HCl pH 9.0, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1mM  $\text{ZnCl}_2$  und 1mM Spermidin 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach nochmaliger Zugabe von 20u CIP wurde der Reaktionsansatz weitere 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert.

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

a. mittels Agarose-Gelen

erfolgte in 0.8-1.2% Agarose-Gelen (mit  $0.3\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid) in 0.5xTBE (1xTBE entspricht 90mM Tris-base, 90mM Borsäure und 2.5mM EDTA) in einer (Horizontal-) Gelelektrophoresekammer bei 35-45mA (50-100V). Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz über einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 302nm) sichtbar gemacht.

b. mittels denaturierenden Polyacrylamidgelen

6-20%ige denaturierende Polyacrylamidgele enthielten 8.3M Harnstoff und wurden aus einer Stammlösung bestehend aus 30 Gew.-% Acrylamid und 0.8 Gew.-% N,N'-Methylenbisacrylamid in 1xTBE hergestellt. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS, Endkonzentration 0.83 Vol.-%) und N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED, Endkonzentration 0.05 Vol.-%) zwischen zwei Glasplatten.

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

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde durch UV-Strahlung (302nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell unterhalb des Fragmentes ein Spalt in die Agarose geschnitten. In diesen Spalt wurde ein Stückchen DEAE-Papier (Schleicher & Schüll) 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 und in 1.5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5 und 1mM EDTA für 20 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit vom Papier durch Filtration durch eine (sterile) Quarzsandschicht getrennt. (Dazu wurde ein 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß unten mit einem Loch versehen, ca. 100µl Quarzsand eingefüllt und in ein zweites Reaktionsgefäß gesteckt. Das DEAE-Papier und die Flüssigkeit wurden dann auf die Quarzsandschicht gebracht und durch kurzes Zentrifugieren voneinander getrennt.) Das DNA-Fragment wurde schließlich mit Ethanol präzipitiert.

## **Präparation und Reinigung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden**

Die Oligonukleotide wurden mit einer Oligonukleotidsynthesemaschine ("Gene Assembler", Pharmacia) hergestellt. Die Cassette, die die Oligonukleotideinzelstränge an einer festen Phase gebunden hat, wurde in einem 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Oligonukleotide und deren Schutzgruppen wurden anschließend bei 50°C über 16h in konzentriertem (25%) Ammoniak von der Festphase abgespalten. Die flüssige Phase wurde eingetrocknet, in Formamid-Probenpuffer (98% deionisiertes Formamid, 10mM EDTA, 0.02% Bromphenolblau, 0.02% Xylencyanol) gelöst und bei 95°C für 3 min denaturiert. Danach erfolgte die Auftrennung der Syntheseprodukte über ein präparatives (400x200x1mm), denaturierendes 20% Polyacrylamidgel bei 30-40mA (ca. 1000V) für 3-4h in 1xTBE. Zum Sichtbarmachen der Syntheseprodukte wurde das Gel auf eine einen Fluoreszenzfarbstoff enthaltende

Dünnschichtchromatographiefolie (Polygram® CEL 300 PEI/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel & Co) gelegt und mit UV der Wellenlänge 254nm im Auflicht bestrahlt ("UV-shadowing"). Die vollständigen Syntheseprodukte wurden ausgeschnitten, zerkleinert und übernacht in Wasser bei 37°C eluiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde das Eluat mit n-Butanol auf ein Volumen von ca. 150µl eingeeengt, auf eine Salzkonzentration von 0.2M Na-Acetat und 10mM Mg(Acetat)<sub>2</sub> eingestellt und die Oligonukleotide durch Zugabe von 6 Volumina Ethanol präzipitiert.

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

Zur Herstellung von Oligonukleotid-Proben für Gelretardationsanalysen wurden 40ng (ca. 5pmol) doppelsträngiges Oligonukleotid mit 5µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham, 10mCi/ml, 5000Ci/mmol) und 10u T4-Polynukleotidkinase (Promega) in 20µl 50mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.1mM Spermidin und 0.1mM EDTA für 1h bei 37°C inkubiert.

Zur radioaktiven Markierung von Primern für *in vivo* "footprinting"-Analysen wurden 20pmol einzelsträngiges Oligonukleotid mit 15µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und 20u T4-Polynukleotidkinase (Promega) in 30µl 50mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.1mM Spermidin und 0.1mM EDTA für 1h bei 37°C inkubiert.

Das markierte Oligonukleotid wurde anschließend über eine NACS-Prepac® Säule (BRL Life Technologies Inc., Gibco) [äquilibriert mit 0.1M NaCl in TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA)] von nicht eingebautem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP abgetrennt, mit 1M NaCl in TE eluiert und nach Zugabe von 10µg Hefe- oder E. coli-tRNA mit Ethanol präzipitiert.

### **Präparation von Zellkernextrakten**

#### **a. nach Dignam et al. (1983)**

Von Gewebekulturschalen (dreißig 14.5cm-Schalen) wurde das Medium abgeschüttet, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden 5 min bei 2°C und 500g abzentrifugiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und

nochmals abzentrifugiert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Das Volumen des Zellsedimentes wurde bestimmt (PCV= Packed Cell Volume) und die Zellen wurden in 5 PCV 10mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl und 0.5mM DTT (Dignam-Puffer A) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 500g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2 PCV Dignam-Puffer A resuspendiert und die Zellen in einem Dounce-Homogenisator durch 10-15 Stöße mit einem S-Kolben aufgebrochen. Die Zellkerne wurden dann durch 10-minütige Zentrifugation bei 1200g sedimentiert und in 20mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% Glycerol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT und 1mM PMSF aufgenommen (1ml pro 10<sup>9</sup> Zellen). Die Kerne wurden mit 10 Stößen im Dounce-Homogenisator resuspendiert und für 30 min unter Schütteln extrahiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (30 min, 25,000g) und der Überstand mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-präzipitiert. Dazu wurde pro ml Überstand 0.33g fein zermörsertes (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in kleinen Portionen, unter ständigem Rühren zugegeben (zur Neutralisierung wurden zusätzlich 40µl 1N NaOH pro Gramm eingewogenes (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zupipettiert). Die Präzipitation erfolgte auf Eis für 2h unter ständigem Rühren. Das Präzipitat wurde für 30 min bei 25,000g abzentrifugiert und in 1/7-1/10 des ursprünglichen Extraktvolumens Dignam-Puffer D (s. unten) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen 200 Volumina Dignam-Puffer D (20mM HEPES-KOH pH 7.9, 20% Glycerol, 100mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 1mM PMSF) für 2-3h mit drei- bis viermaligem Pufferwechsel. Der dialysierte Extrakt wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (12,000 rpm) für 5 min zentrifugiert und der Überstand (portioniert) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### **b. Chloroquin-Interkalations-Extrakte (Schröter et al., 1987)**

Zellkerne von Zellen von 15 14.5cm Gewebekulturschalen wurden nach Dignam et al. (1983) (s. oben), präpariert. Die Kerne wurden in 10mM HEPES-KOH pH 7.0, 1mM Spermidin, 0.3mM Spermin, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA und 10% Glycerol gewaschen und in 1ml dieses Puffers resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde dasselbe

Volumen dieses Puffers mit 20mM Chloroquin gegeben und die Mischung auf Eis unter sanftem Schütteln für 30 min inkubiert. Die Kerne wurden pelletiert (5 min, 500g) und der Überstand bei 2°C mit 15,000g zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  präzipitiert (siehe oben), durch Zentrifugation pelletiert, in 20mM HEPES-KOH pH 7.9, 20% Glycerol, 20mM KCl, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2mM EDTA resuspendiert und schließlich gegen denselben Puffer dialysiert (siehe oben).

### **Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970)**

Die Polyacrylamidgele (14cm lang) bestanden aus einem 10% Trenngel und einem 5% Kammgel ("stacking gel"). Das Trenngel wurde aus 10ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30:0.8), 7.5ml 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.15ml 20% SDS, und 12.35ml  $\text{H}_2\text{O}$  durch Zugabe von 250 $\mu\text{l}$  10% APS und 15 $\mu\text{l}$  TEMED polymerisiert. Das Kammgel wurde aus 2.55ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30:0.8), 3.75ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 75 $\mu\text{l}$  20% SDS und 8.7ml  $\text{H}_2\text{O}$  durch Zugabe von 75 $\mu\text{l}$  10% APS und 15 $\mu\text{l}$  TEMED hergestellt.

Die Proteine wurden in Laemmli-Probenpuffer (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 12% Glycerol, 0.001% Bromphenolblau, 0.715M  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen, für 5 min bei 95°C inkubiert und bei 4°C und 55V in Laemmli-Laufpuffer (0.025M TrisCl, 0.192M Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3) übernacht aufgetrennt. Wenn [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin-markierte Proteine aufgetrennt wurden, so wurden die Gele vor der Autoradiographie zunächst für 30-45 min in 7.5% Essigsäure fixiert, dreimal für je 30 min in 1 Liter DMSO entwässert und 4h bis übernacht durch Behandlung mit PPO (Diphenyloxazol; 22.2g/100ml DMSO) aktiviert.

## **II. DNA-Klonierungstechniken**

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

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren

Verhältnis von 1:1 eingesetzt und mit 1-3u T4-DNA-Ligase in 50mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM Spermidin, 0.1mg/ml BSA und 1mM ATP für 12-24h bei 15°C inkubiert. (Die DNA-Fragmente wurden zum Teil direkt in geschmolzener "low geling"-Agarose in die Reaktion eingesetzt; dabei betrug das Reaktionsvolumen mindestens das Doppelte des eingesetzten Agarose-Volumens.)

### **Klonierung von Oligonukleotiden**

Zur Klonierung wurden gereinigte Oligonukleotide eingesetzt, die zunächst kinasiert wurden. Dazu wurden 50ng (doppelsträngiges) Oligonukleotid in 10µl Reaktionsvolumen mit 10u T4-Polynukleotidkinase in 50mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.1mM Spermidin, 0.1mM EDTA und 0.5mM ATP für 1h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, eingetrocknet und in 10µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Davon wurde 1µl mit 100ng linearisierter und dephosphorylierter Vektor-DNA ligiert.

### **Präparation und Transformation kompetenter E.coli Bakterien (Chung & Miller, 1988)**

E. coli Bakterien (K12/DH5) wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium (10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Yeast-Extrakt und 10g NaCl pro Liter H<sub>2</sub>O) bis zu einer optischen Dichte (bei 600nm) von 0.3-0.6 bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen lassen und anschließend 10 min bei 2000g und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1/10 Volumen (bezogen auf das Kulturvolumen) Transformationspuffer (LB pH 6.1, 10% Polyethylenglykol, 5% DMSO, 10mM MgCl<sub>2</sub> und 10mM MgSO<sub>4</sub>) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Zu 100µl Aliquots dieser Suspension wurden 1-50ng Plasmid-DNA zugegeben und 20-30min auf Eis inkubiert. Danach wurden 3ml SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Yeast-Extrakt, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose) zugegeben und die Bakterien für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Schließlich wurden die Bakterien auf Ampicillin (100µg/ml)-haltigen LB-Agarplatten



(15g Bacto-Agar pro Liter LB) ausplattiert und übernacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## **Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien**

### **a. Präparation im kleinen Maßstab ("Minipreps") zur Überprüfung transformierter Bakterienkolonien**

1.5ml Übernachtskulturen (in LB mit 100µg/ml Ampicillin) wurden bei 5,000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und das Bakterien-Sediment in 100µl Lösung A (50mM Glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA) resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200µl Lösung B (0.2N NaOH, 1% SDS) auf Eis zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 150µl Lösung C (2M Essigsäure, 3M Na-Acetat) zugesetzt und der Überstand mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde schließlich mit Ethanol präzipitiert.

### **b. Präparation im großen Maßstab**

200ml Übernachtskulturen (in LB mit 100µg/ml Ampicillin) wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 5,000g und 4°C sedimentiert und das Bakterien-Sediment in 10ml Lösung A (s. oben) mit 2mg/ml (Hühnchen-) Lysozym resuspendiert. Die Suspension wurde 15-30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 20ml Lösung B (s. oben) zugesetzt, weitere 5 min auf Eis inkubiert und schließlich 15ml 3M Na-Acetat pH 4.8 zugegeben. Nach 15-60 min auf Eis wurden die Ansätze zentrifugiert (20 min, 16,000g), der Überstand mit 100ml Ethanol versetzt und 30 min bei -20°C präzipitiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (16,000g) wurde das (getrocknete) Pellet in 10ml 0.1M Na-Acetat, 50mM Tris-HCl pH 8.0 gelöst und nochmals mit Ethanol präzipitiert. Das Sediment wurde in 3.5 ml 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA gelöst, mit 3.65g CsCl und 200µl 10mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt und in Beckman VTi65 Ultrazentrifugationsröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden 16h bei 55,000 rpm und 20°C in einer Beckman

Ultrazentrifuge (mit Rotortyp VTi65) zentrifugiert, die Plasmidbanden mit Hilfe einer Spritze abgezogen und nochmals für 6h unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach Abziehen der Plasmidbanden (ca. 1.5ml) und Zugabe von 3ml H<sub>2</sub>O wurde das Ethidiumbromid durch Extraktion mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem n-Butanol entfernt und die DNA aus der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert.

### **III. Zellkultur und Transfektionen**

#### **A. Zellkultur**

##### **Trypsinieren von Zellen**

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 0.05% Trypsin gespült und mit 0.05% Trypsin (2ml pro 650ml Gewebekulturflasche) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5ml Kulturmedium aufgenommen. Vor dem Ausplattieren von Zellen für Experimente wurden diese aus dem trypsinhaltigen Medium abzentrifugiert (3 min, 300-400g) und in neuem Kulturmedium aufgenommen.

##### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, abzentrifugiert und in eiskaltem Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO (ca. 1ml pro 5x10<sup>6</sup> Zellen) aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann in einem Styropor-Behälter auf -80°C abgekühlt (übernacht) und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Danach wurden die Zellen in 10ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert und zur Kultivierung erneut in Medium aufgenommen.

## **Verwendete Zelllinien**

**NIH 3T3-Zellen** (embryonale Maus-Fibroblasten, entsprechen der NIH 3T3-Zelle der American Type Culture Collection) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100u/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen von 70-80% Konfluenz durch Trypsinbehandlung abgelöst und zur weiteren Kultivierung entsprechend verdünnt.

**F9-Teratokarzinom-Stammzellen** (undifferenzierte Maus-Teratokarzinom-Stammzellen aus einem Testis-Teratokarzinom einer Maus des Stammes 129 [Bernstine et al., 1973]; erhalten von Peter Angel, Institut für Genetik und Toxikologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe) wurden in einer 1:1 Mischung aus DMEM und F12-Medium, supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-Glutamat, 170µM β-Mercaptoethanol und 100u/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden alle 24-36h trypsiniert und verdünnt.

**CRL1497** (primäre, diploide, menschliche Hautfibroblasten aus einer Hautbiopsie von einem gesunden, 1 Monat alten, weiblichen Donor; American Type Culture Collection) wurden in DMEM/10% FCS ergänzt durch 100u/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**HeLa-Zellen** (Menschliche Zervix-Karzinomzelllinie) wurden in DMEM/8% FCS ergänzt mit 100u/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**HER** (primäre, menschliche, embryonale Retinoblasten) und die Adenovirus 5 E1-transformierten Klone **HER-XC2** und **HER-XC4** wurden von Hans van Dam, Leiden (Niederlande) erhalten. Die Zellen wurden in DMEM/15% FCS mit 100u/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## **B. Transfektionen**

Alle Transfektionen wurden mit einer modifizierten Form der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode (Graham & van der Eb, 1973) durchgeführt.

Es wurden, wenn nicht anders angegeben, 10 $\mu$ g DNA pro 9cm-Gewebekulturschale (bzw. 25 $\mu$ g DNA pro 14.5cm-Schale) transfiziert. Die Präzipitatbildung wurde in einem Volumen von 500 $\mu$ l (pro 10 $\mu$ g DNA) durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung zunächst in H<sub>2</sub>O gegeben (H<sub>2</sub>O-Volumen: 250 $\mu$ l abzüglich Volumen für zugesetzte DNA-Lösung und 2.5M CaCl<sub>2</sub>-Lösung) und gut gemischt. Dann wurden 250 $\mu$ l 2xHEPES-Puffer (50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.05) zugegeben und die Lösung durchmischt. Unter leichtem Schütteln wurden 25 $\mu$ l 2.5M CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 125mM) nach und nach zugegeben und die Mischung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 9cm-Gewebekulturschale wurden 500 $\mu$ l des Präzipitats zum Medium (10ml) zugetropft. NIH 3T3-Zellen wurden 24h, F9-Zellen 14-16h vor der Transfektion mit 1x10<sup>6</sup> Zellen pro 9cm-Schale oder mit 2.5x10<sup>6</sup> Zellen pro 14.5cm-Schale in DMEM/10% FCS bzw. in DMEM/F12/10% FCS ausplattiert. Das Präzipitat wurde im Falle der NIH 3T3-Zellen für 12-14h, im Falle der F9-Zellen für 6h auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums einmal mit PBS gewaschen und im Falle der NIH 3T3-Zellen vor der Behandlung mit Serum oder TPA für 36h in DMEM/0.5% FCS gehungert.

## **IV. Analytische Methoden**

### **Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA ("supercoil sequencing", Chen & Seeburg, 1985)**

Wenn aus "Minipreps" (s. oben) gewonnene Plasmid-DNA verwendet wurde, so wurde diese zunächst RNA-frei gemacht. Dazu wurde die Plasmid-DNA in 100 $\mu$ l 10mM Tris-HCl pH 7.5 und 1mM EDTA (TE) mit 1 $\mu$ l RNase A (10mg/ml) für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. CsCl-gereinigte Plasmid-DNA wurde ohne RNase-Behandlung, direkt, für die folgenden Schritte (Zhang et al., 1988) verwendet.

Ungefähr 3µg DNA wurden bei Raumtemperatur für 5 min in 0.2N NaOH, 0.2mM EDTA (in einem Endvolumen von 20µl) denaturiert, anschließend mit 2µl 2M NH<sub>4</sub>-Acetat (pH 4.6) neutralisiert und mit 60µl Ethanol auf Eis gemischt. Die DNA wurde 5 min bei -80°C präzipitiert und die getrocknete, denaturierte Plasmid-DNA wurde nach dem Lösen in Wasser sofort zur Sequenzierung verwendet.

Die Sequenzierungsreaktion (Didesoxy-Methode) wurde mit einem "Sequenase-Kit" (United States Biochemical) durchgeführt. Zur Hybridisierung des Primers wurden 7µl Plasmid-Lösung und 2µl 5xSequenzierungspuffer (200mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM NaCl) mit 1µl Primer (1pmol/µl) gemischt (Hybridisierungsreaktion), für 3 min auf 65°C erhitzt und auf Raumtemperatur abkühlen lassen (ca. 30 min). Währenddessen wurden vier 0.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (G, A, T und C) mit jeweils 2.5µl des entsprechenden Terminationsmixes [didesoxy (dd) GTP, ddATP, ddCTP oder ddTTP]\* vorbereitet. Für die Markierungsreaktion wurden zur Hybridisierungsreaktion (10µl) 1µl 0.1M DTT, 2µl verdünnter (1:5) Markierungsmix (Endkonzentrationen: 1.5µM desoxy (d)GTP, 1.5µM dCTP, 1.5µM dTTP), 1µl [<sup>35</sup>S]-dATP (Amersham, 8µCi/µl, 660Ci/mmol) und 2µl 1:8 in TE verdünnte Sequenase® Version 1.0 [(United States Biochemical), modifizierte Form der T7-DNA-Polymerase (Tabor & Richardson, 1987)] gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Termination der Reaktion wurden 3.5µl der Markierungsreaktion in jedes der mit den Terminationsmixes vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4µl Stop-Lösung (95% Formamid, 20mM EDTA, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF) zugegeben. Zur Auftrennung der Reaktionsprodukte wurden 3µl auf ein denaturierendes 6% Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 12-15mA (1500-1800V) in 1xTBE aufgetrennt. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C für 12-36h.

\* Die Terminationsmixes enthielten:

ddG-Mix: 80 $\mu$ M dGTP, 80 $\mu$ M dATP, 80 $\mu$ M dCTP, 80 $\mu$ M dTTP,  
8 $\mu$ M ddGTP, 50mM NaCl

ddA-Mix: 80 $\mu$ M dGTP, 80 $\mu$ M dATP, 80 $\mu$ M dCTP, 80 $\mu$ M dTTP,  
8 $\mu$ M ddATP, 50mM NaCl

ddT-Mix: 80 $\mu$ M dGTP, 80 $\mu$ M dATP, 80 $\mu$ M dCTP, 80 $\mu$ M dTTP,  
8 $\mu$ M ddTTP, 50mM NaCl

ddC-Mix: 80 $\mu$ M dGTP, 80 $\mu$ M dATP, 80 $\mu$ M dCTP, 80 $\mu$ M dTTP,  
8 $\mu$ M ddCTP, 50mM NaCl

### Gelretardationsanalyse

Die DNA-Bindungsreaktionen wurden in 25 $\mu$ l Volumina in 20% Glycerol, 20mM HEPES pH 7.9, 20mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Spermidin, 2.5mM EDTA und 1mg/ml BSA durchgeführt. Die Zellkernextrakte oder die *in vitro* translatierten Proteine wurden auf Eis in Anwesenheit von 0.5 $\mu$ g poly(dI-dC) (und, wo angegeben, mit Kompetitor-Oligonukleotiden) für 20 min inkubiert. Anschließend wurden ca. 0.2ng (ca. 20,000 cpm) der mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierten (kinasierten) Oligonukleotid-Probe zugegeben und die Reaktionen wurden für weitere 10 min bei 20°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze über ein nichtdenaturierendes 4% Polyacrylamidgel in 1xTBE bei Raumtemperatur für 2h bei 20mA aufgetrennt. Die Gele wurden in 10% Essigsäure für 10 min fixiert und getrocknet. Die Exposition erfolgte bei -80°C mit Verstärkerfolie für 12-72h.

Verwendete Oligonukleotide:

Die SRE- und SREel-Oligonukleotid-Proben sind in Abb. 8a gezeigt. Die TRE-Oligonukleotid-Probe [erhalten von Ingrid Herr, Institut für Genetik und Toxikologie (IGT), Kernforschungszentrum Karlsruhe] entstand durch Hybridisierung der folgenden zwei Oligonukleotide: 5'-GATCGAGCATGAGTCAGACAC-3' und 5'-GATCGTGTCTGACTCATGCTC-3'. Die GRE-Oligonukleotid-Probe (erhalten von Dr. A. C. B. Cato, IGT, Kernforschungszentrum Karlsruhe) bestand aus den Oligonukleotiden 5'-AGC-TTAGAACACAGTGTTCTCTAGAG-3' und 5'-GATCCTCTAGA-

GAACACTGTGTTCTA-3'. Das verwendete NF-1-Oligonukleotid (erhalten von G. Nebl, IGT, Kernforschungszentrum Karlsruhe) wurde durch Hybridisierung der Oligonukleotidsequenzen 5'-AGCTTTTGGAAATCTATCCAAGTC-3' und 5'-GATCCGACTTGGATAGATTCCAAA-3' erhalten, die eine NF-1-Bindestelle aus der "long terminal repeat"-Region des Maus-Mamma-Tumorvirus (MMTV) enthalten.

### **Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität (CAT-"Assay"; Gorman et al., 1982)**

#### **a. Präparation von Gesamtzellextrakten**

Die Zellen einer 9cm-Gewebekulturschale wurden einmal mit PBS gewaschen und in 1ml PBS abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (5,000 rpm) sedimentiert und in 100µl 250mM Tris-HCl pH 7.7 resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren (Ethanol/Trockeneis-Bad) und Auftauen (37°C) wurden die Zellen anschließend aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei -20°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

#### **b. CAT-Aktivitätsbestimmung**

Jeweils gleiche Proteinmengen wurden mit 2µl [<sup>14</sup>C]Chloramphenicol (Amersham, 200µCi/ml) und 20µl 4mM Acetyl-Coenzym A in 100µl Reaktionsvolumen (ergänzt durch 250mM Tris-HCl pH 7.7) für 2h bei 37°C inkubiert. Das Chloramphenicol und seine acetylierten Produkte wurden anschließend mit 1ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert. Nach Eindampfen des Ethylacetats im Vakuum-Konzentrator wurde der Rückstand in 15µl Ethylacetat gelöst und punktförmig auf eine 20x20cm große Kieselgel Dünnschichtchromatographie-Platte (Polygram SIL G, Macherey-Nagel & Co. ) aufgebracht. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mit Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel. Nach dem Trocknen der Platte erfolgte die

Autoradiographie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 12-72h. Zur Quantifizierung des acetylierten und nichtacetylierten Anteils des Chloramphenicols wurden die radioaktiven Punkte ausgeschnitten, mit 5ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und im Scintillationsmeßgerät gemessen.

### **Messung der Transkriptionsrate durch "Nuclear run-on"-Analysen (nach Greenberg & Ziff, 1984)**

#### **a. Präparation der Zellkerne**

##### **1. Standardmethode (für NIH 3T3-Zellen und F9 -Zellen)**

Die Zellen von einer 14.5cm-Gewebekulturschale ( $1-3 \times 10^7$  Zellen) wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 5ml kaltem PBS abgeschabt. Danach wurden die Zellen bei 300-400g abzentrifugiert und das Zellpellet in 1ml NP40-Lysepuffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5% NP-40) resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne abzentrifugiert (5 min, 400g), in 2ml NP40-Lysepuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Kerne wurden dann in  $100\mu\text{l}$  50mM Tris-HCl pH 8.3, 40% Glycerol, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1mM EDTA resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

##### **2. Modifizierte Methode (nach Bender, 1987) (wurde bei primären Zellen verwendet):**

Die abzentrifugierten Zellen (siehe oben) wurden in 4ml Lysepuffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM  $\text{MgCl}_2$ ) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 1ml Lysepuffer resuspendiert und nach Zugabe von 1ml Lysepuffer, der 1% NP-40 enthielt, im Dounce-Homogenisator mit einem S-Kolben solange behandelt, bis die Kerne weitgehend frei von anheftenden Zellfragmenten waren (15-20 Stöße). Danach wurden die Kerne abzentrifugiert, in  $100\mu\text{l}$  50mM Tris-HCl pH 8.3, 40% Glycerol, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1mM EDTA resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **b. "Nuclear run-on"-Reaktion**

Die aufgetauten Kerne ( $100\mu\text{l}$ ) wurden mit  $100\mu\text{l}$  Reaktionspuffer



[10mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 300mM KCl, je 0.5mM ATP, CTP, GTP und 100µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (Amersham, 10mCi/ml, 400Ci/mmol)] gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert.

c. Präparation der <sup>32</sup>P-markierten Transkripte (nach Groudine et al., 1981)

Die "run-on"-Reaktionen wurden durch Zugabe von DNase I zu einer Endkonzentration von 20µg/ml und 5-minütiger Inkubation bei 30°C gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden dann in 1% SDS, 5mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7.4 mit 100µg Proteinase K/ml für 30 min bei 42°C inkubiert und anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach Zugabe von 25µg Hefe-tRNA wurden 250µl 10% Trichloressigsäure (TCA), 60mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat auf Nitrocellulosefilterscheiben (Porengröße 0.45µm, Durchmesser 25mm) unter Verwendung einer Mehrfachfiltereinrichtung gesammelt und dreimal mit je 10ml eiskaltem 3% TCA, 30mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> gewaschen. Die Filterscheiben wurden danach in (Plastik-) Scintillationsgefäße gegeben und in 0.9ml DNase I-Puffer (20mM HEPES-KOH pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>) mit 25µg DNase I für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von EDTA und SDS zu Endkonzentrationen von 15mM bzw. 1% gestoppt.

Die RNA wurde anschließend durch 15-minütige Inkubation bei 65°C von den Filtern eluiert. Nach Abnahme der Flüssigkeit wurden die Filter mit 0.5ml 1% SDS, 10mM Tris-HCl pH 7.5 und 5mM EDTA für weitere 15 min bei 65°C inkubiert. Beide Flüssigkeiten wurden vereinigt und mit 25µg Proteinase K/ml für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA in Gegenwart von 0.1M NaCl mit Ethanol präzipitiert.

d. Quantifizierung der <sup>32</sup>P-markierten Transkripte durch Hybridisierung an immobilisierte DNA-Fragmente

1. Immobilisierung von DNA-Fragmenten an Nitrocellulose

Die Immobilisierung der DNA-Fragmente an eine Nitrocellulose-

membran (Schleicher & Schüll, BA85 SB, Porengröße  $0.45\mu\text{m}$ ) erfolgte mittels einer "Slot-blot"-Apparatur von Schleicher & Schüll (Minifold II SRC 072/0). Die Nitrocellulosemembran wurde dazu vorher mit  $2\times\text{SSC}$  ( $1\times\text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}, 0.0125\text{M Na-Citrat}$ ) getränkt. Die DNA-Fragmente ( $1\mu\text{g DNA pro "Slot"}$ ) wurden zunächst in  $0.5\text{M NaOH}$  für 20 min bei Raumtemperatur denaturiert. Danach wurde (auf Eis) das 8-fache des NaOH-Volumens an eiskaltem Neutralisierungspuffer ( $1.5\text{M NaCl}, 1\text{M Tris-HCl pH 7.5}$ ) zugegeben und rasch gemischt. Zur Anfärbung wurden  $0.5\mu\text{l } 10\text{mg/ml Ethidiumbromidlösung}$  zugegeben. Von der Lösung wurde jeweils ein Volumen, das  $1\mu\text{g DNA}$  enthielt ( $200\text{-}300\mu\text{l}$ ) in einen "Slot" pipettiert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch die Apparatur gesaugt.

## 2. Vorhybridisierung der Filter

Die Vorhybridisierung der Nitrocellulosemembran ( $63\times 228\text{mm}$ ) erfolgte in  $100\text{ml } 3\times\text{SSC}, 3\times\text{Denhardt's Lösung}$  [ $100\times\text{Denhardt's} = 2\% \text{ BSA}, 2\% \text{ Polyvinylpyrrolidon}, 2\% \text{ Ficoll (m.w. } 400,000)], 3\% \text{ PiPPi (PiPPi} = 0.2\text{M NaH}_2\text{PO}_4, 0.3\text{M Na}_2\text{HPO}_4, 1.5\% \text{ Na}_4\text{P}_2\text{O}_7), 1\% \text{ SDS}, 10\text{mM EDTA und } 50\mu\text{g/ml niedermolekularer denaturierter Lachsspermien-DNA für } 2\text{h bei } 65^\circ\text{C (im Schüttelwasserbad)}$ ).

## 3. Hybridisierung der $^{32}\text{P}$ -markierten Transkripte

Die radioaktiv markierten Transkripte wurden nach der Ethanolpräzipitation (und anschließendem Trocknen) in  $200\mu\text{l TE}$  gelöst und jeweils ein Aliquot von  $5\mu\text{l}$  im Scintillationsmeßgerät gemessen. Zur Hybridisierung wurde jeweils dieselbe Zahl an cpm eingesetzt ( $1\text{-}4\times 10^6 \text{ cpm}$ ). Die Proben wurden mit TE auf ein Volumen von  $250\mu\text{l}$  gebracht und 5 min bei  $85^\circ\text{C}$  denaturiert. Nach Abschrecken in Eiswasser wurde zu jeder Probe dasselbe Volumen  $2\times\text{Hybridisierungslösung}$  ( $6\times\text{SSC}, 2\times\text{Denhardt's}, 6\% \text{ PiPPi}, 0.2\% \text{ SDS}, 20\text{mM EDTA}, 20\mu\text{g/ml niedermolekulare denaturierte Lachsspermien-DNA}$ ) gegeben, die Proben zu den einzelnen Nitrocellulosefiltern (enthielten 4-6 "Slots") in kleine Plastikbeutel pipettiert und diese zugeschweißt. Die Hybridisierung erfolgte im Schüttelwasserbad bei  $65^\circ\text{C}$  für 36h.

#### 4. Waschen der Filter

Die Filter wurden zunächst 2h bei 65°C in 2xSSC (mit dreimaligem Wechsel der Waschlösung) gewaschen. Anschließend wurden die Filter mit 10µg/ml RNase A (DNase-frei gemacht durch 15-minütige Inkubation bei 95°C) in 2xSSC für 30 min bei 37°C inkubiert und nochmals für jeweils 30 min in 2xSSC bzw. 0.5xSSC gewaschen. Nach kurzem Antrocknen an der Luft wurden die Filter auf Whatman 3MM-Papier befestigt und in Plastikfolie eingeschweißt. Die Autoradiographie erfolgte zwischen zwei Verstärkerfolien bei -80°C für 3 Tage bis 5 Wochen.

#### 5. Verwendete DNA-Fragmente

c-fos (Maus): 3.6kb BamHI-Fragment des Plasmids p48/3 (Rüther et al., 1985); c-jun (Mensch): 1.2kb SmaI/HindIII-Fragment des Plasmids phcJ-1 (Angel et al., 1988a); Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Ratte): 1.3kb PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985); Kollagenase (Mensch): 2kb SmaI/HindIII-Fragment des Plasmids pCllase1 (Angel et al., 1987a).

#### ***In vivo* Dimethylsulfat-"footprinting" durch ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion ("ligation mediated PCR", Mueller & Wold, 1989)**

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

Die Zellen (von 1-2 14.5cm-Gewebekulturschalen pro Meßpunkt) wurden einmal mit warmen PBS gewaschen und für 2 min mit 0.5% DMS (Fluka) in DMEM/10mM HEPES-KOH pH 7.5 (auf der Gewebekulturschale) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 5ml PBS abgeschabt und abzentrifugiert (2°C, 400g, 3 min). Die Zellen wurden in 4ml 10mM Tris-HCl pH 7.7, 400mM NaCl, 2mM EDTA und 0.2% SDS lysiert und das Lysat mit 300µg/ml Proteinase K bei 37°C übernacht inkubiert. Das Lysat wurde dann zweimal mit Phenol/Chloroform (erst Phenolextraktion, dann Zugabe desselben Volumens Chloroform/Isoamylalkohol 24:1)

extrahiert und in Anwesenheit von 0.25M Na-Acetat pH 4.8 mit Isopropanol gefällt. Die genomische DNA wurde in TE aufgenommen und zur Reduktion der Viskosität mit einer Restriktionsendonuklease (die nicht im Promotorbereich des zu analysierenden Gens spaltet) fragmentiert. Im Falle des Maus *c-fos*-Gens wurde das Enzym PvuII, im Falle des menschlichen Kollagenase-Gens das Enzym EcoRI verwendet. Die Inkubation erfolgte übernacht bei 37°C. Danach wurden die Proben durch RNase-Behandlung (Enkonzentration 50µg/ml, 30 min bei Raumtemperatur) RNA-frei gemacht, zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert.

b. *In vitro* Methylierung von proteinfreier ("nackter") genomischer DNA (nach Maxam & Gilbert, 1980)

15-20µg genomische DNA (aus *nicht* mit DMS behandelten Zellen) wurden in 5-6µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 200µl 0.5% DMS in 50mM Na-Cacodylat, 1mM EDTA gemischt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl DMS-Stopplösung (1.5M Na-Acetat pH 7.0, 1M β-Mercaptoethanol) beendet und die DNA durch Zugabe von 750µl eiskaltem Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 250µl 0.3M Na-Acetat pH 7.0 aufgenommen, nochmals mit Ethanol präzipitiert und mit 80% Ethanol gewaschen.

c. Piperidin-Spaltung von *in vivo* und *in vitro* methylierter genomischer DNA (Maxam & Gibert, 1980)

Die getrocknete DNA wurde in 100µl 10% Piperidin (Fluka) gelöst und für 30 min bei 90°C (in verschraubbaren Eppendorf-Reaktionsgefäßen) inkubiert. Nach Abkühlen der Reaktionen auf Eis wurden 200µl 0.3M Na-Acetat pH 7.0 zugegeben und die DNA durch Zugabe von 900µl Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde 2-3 mal mit 80% Ethanol gewaschen.

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

Für die Erststrangsynthese wurden 3 µg durch Piperidin gespaltene genomische DNA und 0.6 pmol Primer 1 in 15 µl 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 (in 0.5 ml Reaktionsgefäßen). Danach wurden 9 µl einer Mischung, bestehend aus 7.5 µl 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 1 µl 480 µM (jedes) dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 1.5 µl 1:4 verdünnter Sequenase® Version 2.0 (13 u/µl, United States Biochemical) zugegeben, durch Pipettieren gemischt, und die Reaktionen weitere 15 min bei 45°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktionen in Eiswasser, wurden 6 µl 310 mM Tris-HCl pH 7.7 zugegeben und die Ansätze 15 min bei 67°C inkubiert.

Für die Ligation des Linker-Oligonukleotids wurden die Proben auf Eis transferiert und 20 µl 17.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 42.3 mM DTT, 125 µg/ml BSA zugegeben. Schließlich wurden 25 µl Ligationslösung [10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 3 mM ATP, 50 µg/ml BSA, mit 5 µl "linker mix" (20 pmol Linker/µl in 250 mM Tris-HCl pH 7.7) und 3 Weiss-Units T4-DNA-Ligase (Promega) pro 25 µl] zugegeben und die Reaktionen bei 15°C für 14-17h inkubiert. [Der Linker wurde durch Hybridisierung der folgenden zwei Oligonukleotide (gelgereinigt) erhalten: 5'-OH-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-OH-3' und 5'-OH-GAATTCAGATC-OH-3'. Dazu wurden beide Oligonukleotide auf eine Konzentration von 20 pmol/µl in 250 mM Tris-HCl pH 7.7 eingestellt, in gleichen Mengen zusammengegeben und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Lösung wurde danach für 5 min bei 70°C inkubiert (in Becherglas mit 100 ml Wasser) und langsam (ca. 3h) auf 4°C abkühlen lassen. Der hybridisierte Linker wurde bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.]

Die Reaktionen wurden anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt und in Gegenwart von 10 µg Hefe- oder E. coli-tRNA mit Ethanol präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Für die PCR-Reaktion wurden die getrockneten Präzipitate in 59 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zu der DNA-Lösung wurden 20 µl 5xTaq-Puffer [200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% w/v Gelatine (Sigma, G 1393)], 5 µl Primer 2-Lösung

(2 pmol/ $\mu$ l) und 5  $\mu$ l einer Lösung des langen Linker-Oligonukleotids (25mer, 2 pmol/ $\mu$ l) zupipettiert, gemischt und die Lösung für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abschrecken der Reaktionen in Eiswasser wurden 10  $\mu$ l einer dNTP Mischung (Konzentration jedes dNTPs 2.5mM) und 4  $\mu$ l einer 1:4 (in 1xTaq-Puffer) verdünnten Lösung von re-kombinanter Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq™, Cetus-Perkin-Elmer Corporation, 5u/ $\mu$ l) zugegeben, die Reaktionen gemischt und mit 90  $\mu$ l Mineralöl (Sigma, No. 400-5) überschichtet. Danach wurden die Reaktionen für 1 min bei 95°C denaturiert, anschließend bei 62.5-65°C (je nach Primer, siehe unten) zur Hybridisierung der Primer inkubiert und schließlich, zur Kettenverlängerung durch die Taq-DNA-Polymerase, 3 min bei 75°C (im Falle des Kollagenase-Gens und des c-jun-Gens) bzw. 76°C (c-fos) inkubiert. Diese Inkubationen wurden 19-20 mal wiederholt (in Coy TempCycler). Die Proben wurden danach auf Eis abgekühlt und es wurden ca. 2 pmol <sup>32</sup>P-endmarkierter Primer 3 (2-5x10<sup>6</sup>cpm), 2.5u Taq-DNA-Polymerase und 2  $\mu$ l 1mM dNTP-Mix pro Reaktion zugegeben. Die Reaktionen wurden dann für 2 min bei 95°C, 2 min bei 65.5-68°C (je nach Primer, siehe unten) und 10 min bei 75°C (Kollagenase und c-jun) bzw. 76°C (c-fos) inkubiert und anschließend durch Abschrecken in Eiswasser gestoppt. Nach Zugabe von 295  $\mu$ l 260mM Na-Acetat, 10mM Tris-HCl pH 7.5 und 4mM EDTA wurden die Reaktionen mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die Proben wurden in 6  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer (80% Vol./Vol. deionisiertes Formamid, 1mM EDTA, pH 8.0, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF) gelöst und 2  $\mu$ l davon auf einem 6% oder 8% denaturierenden Polyacrylamidgel ("Sequenziergel", Maxam & Gilbert, 1980) aufgetrennt. Die Autoradiographie erfolgte für 12-72h bei -80°C mit Verstärkerfolie.

Für die PCR und die radioaktive Markierung der Amplifikationsprodukte wurden folgende **Oligonukleotid-Primer** (alle gelgereinigt) verwendet:

**Maus-c-fos-Gen, kodierender Strang:** Primer 1, 5'-CTCTGT-CGTC AACTCTACGCCCCAG-3'; Primer 2, 5'-CTCTACGCCCA-GGCTTTCAACCCC-3' (Hybridisierungstemperatur 63°C); Primer 3, 5'-ACGCCCCAGGCTTTCAACCCCCGTCTT-3' (66°C)

*nicht-kodierender Strang*: Primer 1, 5'-CCGGTCCCCCCTGCGC-TGCACCC-3'; Primer 2, 5'-CTGCGCTGCACCCTCAGAGTGCTGC-3' (65°C); Primer 3, 5'-GCTGCACCCTCAGAGTGCTGCAGCCGG-3' (68°C)

**Menschliches Kollagenase-Gen**, *kodierender Strang*: Primer 1, 5'-TCCCAGCCTCTTGCTGCTCCAATAT-3'; Primer 2, 5'-GCTGCTCCAA-TATCCCAGCTAGGAA-3' (62.5°C); Primer 3, 5'-CTCCAATATCCCA-GCTAGGAAGCTCCC-3' (65.5°C)

*nicht-kodierender Strang*: Primer 1, 5'-ACCACTGTTTACATGGC-AGAGTGTG-3'; Primer 2, 5'-ATGGCAGAGTGTGTCTCCTTCGCAC-3' (62.5°C); Primer 3, 5'-CAGAGTGTGTCTCCTTCGCACACATCT-3' (65.5°C)

**Menschliches c-jun-Gen**, *kodierender Strang*: Primer 1, 5'-GAGCCCTTATCCAGCCCGAG-3'; Primer 2, 5'-TCCAGCCCGAGCTCAAC-ACTTATCTG-3' (65°C); Primer 3, 5'-GCCCCGAGCTCAACACTTA-TCTGCTACCAGTC-3' (67°C) (Die c-jun-Primer wurden freundlicherweise von Ingrid Herr, IGT, Kernforschungszentrum Karlsruhe zu Verfügung gestellt.)

### ***In vivo* "footprinting" mit UV-Strahlung ("photofootprinting"; Becker & Wang, 1984)**

#### a. UV-Bestrahlung von Zellen und Alkali-Labilisierung von genomischer DNA

Die Zellen wurden (auf der Gewebekulturschale) einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 Sekunden mit 12mW/cm<sup>2</sup> UV der Wellenlänge 254nm auf Eis bestrahlt (=1200J/m<sup>2</sup>). Die Lyse der Zellen und die Präparation der genomischen DNA erfolgte wie oben beschrieben (s. *in vivo* DMS-"footprinting"). Anschließend wurden 8µg der genomischen DNA in 100µl 1mM Tris-HCl pH 7.7, 5mM NaCl gelöst und zur Deaminierung photochemisch modifizierter Cytosine für 5h bei 50°C erhitzt. Die Reaktion wurde dann auf Eis transferiert, mit Ethanol präzipitiert, getrocknet und in 50µl eiskaltem 5mM NaCl, 5mM KP<sub>i</sub> (pH 8.3), 50mM Thymidin aufgenommen. Hierzu wurden 50µl einer Lösung von 5mM NaCl, 5mM KP<sub>i</sub> (pH 8.3) und 50mM Thymidin (ebenfalls eiskalt), die 1mg (frisch gelöstes) Na-Borohydrid enthielt,

zugegeben, gemischt und die Lösung (im offenen Eppendorf-Reaktionsgefäß) im Kühlraum (2°C) für 15h im Dunkeln inkubiert. [Das Thymidin in der Reaktion reagiert mit Boran, das aus Na-Borohydrid in Wasser entsteht. Anderenfalls würde das Boran, das zu Doppelbindungen konjugiert liegende Carbonylgruppen präferentiell hydriert, Basen reduzieren, die nicht photochemisch modifiziert wurden.] Anschließend wurden 250µl 0.7mM Na-Acetat pH 5.0 zugegeben, die Reaktion für 1h bei Raumtemperatur (mit gelegentlichem "Vortexen") inkubiert und die DNA mit 750µl Ethanol präzipitiert. Das trockene Pellet wurde in 170µl 0.5M Na-Acetat pH 5.0 aufgenommen und unter gelegentlichem "Vortexen" eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100µl H<sub>2</sub>O und 750µl Ethanol zugegeben und die DNA präzipitiert. Die getrocknete DNA wurde in 4µl H<sub>2</sub>O gelöst und nach Zugabe von 50µl Anilin-Essigsäure pH 4.5 für 20 min im Dunkeln bei 60°C inkubiert. Danach wurde die Probe im Ethanol-Trockeneis-Bad eingefroren und im Vakuum-Konzentrator lyophilisiert. Das Einfrieren und Lyophilisieren wurde mit 25µl H<sub>2</sub>O dreimal wiederholt und die DNA wurde anschließend zweimal mit Ethanol präzipitiert. Von der so behandelten DNA wurden 3µg in die ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion eingesetzt und wie oben beschrieben (s. *in vivo* DMS-"footprinting") verfahren.

#### b. Bestrahlung von proteinfreier ("nackter") DNA *in vitro*

10µg gereinigter genomischer DNA wurden in 10µl H<sub>2</sub>O gelöst und in einer Mikrotiterplatte (mit 96 "wells") für 60 Sekunden mit 12mW/cm<sup>2</sup> UV (254nm) bestrahlt (=7200J/m<sup>2</sup>). Die bestrahlte DNA wurde dann, parallel mit der *in vivo* bestrahlten DNA, wie unter (a.) beschrieben behandelt.

#### ***In vitro* Dimethylsulfat-"footprinting"**

AP-1 wurde aus Dignam-Kernextrakt affinitätsgereinigt, der aus TPA-behandelten HeLa-Zellen (Endkonzentration 100ng/ml TPA, für 90 min) präpariert wurde, wie in Angel et al. (1987b) beschrieben. (Jedoch wurde der Heparin-Sepharose-



Reinigungsschritt ausgelassen.) Die TRE-Affinitäts-Matrix (multimerisiertes Kollagenase-TRE Oligonukleotid, an Sepharose gekoppelt) wurde freundlicherweise von Stephan Gebel, IGT, Kernforschungszentrum Karlsruhe zu Verfügung gestellt.

20 $\mu$ g des Plasmids -517/+63CAT (Angel et al., 1987a), das die menschliche Kollagenase-Gensequenz zwischen den Nukleotidpositionen (bezogen auf den Transkriptionsstart, +1) -517 (HindIII) bis +63 (XhoI) enthält, wurden zunächst mit XhoI geschnitten und an der XhoI-Schnittstelle (nach Dephosphorylierung) mit T4-Polynukleotidkinase und [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (nicht-kodierender Strang; siehe allg. Arbeitsmethoden) bzw. durch Auffüllen des überhängenden DNA-Endes, in Anwesenheit von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, (kodierender Strang) radioaktiv markiert. Dazu wurde das XhoI-linearisierte Plasmid in 18 $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und es wurden 3 $\mu$ l 10xKlenow-Puffer (500mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT und 500 $\mu$ g/ml BSA), 3 $\mu$ l 3dNTP-Lösung (2mM dATP, 2mM dGTP, 2mM dTTP), 5 $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham, 10mCi/ml, 3000Ci/mmol) und 1 $\mu$ l 5u/ $\mu$ l Klenow-Fragment (der DNA-Polymerase I von E. coli) zugesetzt, gemischt und für 20 min bei 20°C inkubiert.

Die markierte DNA wurde von nichteingebautem [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP bzw. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP mittels Zentrifugation durch eine kleine selbst hergestellte Sephadex-G50-Säule (in 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß) abgetrennt, Phenol/Chloroform-extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die DNA wurde dann mit HindIII gespalten und das markierte HindIII/XhoI-Fragment nach Auftrennung auf einem 0.8% Agarosegel mit Hilfe einer DEAE-Membran (Schleicher & Schüll NA 45, 0.45 $\mu$ m, REF. NO. 417082) isoliert, nochmals Phenol/Chloroform-extrahiert und mit Ethanol gefällt.

Das markierte Fragment (30,000 cpm) wurde mit ca. 5ng affinitätsgereinigtem AP-1 in 30 $\mu$ l 20mM HEPES-KOH pH 7.9, 20% Glycerol, 100mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA und 0.5mM DTT für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 $\mu$ l 5% DMS (in 50mM Na-Cacodylat, 1mM EDTA) zupipettiert, die Reaktionen gemischt und nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe von 90 $\mu$ l 400mM Na-Acetat pH 6.9, 140mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 270 $\mu$ g/ml Hefe-tRNA gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert

und mit Ethanol gefällt. Die Piperidinspaltung der DNA-Fragmente wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die Spaltprodukte auf einem 6% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### **RNase-Protektionsanalyse zur Quantifizierung von mRNA (Melton et al., 1984)**

#### **a. Präparation von Gesamtzell-RNA**

Die Zellen von einer 14.5cm-Gewebekulturschale wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 5ml STE (100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM EDTA)/0.5% SDS lysiert. Das Lysat wurde mit einem Gummischaber abgewischt und mit 300µg/ml Proteinase K für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und die RNA wurde durch CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt. Zur Herstellung des Gradienten wurden 2ml 5.7M CsCl, 0.1mM EDTA in ein Beckman SW40-Zentrifugenröhrchen gefüllt und vorsichtig mit 5ml RNA-Lösung, zu der 2g CsCl eingewogen und gelöst wurden, überschichtet. Das Röhrchen wurde mit einer 0.4g/ml CsCl-Lösung (40g CsCl + 100ml DEPC-H<sub>2</sub>O) aufgefüllt und austariert. Die Röhrchen wurden dann für 15-16h bei 32,000 rpm und 20°C in einer Beckman Ultrazentrifuge (SW40 Rotor) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das RNA-Pellet getrocknet, in 150-200µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration der RNA bestimmt.

#### **b. Präparation der <sup>32</sup>P-markierten RNA-Proben (nach Gilman, 1987)**

Für die Synthese der murinen c-fos-RNA-Probe wurde das mit Hind III linearisierte Plasmid p149 [Gilman, 1988; enthält Maus-c-fos-Sequenz von -56 bis +109 vor dem Promotor für die SP6-Bakteriophagen-RNA-Polymerase; Probe ca. 225bp, schützt 109bp der endogenen c-fos-RNA und 128bp der fos-CAT-RNA], für die Synthese der humanen α-Globin-RNA-Probe wurde das mit XbaI linearisierte Plasmid T3α95 [Gilman, 1988; enthält humane α-Globin-Sequenz von -15 bis +95 vor dem Promotor für die T3-

Bakteriophagen-RNA-Polymerase; Probe ca. 150bp, schützt 95bp] als Matrize verwendet. Beide Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Michael Gilman, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, U.S.A., zu Verfügung gestellt.

Zur Synthese der Proben wurden 1.5µl H<sub>2</sub>O, 4µl 5xSP6-Transkriptionspuffer (200mM Tris-HCl pH 8.0, 40mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Spermidin, 250mM NaCl) bzw. T7/T3-Transkriptionspuffer (200mM Tris-HCl pH 7.5, 30mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Spermidin), 1µl 200mM DTT, 2µl 3NTP-Lösung (4mM ATP, 4mM UTP, 4mM GTP, 0.5mM EDTA, pH 8.0), 8.5µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP (Amersham, PB.20382; 20mCi/ml, 800Ci/mmol), 1µl RNase-Inhibitor aus Placenta (RNasin®, 40u/µl, Promega), 1µl 0.5mg/ml Matrizen-DNA und 1µl SP6- bzw. T3-Bakteriophagen-RNA-Polymerase (15-50u/µl, Promega) gemischt und für 60min bei 40°C (SP6-RNA-Polymerase) bzw. bei 37°C (T3-RNA-Polymerase) inkubiert. (Alle Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser hergestellt.) Zur Entfernung der Matrizen-DNA wurde die Reaktion danach mit 10u RNase-freier DNase I (Boehringer Mannheim) für 15 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurden 20µg Hefe-tRNA zugesetzt, die Reaktion mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 250µl gebracht und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 10M NH<sub>4</sub>-Acetat auf eine Endkonzentration von 2M NH<sub>4</sub>-Acetat eingestellt und mit dem 2.5-fachen Volumen Ethanol für 15 min auf Eis präzipitiert.

Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 10µl RNA-Ladepuffer (80% vol/vol deionisiertes Formamid, 1mM EDTA, pH 8.0, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF) gelöst, 5 min bei 85°C denaturiert, und auf einem 6% nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel bei 300V in 0.5xTBE aufgetrennt (bis die Bromphenolblau-Bande 2/3 der Länge des Gels gelaufen war). Nach Autoradiographie (15-30 Sekunden) des Gels, wurde die vollständige RNA-Probe ausgeschnitten, mit 400µl Elutionspuffer (0.5M NH<sub>4</sub>-Acetat, 1% SDS, 25µg/ml Hefe-tRNA) für 2.5h unter Schütteln bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und der Überstand mit 1ml Ethanol für 15 min auf Eis präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde in 50µl Hybridisierungspuffer [bestehend aus 4 Teilen Formamid und 1 Teil 5xStocklösung (200mM PIPES pH 6.4, 2M NaCl, 5mM

EDTA); der fertige Hybridisierungspuffer wurde aus den beiden Komponenten vor Gebrauch frisch hergestellt] aufgenommen und 1µl davon im Scintillationsmeßgerät gemessen.

c. Hybridisierung der radioaktiv markierten RNA-Proben mit Gesamtzell-RNA (nach Gilman, 1987)

30µg Gesamtzell-RNA wurden mit Ethanol präzipitiert und getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 30µl Hybridisierungspuffer (siehe oben), der  $5 \times 10^5$  cpm an c-fos-Probe und  $2 \times 10^5$  cpm an  $\alpha$ -Globin-Probe enthielt, gelöst. Die Reaktionen wurden 5 min bei 85°C denaturiert und danach zur Hybridisierung der Proben übernacht bei 45°C inkubiert.

d. Abbau einzelsträngiger (nicht-hybridisierter) RNA durch RNase-Behandlung

Zu jeder Hybridisierungsreaktion wurden 350µl RNase-Reaktionspuffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 5mM EDTA) und 2µg/ml RNase T1 zugegeben und die Reaktionsansätze 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 10µl 20% SDS und 2.5µl 20mg/ml Proteinase K versetzt, 15 min bei 37°C inkubiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß, das 10µg Hefe-tRNA enthielt, überführt und mit Ethanol präzipitiert. Das trockene Pellet wurde in 5µl RNA-Ladepuffer (siehe oben) gelöst und auf einem 6% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### ***In vitro* Transkription und *in vitro* Translation**

Die *in vitro* Transkriptionsreaktionen mit T7- und SP6-Bakteriophagen-RNA-Polymerasen wurden wie in Struhl (1987) beschrieben, mit linearisierten, cDNA-enthaltenden Plasmiden durchgeführt. Die Plasmide pBK-GR, pBK-jun und pBK-SRF enthalten die menschliche Glucocorticoidrezeptor-cDNA [2.5kb KpnI/DraI-Fragment aus dem Plasmid pRShGR $\alpha$  (Giguere et al., 1986)], die menschliche c-jun-cDNA [1.4kb HindIII/NotI-

Fragment aus dem Plasmid pRSV-cJ (Angel et al., 1988a)] bzw. die menschliche SRF-cDNA [1.6kb XhoI/HindIII-Fragment aus dem Plasmid p $\Delta$ Taq5'XhoI (erhalten von Richard Treisman, ICRF, London)] in dem Plasmid pBluescript II SK (Stratagene). c-fos-RNA wurde von dem Plasmid pGemfos3 (Rivera et al., 1990) synthetisiert. pBK-GR und pBK-jun wurden mit der Restriktionsendonuklease SacI, pBK-SRF mit XbaI und pGemfos3 mit BamHI linearisiert. Die *in vitro* Transkriptionsreaktionen wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 250 $\mu$ l gebracht, mit Phenol/Chloroform extrahiert und in Anwesenheit von 2M NH<sub>4</sub>-Acetat mit Ethanol präzipitiert.

Die *in vitro* Translationsreaktionen wurden in nuklease-behandeltem Reticulocytenlysate aus Kaninchen in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]Methionin, entsprechend den Angaben des Herstellers (Promega), durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 35 $\mu$ l Reticulocytenlysate, 1 $\mu$ l einer 1mM Aminosäuren-Lösung (ohne Methionin), 4 $\mu$ l L-[<sup>35</sup>S]Methionin (Amersham, 10mCi/ml, 1000Ci/mmol), 8 $\mu$ l *in vitro* synthetisierte RNA in H<sub>2</sub>O und 1 $\mu$ l RNasin<sup>®</sup> (40u/ $\mu$ l, Promega). Die Reaktionen wurden für 60 min bei 30°C inkubiert.

### **Coomassie-Färbung von Proteinen, die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt wurden**

Die Gele wurden zum Färben in Coomassie-Färbelösung [1g Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) gelöst in 46% Methanol, 8% Essigsäure und 46% H<sub>2</sub>O] für 10-15 min unter Schütteln inkubiert. Das Entfärben erfolgte in 50% Methanol, 7.5% Essigsäure und 42.5% H<sub>2</sub>O.

### **Silberfärbung von Proteinen, die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt wurden**

Das Gel wurde zunächst für 1.5h in 40% Methanol/12% Essigsäure fixiert und anschließend zweimal für 20 min in 30% Ethanol gewaschen. Danach wurde das Gel für 1 min in (frisch angesetzter) 0.02% Na-Thiosulfat-Lösung inkubiert, dreimal für 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült und für 20 min in 0.2%

AgNO<sub>3</sub>/0.03% Formaldehyd inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 1 min erfolgte die Entwicklung des Gels in 6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02% Formaldehyd und 0.0004% Na-Thiosulfat. Anschließend wurde das Gel zweimal für 2 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und in Fixierungslösung (siehe oben) aufbewahrt.

### **Transfer von gelaufgetrennten Proteinen auf Membranen und Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper ("Western blotting")**

Die Proteine wurden durch Elektrotransfer (in einer EMBL "wetblot"-Kammer) in Transferpuffer (48mM Tris-base, 100mM Glycin, 0.1% SDS, 20% Methanol) bei 40-50V (300-400mA) für 6-16h auf Immobilon™-P Transfermembran [(Millipore, Porengröße 0.45µm), aktiviert durch kurzes Spülen in Methanol] oder auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll, Porengröße 0.45µm) übertragen.

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden die gelaufgetrennten Proteine auf eine Immobilon™-P Transfermembran transferiert, die Membran kurz in PBS gewaschen und für 2-16h in einer Lösung aus 10% Magermilchpulver in PBS bei Raumtemperatur inkubiert um eine spätere, unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Die Membran wurde anschließend kurz in PBS gewaschen und mit dem Primärantikörper (Kaninchen Antiserum, spezifisch für das zu detektierende Protein; 1:500-1:1,000 verdünnt) in 10% Magermilchpulver in PBS/0.3% Tween 20 für 1h bei Raumtemperatur (Membran und antikörperhaltige Lösung eingeschweißt in kleinen Plastikbeutel) unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal für 10 min in PBS/0.3% Tween 20 gewaschen und mit einer an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Schaf-anti-Kaninchen Immunglobulin G-Fraktion (1:1,000-1:2,000 verdünnt) in 10% Magermilchpulver in PBS/0.3% Tween 20 für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem, 10-minütigen Waschen in PBS/0.3% Tween 20 wurden die Proteinbanden über die gebundenen Sekundärantikörper fluorographisch (Amersham ECL "western blotting reagent" RPN 2106, entsprechend den Angaben des Herstellers

verwendet) sichtbar gemacht.

## **Herstellung von anti-trpE-SRF-Antisera in Kaninchen**

a. Präparation von rekombinantem trpE-SRF-Fusionsprotein aus Bakterien.

Zur Herstellung von rekombinantem trpE-SRF-Fusionsprotein wurde die menschliche SRF-cDNA als XhoI/HindIII-Fragment (ca. 1.6kb) aus dem Plasmid p $\Delta$ Taq5'XhoI zwischen die Sall- und HindIII-Schnittstellen des bakteriellen Expressionsvektors pATH3 kloniert. pATH3 ist eine Leserastervariante (in der multiplen Klonierungsstelle) des Plasmids pATH2 (Angel et al., 1988a) und erlaubt eine vom E. coli Tryptophan-Operonpromotor gesteuerte Expression von Fusionsproteinen, die aus dem bakteriellen trpE-Protein (N-terminal, 37kD) und dem Produkt der eingesetzten cDNA bestehen. Zur Herstellung des trpE-SRF-Fusionsproteins wurde das Plasmid, pATH3-SRF, in E. coli DH5 eingebracht und eine Kolonie in 2ml LB mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin übernacht bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden dann 1:100 in M9-Minimalmedium (6g Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g NaCl und 1g NH<sub>4</sub>Cl pro Liter H<sub>2</sub>O), ergänzt mit 0.5% Casaminosäuren, 2mM Mg(Acetat)<sub>2</sub>, 10 $\mu$ g/ml Thiamin-HCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2% Glucose, 100 $\mu$ g/ml Ampicillin und 20 $\mu$ g/ml L-Tryptophan, verdünnt und für 20-24h bei 37°C kultiviert. Zur Präparation des Fusionsproteins im großen Maßstab wurden Bakterien aus dieser Kultur 100fach in 200ml M9-Minimalmedium, ergänzt mit 0.5% Casaminosäuren, 2mM Mg(Acetat)<sub>2</sub>, 10 $\mu$ g/ml Thiamin-HCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2% Glucose und 100 $\mu$ g/ml Ampicillin, verdünnt und für 15-16h bei 37°C wachsen lassen. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5,000g, 5 min), das Bakteriensediment in 30ml 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 1mg/ml Lysozym resuspendiert und 1h auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde danach zweimal eingefroren (Ethanol/Trockeneis-Bad) und aufgetaut (37°C) und anschließend dreimal für 15 Sekunden ultraschallbehandelt. Die unlöslichen Bestandteile wurden 10 min bei 25,000g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit je 5ml 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5M NaCl, 0.5% NP40 und dreimal mit je 5ml 10mM Tris-HCl pH

8.0, 1mM EDTA, 0.5% NP40 gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 2.5ml 6M Harnstoff gelöst (15-20 min bei 37°C, unter Schütteln) und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde gegen 200ml 20mM HEPES-KOH pH 7.9, 20% Glycerol, 100mM KCl, 12.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 1mM DTT dialysiert (dreimal 30 min bei 4°C). Die während der Dialyse ausgefallenen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand durch Zugabe von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu einer Endkonzentration von 40% (d.h. 0.242g/ml) präzipitiert. Das Präzipitat wurde in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel (14x14cm) über die gesamte Breite aufgetrennt. Ein Seitenstreifen des Gels (umfaßte Proteinmarker und ca. 0.5cm der Proteinbanden) wurde mit Coomassie-Blau gefärbt und die entsprechende, auf gleicher Höhe liegende Region des Gels, die die trpE-SRF-Fusionsproteinbande (ca. 100kD) enthielt, wurde ausgeschnitten.

b. Immunisierung der Kaninchen und Präparation von Seren (nach Harlow & Lane, 1988)

Zur Immunisierung wurden zwei weiße weibliche Kaninchen, "Jacky" und "Sam", verwendet. Die ausgeschnittene Gelbande, die das Fusionsprotein von zwei 200ml-Bakterienkulturen enthielt, wurde zerkleinert (durch wiederholtes Pressen durch eine 5ml Spritze) und mit dem gleichen Volumen (400µl) Freund'schem Adjuvans (Gibco) zwischen zwei Glasspritzen gemischt (ca. 50 mal). Zur Primärimmunisierung wurde das Antigen mit *komplettem* Freund'schem Adjuvans gemischt. Die Emulsion (maximal 800µl) wurde subcutan, im Nackenbereich der Tiere injiziert. Für die folgenden Antigen-Injektionen ("Boosts") wurde das Antigen mit *inkomplettem* Freund'schem Adjuvans gemischt. Die "Boosts" (3-6 pro Tier) erfolgten in Abständen von 4-5 Wochen. Den Tieren wurde 9-10 Tage nach der Injektion Blut (10-20ml) aus der seitlichen Ohrvene abgenommen. Das abgenommene Blut wurde für 30-60 min bei Raumtemperatur gerinnen lassen und der Blutkuchen wurde anschließend mit einem Skalpell von der Wand des Sammelröhrchens (Polypropylen) abgelöst und zerteilt. Die Blutkuchenteile wurden



danach durch Zentrifugation (10,000g, 10 min, 4°C) entfernt und der Überstand (Serum) bei -80°C in Aliquots eingefroren. In Gebrauch befindliche Aliquots der Seren wurden bei 4°C gelagert.

### **Immunpräzipitationen**

Für die Immunpräzipitationen wurden die Immunglobuline der Präimmunseren und der Antiseren zuerst für 1h bei 4°C an Protein A-Sepharose® CL-4B (Pharmacia) [gequollen in TSA (10mM Tris-HCl pH 8.0, 140mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>)] gekoppelt (3µl Serum pro 25µl gequollene, 1:2 in TSA verdünnte Protein A-Sepharose). RIPA-Zellysate oder Retikulocytenlysat, das mit RIPA (50mM Tris-HCl pH 8.0, 125mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5% Na-Desoxycholat, 0.1%SDS) auf ein Volumen von 300µl verdünnt wurde, wurden zuerst mit Präimmunserum/Protein A-Sepharose (25µl) für 1h bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde kurz abzentrifugiert (10 Sekunden in Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Überstand nochmals mit Präimmunserum oder dem spezifischen Antiserum, gekoppelt an Protein A-Sepharose für 2h bei 4°C inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Präzipitate viermal mit RIPA und einmal mit PBS gewaschen, mit Laemmli-Probenpuffer für 5 min aufgekocht und über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### **Zweidimensionale Peptidkartierung von <sup>32</sup>P-markiertem SRF**

Zwei 6cm-Gewebekulturschalen mit F9-Teratokarzinom-Stammzellen wurden zunächst für 1.5h in je 1.5ml phosphatfreiem DMEM (ohne Tryptophan, Serva), ergänzt mit 16mg L-Tryptophan und 3.7g NaHCO<sub>3</sub> pro Liter Medium, kultiviert und danach mit 80µl (800µCi) [<sup>32</sup>P]Orthophosphat (Amersham, PBS 13 Phosphorus 32, 10mCi/ml) für insgesamt 165min bei 37°C markiert. Bei TPA-Behandlung der Zellen (100ng/ml Endkonzentration) wurde das TPA 15 min bzw. 45 min vor der Ernte der Zellen zugegeben. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in RIPA, ergänzt mit 1mM DTT, Phosphataseinhibitor-Mix (Endkonzentrationen: 10mM EDTA,

2mM ZnCl<sub>2</sub>, 20mM NaF, 10mM Na-Pyrophosphat, 20mM Na-Molybdat), je 1µg/ml Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin und 0.1mM Benzamidin, lysiert. Das Lysat wurde für 20 min bei ca. 128,000g (60,000 rpm, Rotortyp TLA-100.3) in einer Beckman Tischultrazentrifuge geklärt und der Überstand mit anti-trpE-SRF-Antiserum immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in 35µl Laemmli-Probenpuffer für 5min bei 95°C inkubiert, auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Präzipitate von den Zellen zweier 6cm-Schalen pro Spur) und anschließend durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen ("Western-blotting"). Die Membranen wurden für 3Tage autoradiographiert und die SRF-Banden ausgeschnitten.

Die Membranstücke wurden dann in 200µl 0.5% Polyvinylpyrrolidon-360, 100mM Essigsäure für 30 min bei 37°C inkubiert, kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und in 150-200µl 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (frisch hergestellt) mit 10µg Chymotrypsin für 3h bei 37°C behandelt. Nach dieser Zeit wurden nochmals 10µg Protease zugegeben und die Inkubation für weiter 3h fortgesetzt. Die Flüssigkeit wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Membranstückchen mit 1ml H<sub>2</sub>O gewaschen und beide Flüssigkeiten wurden vereint. Die Proben wurden dann im Ethanol/Trockeneis-Bad gefroren und im Vakuum-Konzentrator ("speed-vac") bei 4°C übernacht lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 1ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und erneut lyophilisiert. Anschließend wurden die Peptide mit Perameisensäure (aus 1 Volumen 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 9 Volumina 98% Ameisensäure über 60 min bei Raumtemperatur gebildet) für 60 min bei 0°C oxidiert und die Lösung nach Zugabe von 1ml eiskaltem H<sub>2</sub>O und Durchmischen gefroren und übernacht lyophilisiert. Die Peptide wurden in 300µl pH 1.9 Puffer (6% Ameisensäure, 1.25% Essigsäure, 0.25% Pyridin, 92.5% H<sub>2</sub>O) gelöst, die unlöslichen Bestandteile ab-zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut lyophilisiert. Die Peptide wurden schließlich in 5µl pH 1.9 Puffer aufgenommen und punktförmig auf eine 20x20cm Dünnschichtchromatographie-(DC)-Fertigplatte mit Cellulose-Beschichtung (0.1mm) (Merck, Art. 5716) aufgetragen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte in der ersten Dimension durch Elektrophorese der mit pH 1.9 Puffer befeuchteten DC-Platten bei 1000V (23-25mA) für 25 min. Die

Platten wurden übernacht getrocknet und zur Auftrennung der Peptide in der zweiten Dimension in 37.5% n-Butanol, 25% Pyridin, 7.5% Essigsäure und 30% H<sub>2</sub>O für 4.5h chromatographiert. Nach dem Trocknen wurden die Platten bei -80°C mit einer Verstärkerfolie für 2-3 Wochen exponiert.

## Ergebnisse

### A. Präformierte DNA-Protein-Komplexe *in vivo* in der Regulation des c-fos-Protoonkogens

Die früheste nachweisbare Veränderung in der Genexpression nach Behandlung von Zellen mit Phorbolster-Tumorpromotoren ist die Aktivierung der Transkription von "immediate early"-Genen (IEG) (Greenberg & Ziff, 1984; Lau & Nathans, 1987; Almendral et al., 1988), wie z. B. der Protoonkogene c-fos und c-jun (als Übersichtsartikel s. Rahmsdorf & Herrlich, 1990). Die Transkriptionsaktivierung des c-fos-Gens ist, wie die anderer IEG, transient und erreicht 15 Minuten nach Stimulierung der Zellen ein Maximum (Greenberg & Ziff, 1984). Die Transkription wird anschließend sehr schnell durch einen proteinsynthese-abhängigen Mechanismus abgeschaltet (Greenberg et al., 1986). Die Aktivierung der c-fos-Transkription durch Serumwachstumsfaktoren und Phorbolster wird durch eine DNA-Sequenz im 5'-flankierenden Bereich des c-fos-Gens, dem SRE vermittelt (Treisman, 1985 und 1986; Fisch et al., 1987; Büscher et al., 1988; Siegfried & Ziff, 1989). Das SRE vermittelt auch die sich daran anschließende schnelle Abschaltung der Transkription und ist notwendig und ausreichend für die transiente Aktivierung des c-fos-Gens (König et al., 1989; Rivera et al., 1990). Unmittelbar 3' vom SRE befindet sich eine AP-1-ähnliche Bindungsstelle (Piette & Yaniv, 1987; Sassone-Corsi et al., 1988; Schönthal et al., 1989; Fisch et al., 1989), deren Funktion jedoch nicht klar ist. Das c-fos-SRE kann verschiedene Proteine binden (Treisman, 1990; Rivera & Greenberg, 1990 und Referenzen darin; Metz & Ziff, 1991), wobei das bisher am besten charakterisierte Protein der "Serum Response Factor" (SRF) (Treisman, 1987; Schröter et al., 1987; Prywes & Roeder, 1987; Norman et al., 1988) ist. SRF bindet als Dimer (Norman et al., 1988; Schröter et al., 1990) und die Bindung von SRF an das SRE ist sowohl für die positive als auch für die negative Transkriptionskontrolle über das SRE notwendig (Greenberg et al., 1987; Treisman, 1987; Leung & Miyamoto, 1989; Shaw et al., 1989a; Rivera et al., 1990). SRF kann zusammen mit dem "Ternary Complex Factor" (p62<sup>TCF</sup>) und dem SRE einen

ternären Komplex ausbilden (Shaw et al., 1989b; Schröter et al., 1990). Die Funktion von p62<sup>TCF</sup> und des ternären Komplexes ist nicht vollkommen klar, jedoch legen es Ergebnisse von zwei Gruppen nahe, daß seine Bildung für die Induktion der c-fos-Transkription durch Serum bzw. Phorbol ester unabdingbar ist (Shaw et al., 1989b; Graham & Gilman, 1991).

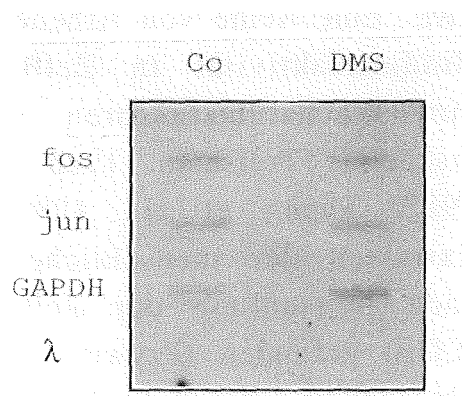
Da SRE-ähnliche Sequenzen auch in anderen IEG vorkommen (Mohun et al., 1987; Kawamoto et al., 1989; Chavrier et al., 1989; Christy & Nathans, 1989), könnte die Aufklärung des Mechanismus, über den die SRE-Aktivität moduliert wird, nicht nur zum Verständnis der Genaktivierung durch Phorbol ester-Tumorpromotoren beitragen, sondern auch den Mechanismus der "immediate early"-Antwort der Zelle klären, die für die Zellproliferation notwendig ist (Nishikura & Murray, 1987; Riabowol et al., 1988; Almendral et al., 1988).

### 1. *In vivo* DNA-Protein-Interaktionen am c-fos-SRE

Eine Möglichkeit, wie die Aktivität des c-fos-SRE reguliert werden könnte, ist die Modulation der Bindung von SRF bzw. von p62<sup>TCF</sup> und SRF (die mit dem SRE einen ternären Komplex bilden) an das SRE. Eine Reihe von Arbeiten haben gezeigt, daß, *in vitro*, die SRE-Bindungsaktivität in Zellkernextrakten aus unbehandelten und mit Wachstumsfaktoren stimulierten Zellen nicht verändert erscheint (Treisman, 1986; Fisch et al., 1987; Greenberg et al., 1987; Sheng et al., 1988). Die einzige Ausnahme wurde in Extrakten der menschlichen epidermalen Karzinomzelllinie A431 nach Behandlung der Zellen mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) gefunden (Prywes & Roeder, 1986). Allerdings zeigten *in vivo* "footprinting"-Analysen des c-fos-Promotors in diesen Zellen, daß das SRE und die angrenzende AP-1-ähnliche Bindungsstelle (vor und während der Stimulation der Zellen mit EGF) konstitutiv mit einem Multiproteinkomplex besetzt sind (Herrera et al., 1989). *In vitro* Methylierungs-Studien mit isolierten Proteinen legen es nahe, daß der Multiproteinkomplex ein SRF-Dimer, p62<sup>TCF</sup> und mindestens ein anderes Protein proximal von SRF umfaßt (Herrera et al., 1989).

Um zu überprüfen, ob das c-fos-SRE und die angrenzende AP-1-ähnliche Bindungsstelle *in vivo* auch in anderen Zellen konstitutiv besetzt sind und ob, bzw. wie Phorbolster-Tumorpromotoren die Besetzung des SRE mit Proteinen beeinflussen, habe ich *in vivo* (genomische) Dimethylsulfat (DMS)-"footprinting"-Analysen durchgeführt. Als Zelllinien habe ich die embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 und undifferenzierte F9-Teratokarzinom-Stammzellen gewählt. Mit NIH 3T3-Zellen wurde die Mehrzahl der Experimente zur c-fos-Induktion durchgeführt (Treisman, 1990 und Referenzen darin) und die "immediate early"-Antwort ursprünglich beschrieben (Greenberg & Ziff, 1984; Greenberg et al., 1986; Almendral et al., 1988). NIH 3T3-Zellen zeigen außerdem eine sehr geringe basale Expression von c-fos (Bravo et al., 1986). F9-Zellen exprimieren ohne Stimulation c-fos nicht (Kryszke et al., 1987; Müller & Wagner, 1984; Rütter et al., 1985); jedoch kann die Transkription des c-fos-Gens durch Phorbolster-Behandlung induziert werden (Yang-Yen et al., 1990a; diese Arbeit).

**Abb. 1** "Nuclear run-on"-Analyse der Transkription von Genen in NIH 3T3-Zellen. Co, unbehandelte Zellen; DMS, die Zellen wurden für 2 min mit 0.5% DMS (in DMEM/10mM HEPES pH 7.5) behandelt; das DMS wurde anschließend mit DMEM ausgewaschen und Zellkerne wurden nach einer 15-minütigen Inkubation der Zellen bei 37°C präpariert; fos, c-fos-Gen; jun, c-jun-Gen; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-

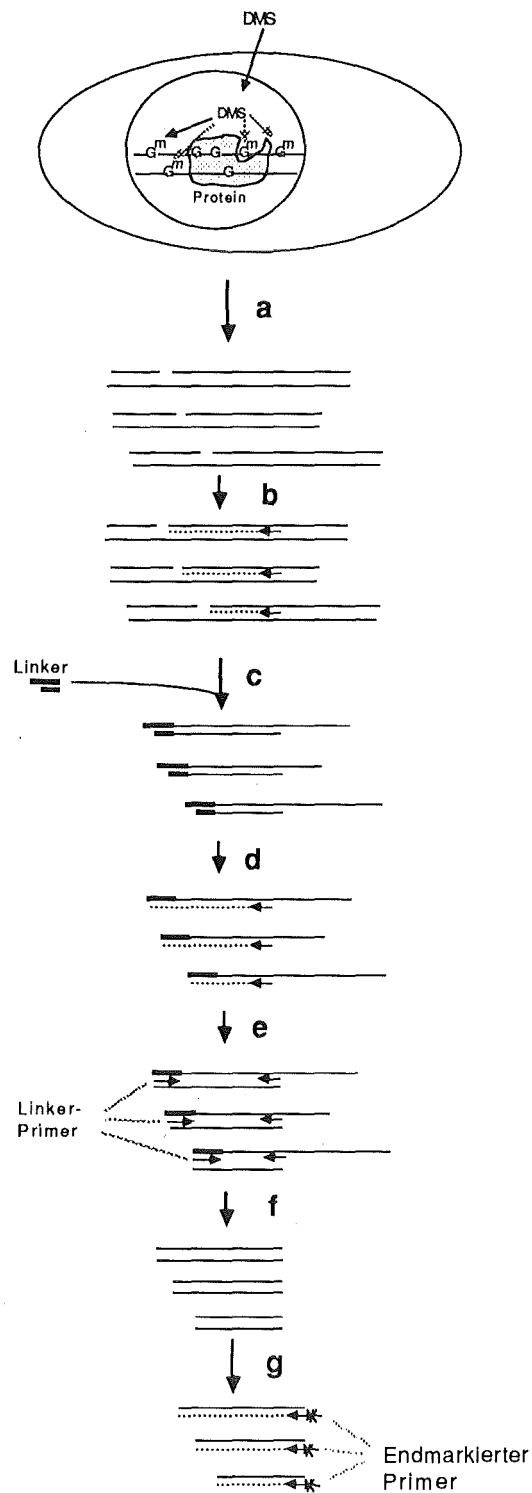


Dehydrogenase-Gen; λ, Lamda-Phagen-DNA als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung. Das Bild zeigt ein Autoradiogramm der mit radioaktiv markierten Transkripten hybridisierten Gen-Sequenzen, die auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert wurden.

Die genomischen "footprinting"-Analysen wurden mit partiell methylierenden Dosen von DMS als DNA-modifizierendem Agens (Maxam & Gilbert, 1980) durchgeführt. Um zu prüfen, ob eine solche DMS-Behandlung der Zellen (0.5% DMS, 2 Minuten) eventuell selbst schon zu einer schnellen Aktivierung der c-fos-Transkription führt, wurden NIH 3T3-Zellen für 2 min mit DMS behandelt. Das DMS wurde danach ausgewaschen und die Zellen zur Detektion einer möglichen Transkriptionsinduktion für 15 min bei 37°C inkubiert. Wenn eine 2-minütige DMS-Behandlung zu einer schnellen Aktivierung der c-fos-Transkription führt, sollte nach 15 min eine erhöhte Transkriptionsrate meßbar sein. Zur Bestimmung der Transkriptionsrate wurden "nuclear run-on"-Experimente (McKnight & Palmiter, 1979) mit Zellkernen aus unbehandelten und DMS-behandelten Zellen durchgeführt. In "nuclear run-on"-Experimenten wird in isolierten Zellkernen der Einbau von radioaktiv markiertem UTP in entstehende RNA-Moleküle gemessen. Die DMS-Behandlung führte zu keiner meßbaren Transkriptionserhöhung des c-fos-Gens (Abb. 1). Als Kontrolle, ob gleiche Mengen an radioaktiv markierten Transkripten bei der Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen verwendet.

DMS diffundiert sehr rasch in die Zelle und den Zellkern (Church & Gilbert, 1984). Es methyliert präferentiell die N-7-Position von Guaninresten in der großen DNA-Rinne ("major groove") und mit geringerer Effizienz auch die N-3-Position von Adeninen (in der "minor groove"). Proteine, die spezifisch mit DNA-Sequenzen interagieren, können die Methylierung der Guanine (oder Adenine) entweder abschwächen oder verstärken (Gilbert et al., 1976; Ogata & Gilbert, 1978). Die DNA kann dann an den Stellen modifizierter Basen durch Piperidin gespalten werden (Maxam & Gilbert, 1980 und Referenzen darin). Die Spaltprodukte wurden durch selektive Amplifikation mit Hilfe der ligationsvermittelten Polymerasekettenreaktion (LMPCR) (Mueller & Wold, 1989) detektiert (s. Schema in Abb. 2). Die Positionen der verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Abb. 3 dargestellt.

**Abb.2** Schematische Darstellung der genomischen "footprinting"-Technik durch ligationsvermittelte PCR (nach Mueller & Wold, 1989). Nach Behandlung von Zellen mit DMS-Dosen, die zu einer partiellen Methylierung der DNA *in vivo* führen, wird die genomische DNA aus den Zellen isoliert und an methylierten Guaninen mit Piperidin gespalten (a) (hier nur für einen Strang gezeigt). Dadurch entstehen Enden mit 3'- und 5'-endständigen Phosphaten (Maxam & Gilbert, 1980). Im folgenden Schritt (b) wird ein Ende der Sequenzleiter durch Hybridisierung mit einem genspezifischen Oligonukleotid-Primer (Primer 1, Pfeil) festgelegt. Durch Verlängerung dieses Primers (gestrichelte Linie) bis zu den unterschiedlichen Spaltstellen wird eine Population von "blunt-End"-DNA-Duplexmolekülen erzeugt. An jedes der so erzeugten DNA-Moleküle wird durch T4-DNA-Ligase ein spezieller Linker (fettgedruckte Linien) ligiert (c), wodurch die Moleküle ein gemeinsames Ende erhalten. Die genomische DNA stellt dabei das 5'-Phosphat für die Ligation bereit.



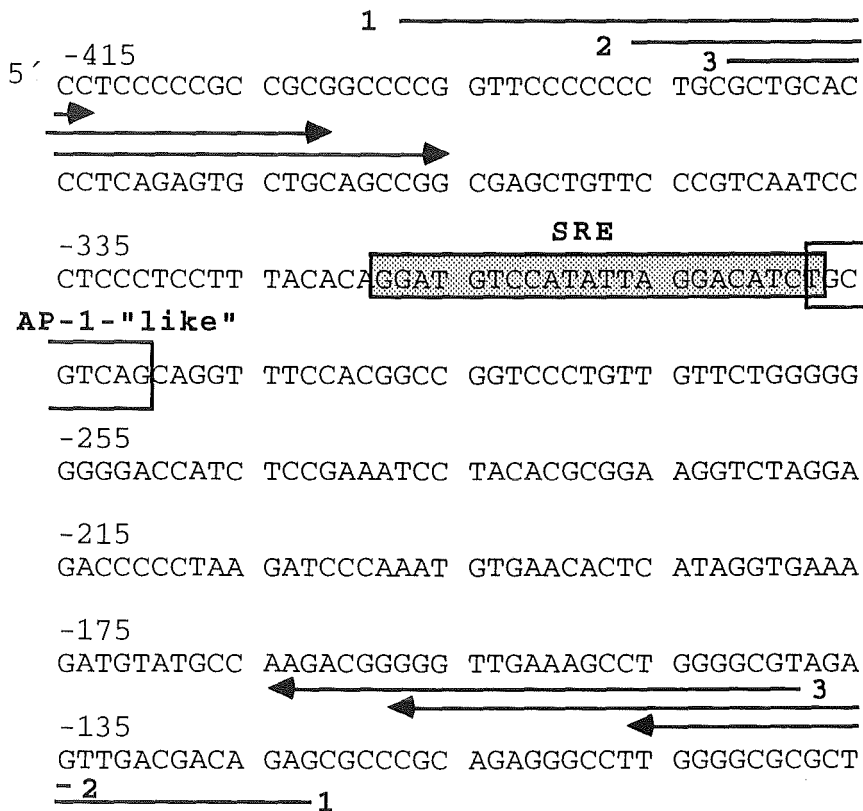
Der überwiegende Teil der genomischen DNA dient nicht als Substrat in der Ligrationsreaktion, da er keine doppelsträngigen "blunt"-Enden aufweist. Der Linker ist nicht phosphoryliert und besitzt auf einer Seite ein überhängendes Strangende, so daß Selbstligation vermieden wird und eine Ligation nur in einer Orientierung erfolgen kann. Die DNA wird dann denaturiert und mit einem zweiten genspezifischen



Primer (Primer 2, Pfeil) hybridisiert, der anschließend verlängert wird (gestrichelte Linie) (d). (Um die Spezifität zu erhöhen wird der zweite Primer so gewählt, daß er den ersten in 3'-Richtung überragt.) In dieser Reaktion dient wiederum die genomische DNA als Matrize, die nun jedoch den längeren Strang des Linkers kovalent gebunden hat. Nach Verlängerung des Primers hat nun jedes DNA-Molekül der Sequenzleiter zwei definierte Enden (das lange Linker-Oligonukleotid und den zweiten genspezifischen Primer), wodurch die Möglichkeit zur PCR (als Übersichtsartikel s. Saiki et al., 1988; White et al., 1989) gegeben ist (e, f). In der Praxis werden die Schritte d-f in einer Reaktion durchgeführt. Die so amplifizierten Fragmente ( $10^4$ - $10^5$ -fache Amplifikation) der Sequenzleiter werden dann unter Verwendung eines  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten Oligonukleotids (Primer 3, Pfeil mit Sternchen) durch einen einzigen Verlängerungsschritt (getrichelte Linie) (g) radioaktiv markiert. Die Sequenzleiter wird anschließend, nach Auftrennung über ein Standard-Sequenziergel (Maxam & Gilbert, 1980), durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

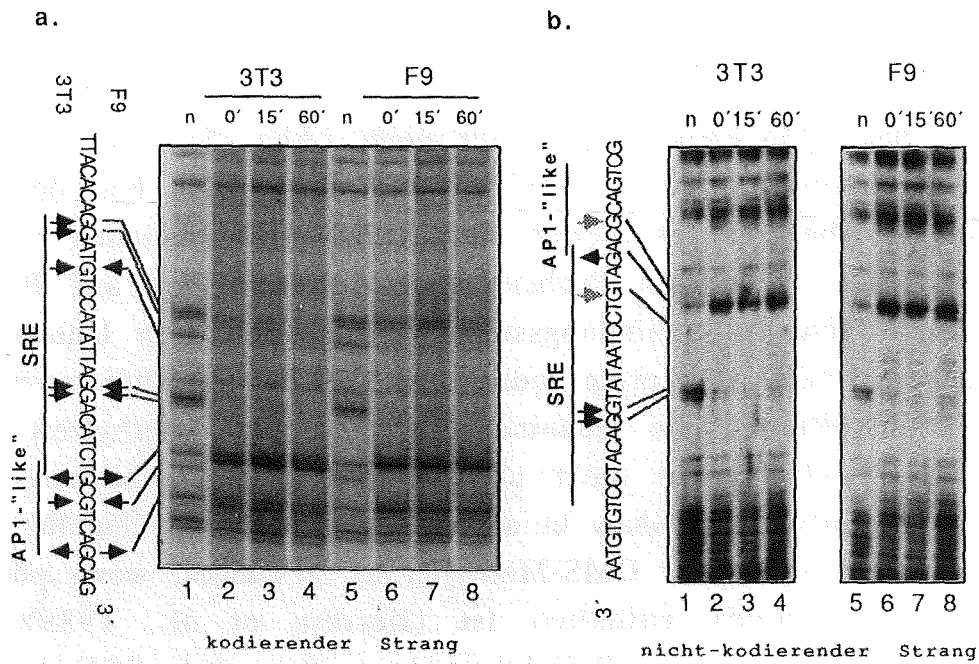
### **1.1 F9-Teratokarzinom-Stammzellen zeigen im Unterschied zu NIH 3T3-Zellen keine ternäre Komplexbildung *in vivo***

Abb. 4 zeigt ein Beispiel einer *in vivo* "footprinting"-Analyse der 5'-flankierenden Region des *c-fos*-Gens im Bereich des SRE in NIH 3T3-Zellen und in F9-Teratokarzinom-Stammzellen. Bereits in unbehandelten Zellen ist, verglichen mit proteinfreier ("nackter") *in vitro* methylierter DNA, die DMS-Reaktivität innerhalb des SRE und der angrenzenden AP-1-ähnlichen Bindungsstelle im kodierenden und nicht-kodierenden Strang an mehreren Guaninen verändert. In NIH 3T3-Zellen sind im kodierenden Strang des SRE fünf Guanine vor Methylierung geschützt und in der AP-1-ähnlichen Bindungsstelle ist die DMS-Reaktivität von einem Guanin verringert und die von zwei Guaninen erhöht (Abb. 4a). Im nicht-kodierenden Strang sind im SRE zwei deutlich sichtbare Guanine und ein (nur schwach detektierbares) Guanin vor Methylierung geschützt; ein weiteres Guanin am Übergang zur AP-1-ähnlichen Bindungsstelle wird hypermethyliert. In der AP-1-ähnlichen Bindungsstelle ist ein (allerdings nur schwach sichtbares) Guanin vor Methylierung geschützt (Abb. 4b). Eine Zusammenfassung der Veränderungen in der *in vivo* DMS-Reaktivität der Guanine ist in Abb. 4c gezeigt. In NIH 3T3-Zellen

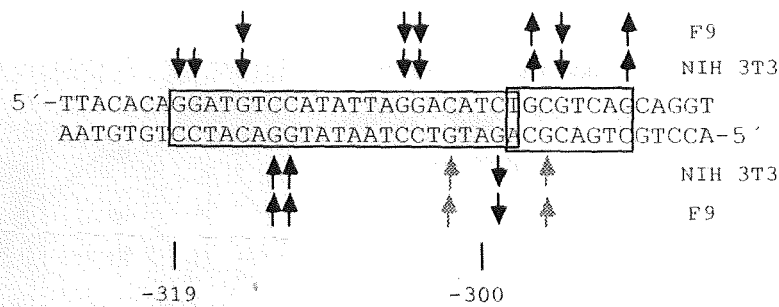


**Abb. 3** Positionen der für die ligationsvermittelte PCR (LMPCR) verwendeten Oligonukleotid-Primer im 5'-flankierenden Bereich des Maus-c-fos-Gens. Zahlen über der Sequenz (Renz et al., 1985) bezeichnen die Nukleotidpositionen bezogen auf den Startpunkt der Transkription (+1); Pfeile (1, 2, 3) markieren die Position der Primer 1, 2 und 3 (vgl. Abb. 2) für die LMPCR der Fragmente des kodierenden Stranges (Pfeile unter der Nukleotidsequenz) und des nicht-kodierenden Stranges (Pfeile über der Nukleotidsequenz).

ist das erhaltene DMS-Reaktivitätsmuster identisch mit dem in menschlichen A431-Zellen bereits beschriebenen Muster (Herrera et al., 1989). In F9-Zellen zeigt die AP-1-ähnliche Bindungsstelle dasselbe Muster wie in NIH 3T3-Zellen (Abb. 4a und b, Bahnen 2 und 6; die in NIH 3T3-Zellen auftretenden Doppelbanden beruhen auf einem Amplifikationsartefakt, der nicht in allen Experimenten auftrat). Im SRE jedoch, sind im kodierenden Strang zwei der Guanine (Positionen -319 und -318) nur sehr schwach gegen DMS geschützt (Abb.4a, Bahnen 5 und 6). Dies wurde übereinstimmend



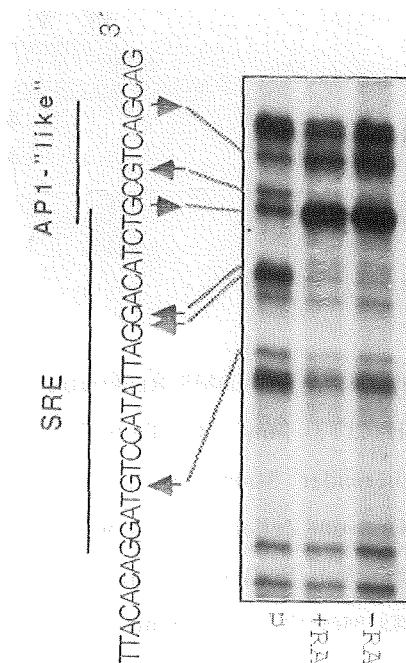
**c.**



**Abb. 4** *In vivo* DMS-Reaktivität des c-fos-SRE und seiner flankierenden Sequenzen in NIH 3T3- und F9-Teratokarzinom-Stammzellen. **a.** Kodierender Strang. **b.** Nicht-kodierender Strang. n, proteinfreie ("nackte"), *in vitro* methylierte DNA; 0', 15', 60', DNA von Zellen, die entweder unbehandelt waren oder für 15 bzw. 60 min mit TPA (100ng/ml Endkonzentration) behandelt wurden. Protektionen von Guaninen gegenüber DMS-Methylierung sind durch zur DNA-Sequenz (neben den Autoradiogrammen) hinzeigende Pfeile, Hyperreaktivitäten durch von der Sequenz wegzeigende Pfeile gekennzeichnet. Schattierte Pfeile symbolisieren schwache DMS-Reaktivitäten. **c.** Zusammenfassende Darstellung der Guaninpositionen in NIH 3T3- und in F9-Zellen, die eine veränderte *in vivo* DMS-Reaktivität aufweisen. Symbole wie oben beschrieben; Schattierter Kasten, SRE; nicht-schattierter Kasten, AP-1-ähnliche Bindungsstelle. Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen bezogen auf den Startpunkt der Transkription (+1) an.

in drei unabhängigen Experimenten beobachtet. Differenzierung der F9-Zellen mit Retinsäure (Strickland & Mahdavi, 1978) ändert das DMS-Reaktivitätsmuster nicht (Abb. 5). Die scheinbar stärkere Protektion der Guanine -319 und -318 bei den mit Retinsäure behandelten Zellen beruht auf Unterschieden in den auf das Gel geladenen Probenmengen. Normalisiert auf Banden außerhalb von Proteinbindungsstellen ergibt sich kein Unterschied zwischen undifferenzierten oder mit Retinsäure differenzierten F9-Zellen. Werden die Guanine -319 und -318 methyliert kann p62<sup>TCF</sup> *in vitro* nicht mehr an der Proteinkomplexbildung über dem SRE mitwirken (Shaw et al., 1989b) und beide Guanine sind, *in vitro*, nur dann vor DMS-Methylierung geschützt, wenn p62<sup>TCF</sup> im Proteinkomplex enthalten ist (Herrera et al., 1989); das bedeutet, daß sich die Proteinkomplexe über dem SRE in NIH 3T3- und F9-Zellen durch die An- bzw. Abwesenheit von p62<sup>TCF</sup> unterscheiden.

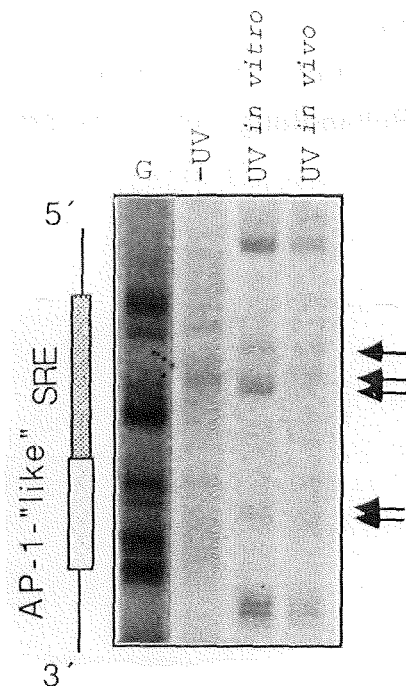
**Abb. 5** *In vivo* DMS-Reaktivität am kodierenden Strang des c-fos-SRE und seinen flankierenden Sequenzen in undifferenzierten F9-Teratokarzinom-Stammzellen (-RA) und in F9-Zellen, die für 72h mit 10<sup>-7</sup>M Retinsäure (+RA) behandelt wurden. n, proteinfreie ("nackte"), *in vitro* methylierte DNA. Protektionen von Guaninen gegenüber DMS-Methylierung sind durch zur DNA-Sequenz (neben dem Autoradiogramm) hinzeigende Pfeile, Hyperreaktivitäten durch von der Sequenz wegzeigende Pfeile gekennzeichnet.



In beiden Zelllinien scheint das c-fos-SRE jedoch bereits in unbehandelten Zellen mit Proteinen besetzt zu sein. Dies habe ich, unabhängig von der Verwendung von DMS, auch durch die

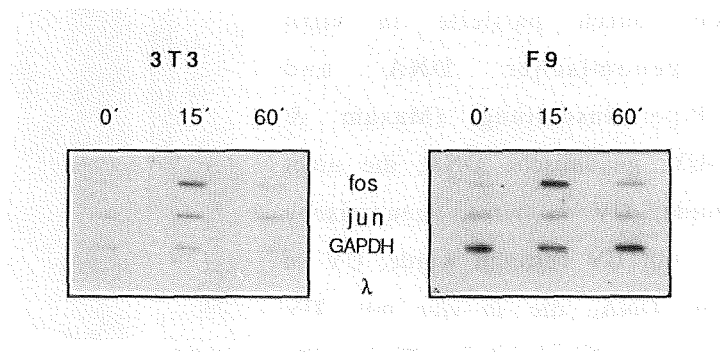
Verwendung von UV-Strahlung als DNA-modifizierendem Agens und anschließender chemischer Spaltung der DNA an photochemisch modifizierten Basen bestätigt. Diese Methode war bisher nur für Bakterien beschrieben worden ("photofootprinting", Becker & Wang, 1984). Abb. 6 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes in NIH 3T3-Zellen: Verglichen mit *in vitro* bestrahlter, proteinfreier DNA sind in lebenden Zellen mehrere Basen im SRE und der AP-1-ähnlichen Bindungsstelle vor photochemischer Modifikation geschützt. Für die Bildung von UV-Photoprodukten sind geringe, aber signifikante Verzerrungen der DNA-Doppelhelix notwendig, die durch Proteinkontakte beeinflusst werden (s. Becker & Wang, 1984 und Referenzen darin).

**Abb. 6** *In vivo* "photofootprinting" des c-fos-SRE und der angrenzenden AP-1-ähnlichen Bindungsstelle mit Hilfe von UV-Strahlung in unbehandelten NIH 3T3-Zellen. Die Zellen wurden vor dem *in vivo* "footprinting" für 36h in DMEM/0.5% FCS kultiviert. G, Guanin-Leiter, sichtbar gemacht durch partielle *in vitro* Methylierung genomischer DNA und anschließende Piperidinspaltung (Maxam & Gilbert, 1980); -UV, genomische DNA, die nicht UV bestrahlt wurde; UV *in vitro*, genomische DNA, die *in vitro* mit UV bestrahlt wurde; UV *in vivo*, genomische DNA, die *in vivo* mit UV bestrahlt wurde; Pfeile kennzeichnen Basen, die *in vivo* gegen photochemische Modifikation geschützt sind. Die Bestrahlung der DNA *in vitro* (10µl DNA-Lösung, Konzentration 1µg/µl) erfolgte mit 12mW/cm<sup>2</sup> UV (254nm) für 60 Sekunden (7200J/m<sup>2</sup>). Für die *in vivo* Bestrahlung wurden die Zellen für 10 Sekunden mit 12mW/cm<sup>2</sup> UV (1200J/m<sup>2</sup>) auf Eis bestrahlt. Die Spaltung der DNA wurde, nach Deaminierung und Reduktion durch NaBH<sub>4</sub>, mit saurem Anilin induziert (s. Material und Methoden und Becker & Wang, 1984).



## 1.2 Die *in vivo* Proteinbindung am SRE ändert sich während der Induktion der c-fos-Transkription durch Phorboltester nicht

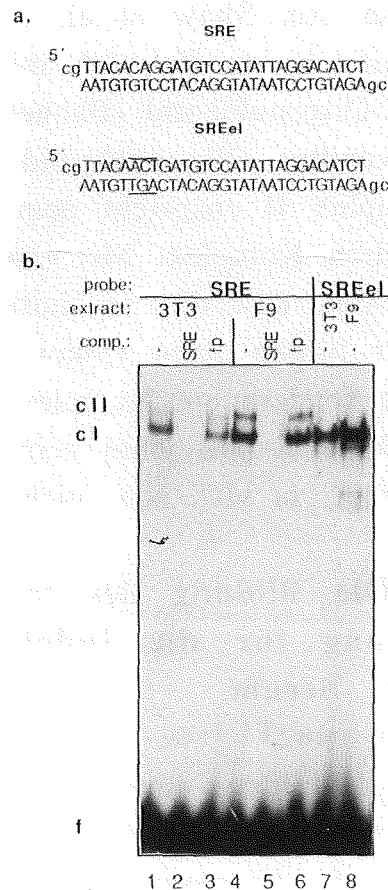
Nach Behandlung von NIH 3T3-Zellen mit dem Phorboltester-Tumorpromotor TPA für 15 und 60 min, d. h. zu Zeiten, zu denen die Transkription von c-fos maximal angeschaltet bzw. bereits wieder abgeschaltet ist (vgl. Abb. 7), ändert sich das DMS-Reaktivitätsmuster am SRE nicht (Abb. 4a und b, Bahnen 2-4); dies läßt auf eine konstitutive Bindung des Multiproteinkomplexes einschließlich p62<sup>TCF</sup> schließen. Da es Daten anderer Gruppen nahelegten, daß nur solche c-fos-Promotor-Konstrukte, die einen ternären Komplex (*in vitro*) bilden können, durch Serum in NIH 3T3-Zellen (Shaw et al., 1989b) bzw. durch Phorboltester (aber nicht durch Serum) in BALB/c 3T3-Zellen (Graham & Gilman, 1991) induziert werden können, habe ich untersucht ob p62<sup>TCF</sup>-abhängige DMS-Protektionen an den Positionen -319 und -318 nach Stimulation von c-fos in F9-Zellen mit TPA sichtbar werden. Es ließ sich jedoch weder 15 min noch 60 min nach TPA-Behandlung eine verstärkte Protektion der Guanine -319 und



**Abb. 7** "Nuclear run-on"-Analyse der Transkription in NIH 3T3-Zellen und F9-Teratokarzinom-Stammzellen, die für verschiedene Zeiten (0, 15 bzw. 60 min) mit TPA behandelt wurden. fos, c-fos-Gen; jun, c-jun-Gen; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen; λ, Lambda-Phagen-DNA als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung. Im Falle der F9-Zellen wurden 10 mal mehr radioaktiv markierte Transkripte zur Hybridisierung verwendet als im Falle der NIH 3T3-Zellen.

-318 feststellen, obwohl die c-fos-Transkription in den F9-Zellen durch TPA genauso stark wie in NIH 3T3-Zellen induziert wurde (Abb. 7). Die Transkriptionsraten des c-fos-Gens wurden durch "nuclear run-on"-Analysen mit Kernen bestimmt, die aus parallel zu den für die *in vivo* "footprinting"-Analysen behandelten Zellen präpariert wurden. Um die basale Transkription in F9-Zellen messen zu können, mußten jedoch zehnmal mehr radioaktiv markierte Transkripte zur Hybridisierung eingesetzt werden als im Falle der NIH 3T3-Zellen. Dies bedeutet, daß in F9-Zellen bei gleicher Induzierbarkeit des c-fos-Gens durch TPA, die basale Transkription im Unterschied zu NIH 3T3-Zellen stark reduziert ist. Um auszuschließen, daß eine mögliche TPA-induzierte Protektion der Guanine -319 und -318 deshalb nicht detektiert

**Abb. 8** Gelretardationsanalyse mit Zellkernextrakten (Chloroquin-Interkalations-extrakte, Schröter et al., 1987) aus NIH 3T3- und F9-Zellen. **a.** Sequenzen der benutzten Oligonukleotid-Proben; Kleinbuchstaben bezeichnen Linker-Sequenzen; mutierte Nukleotidpositionen sind durch Linien markiert. **b.** Gelretardationsanalyse; cI, Komplex I; cII, Komplex II; f, freies markiertes Oligonukleotid; comp., Kompetitor-Oligonukleotid (100-facher molarer Überschuß); fp; Oligonukleotid, das einer Sequenz aus dem 5'-nichttranslatierten Bereich (+16 bis +37) des c-fos-Gens entspricht und keine Sequenzhomologie zur SRE-Sequenz aufweist (Büscher et al., 1988; Härtig et al., 1991).



wurde, weil TPA die c-Fos-Expression in nur einer Minderheit der Zellen induziert hat, habe ich die c-Fos-Expression 90 min nach TPA-Gabe durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe von anti-Fos-Antikörpern untersucht. TPA induzierte die Expression von c-Fos in praktisch allen Zellen (Daten nicht gezeigt). Die genomischen "footprinting"-Experimente deuten also auf ein Fehlen der ternären Komplexbildung in F9-Zellen *in vivo* hin. Um zu klären, ob p62<sup>TCF</sup> in F9-Zellen vorhanden ist bzw. ob sich ein ternärer Komplex ausbilden kann, habe ich Gelretardationsexperimente mit Zellkernextrakten und einem radioaktiv markierten SRE-Oligonukleotid (s. Abb. 8a) als Probe durchgeführt. Bindet ein Protein an die Oligonukleotid-Probe, dann entsteht ein im Polyacrylamidgel, im Vergleich zum freien Oligonukleotid, langsamer wandernder DNA-Protein-Komplex. Abb. 8b zeigt, daß mit Extrakten aus NIH 3T3-Zellen (Bahn 1) und aus F9-Zellen (Bahn 4) jeweils zwei Komplexe, Komplex I (cI) und Komplex II (cII) genannt, entstehen. Diese Komplexe wurden schon von Shaw et al. (1989b) beschrieben. Die Komplexe sind spezifisch, da sie sich mit einem Überschuß an nicht-markiertem SRE-Oligonukleotid (Bahnen 2 und 5), jedoch nicht durch ein nicht verwandtes Oligonukleotid (Bahnen 3 und 6) kompetieren lassen. Komplex II entspricht dem von Shaw et al. (1989b) beschriebenen ternären Komplex: Mit einem mutierten SRE-Oligonukleotid, SREel (s. Abb. 8a), das so mutiert ist, daß sich kein ternärer Komplex mehr bilden kann (Shaw et al., 1989b), bildet sich Komplex II nicht sondern nur Komplex I (Abb. 8b, Bahnen 7 und 8).

Diese Experimente zeigen also, daß p62<sup>TCF</sup> zwar in F9-Zellen vorliegt, *in vivo* aber nicht an der Komplexbildung beteiligt ist.

## **2. Die Bildung des ternären Komplexes ist keine Voraussetzung für die Induktion von c-fos durch Phorbolster oder Serum**

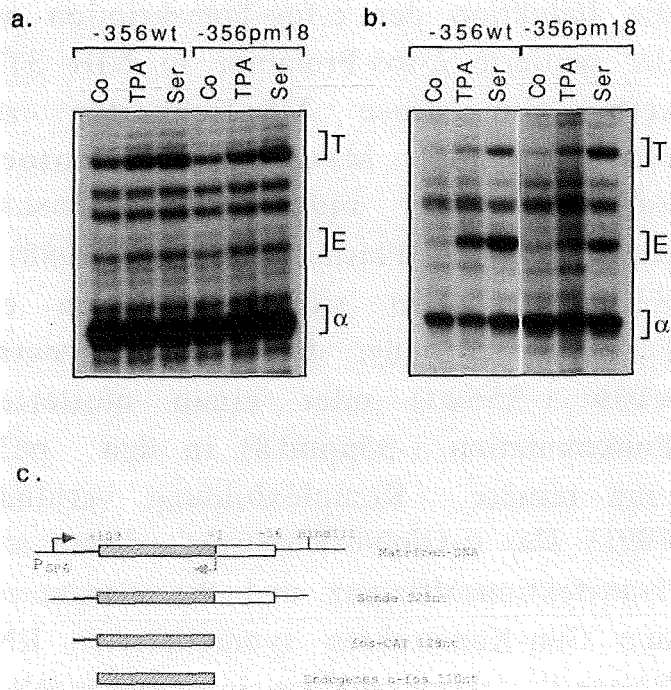
Falls p62<sup>TCF</sup> *in vivo* tatsächlich nicht an der Multiproteinkomplexbildung über dem c-fos-SRE beteiligt ist, wie es durch die genomischen "footprinting"-Experimente nahegelegt wird, sollte ein c-fos-Promotor-Konstrukt, das zwar noch SRF binden kann, aber keinen ternären Komplex mehr ausbildet, nach Transfektion in F9-Zellen in gleichem Maße durch TPA induzierbar sein wie ein



Wildtyp-Promotorkonstrukt. Wenn dagegen die Bildung des ternären Komplexes, wie er in NIH 3T3-Zellen *in vivo* auftritt, für die Induktion der c-fos-Transkription notwendig ist, dann sollte der mutierte c-fos-Promotor in NIH 3T3-Zellen nicht induzierbar sein. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurden entsprechende Maus-c-fos-Promotor-CAT-Fusionskonstrukte zusammen mit einem das menschliche  $\alpha$ -Globin-Gen exprimierenden Plasmid (Gilman, 1988) in F9- und NIH 3T3-Zellen transient transfiziert. Die c-fos-Promotor-Konstrukte enthielten entweder den Wildtyp-Promotor von Position -356 bis +109 (-356wt) oder einen mutierten Promotor mit einer Punktmutation (-356pm18) in den p62<sup>TCF</sup>-Kontaktstellen, die eine ternäre Komplexbildung verhindert (Graham & Gilman, 1991). Das  $\alpha$ -Globin-Konstrukt diente als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz und die erhaltenen RNA-Mengen. Die von den Gen-Konstrukten synthetisierten RNA-Mengen wurden durch RNase-Protektionsanalyse in unbehandelten Zellen und Zellen, die für 45 min mit TPA oder Serum behandelt wurden, bestimmt (Abb. 9). Bei der RNase-Protektionsanalyse wird eine in Anwesenheit von <sup>32</sup>P-markiertem CTP *in vitro* synthetisierte RNA-Sonde mit aus den transfizierten Zellen isolierter RNA hybridisiert und anschließend mit RNase behandelt (Melton et al., 1984). Die mit der Probe hybridisierten, doppelsträngigen RNA-Bereiche sind dabei gegen RNase-Abbau geschützt und können auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Die RNA-Sonde wurde so konstruiert (Gilman, 1988), daß sie nach Hybridisierung unterschiedlich lange Fragmente von den Transkripten des endogenen c-fos-Gens und von den transfizierten fos-CAT-Fusionskonstrukten schützt (s. Abb. 9c). Man kann somit die Transkriptmengen vom endogenen Gen und diejenigen von den transfizierten c-fos-Promotor-Konstrukten in einem Schritt bestimmen. Das mutierte Promotorkonstrukt und das Wildtyp-Promotorkonstrukt können sowohl in F9-Zellen (Abb. 9a) als auch in NIH 3T3-Zellen (Abb. 9b) durch TPA und Serum in vergleichbarem Maße induziert werden. Normalisiert man die Transfektionseffizienz auf die interne  $\alpha$ -Globin-Kontrolle, so ist das generelle Niveau der Transkription des mutierten c-fos-Promotorkonstruktes in NIH 3T3-Zellen, nicht jedoch in F9-Zellen,

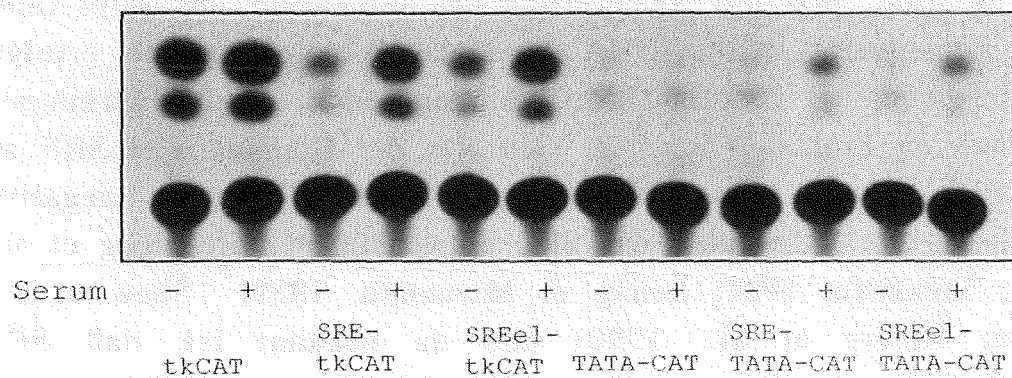
**Abb. 9** RNase-Protektionsanalyse der Expression von c-fos-Promotorkonstrukten in F9-Teratokarzinom-Stammzellen (a.) und in NIH 3T3-Zellen (b.). Die Zellen wurden entweder mit einem Wildtyp (-356wt) oder einem punktmutierten (-356pm18) c-fos-Promotor-CAT-Fusionskonstrukt (Graham & Gilman, 1991), zusammen mit einem  $\alpha$ -Globin-Kontrollplasmid (Gilman, 1988), transient transfiziert. NIH 3T3-Zellen wurden nach der Transfektion für 36h in DMEM/0,5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden entweder unbehandelt ge-

lassen (Co) oder mit TPA (100ng/ml Endkonzentration) bzw. mit Serum (Medium mit 20% FCS) behandelt. 45 min später wurde aus den Zellen RNA präpariert. T, Fragment der RNA-Sonde, das von der mRNA der transfizierten c-fos-Promotorkonstrukte geschützt wird; E, Fragment der Sonde, das von den endogenen c-fos-Transkripten geschützt wird;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Globin-Sondenfragment, das von Transkripten des  $\alpha$ -Globin-Kontrollplasmids protektiert wird. c. Schematische Darstellung der verwendeten c-fos-RNA-Sonde und der entstehenden protektierten Fragmente (Gilman, 1988). Die obere Linie stellt die verwendete DNA-Matrize dar. Scharzer Pfeil, Startpunkt der SP6 RNA-Polymerase; Schattierter Pfeil (unten), Startstelle für c-fos-Transkripte; HindIII, Restriktionsschnittstelle, mit der das Matrizen-Plasmid vor der Transkription linearisiert wurde. Die Linie darunter markiert die von dieser Matrize transkribierte RNA-Sonde; darunter sind die Sondenfragmente dargestellt, die von den endogenen c-fos-Transkripten bzw. von den Transkripten der transfizierten Konstrukte geschützt werden. Die Kästchen symbolisieren c-fos-Sequenzen; punktierte Kästchen stehen für transkribierte c-fos-Sequenzen. Die dicke Linie markiert Linker-Sequenzen, die sowohl in der Probe als auch in den c-fos-CAT-Transkripten, nicht jedoch in der endogenen c-fos-mRNA enthalten sind.



niedriger als das vom Wildtyp-Konstrukt. Dies ist zu erwarten, wenn die p62<sup>TCF</sup>-Bindung die Basalexpression des c-fos-Gens kontrolliert, in F9-Zellen jedoch nicht zum Tragen kommt.

Die Seruminduzierbarkeit in NIH 3T3-Zellen blieb auch in Konstrukten erhalten, die das SREel-Oligonukleotid (s. Abb. 8a) vor dem Herpes-Simplex-Thymidinkinase-(tk)-Promotor oder nur vor einer heterologen TATA-Sequenz (aus dem Xenopus-Albumin-Gen) und dem CAT-Gen enthielten. Abb. 10 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes. Ein SRE, das zwar SRF bindet, jedoch keinen ternären Komplex mehr bilden kann, vermittelt also sowohl im Kontext des gesamten c-fos-Promotors als auch



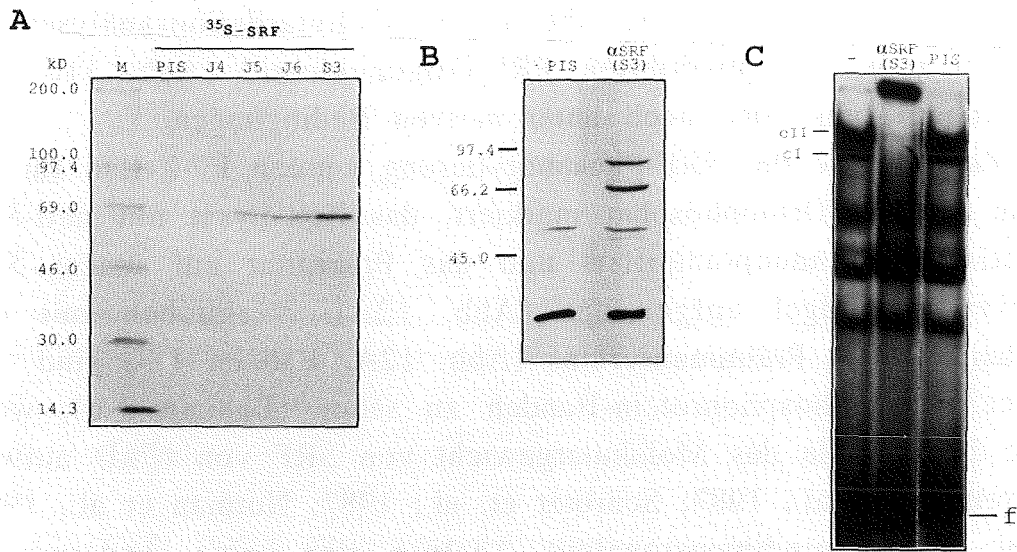
**Abb. 10** Bestimmung der CAT-Expression in NIH 3T3-Zellen, die mit den angegebenen CAT-Konstrukten transient transfiziert wurden. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 36h in DMEM/0.5% FCS gehalten. -, unbehandelte Zellen; +, Zellen, die für 16h mit DMEM/20% FCS behandelt wurden. Danach wurden Zellextrakte hergestellt und die CAT-Aktivität nach Gorman et al. (1982) bestimmt. Die verwendeten Konstrukte entstanden durch Klonierung der SRE- und SREel-Oligonukleotide (s. Abb. 8a) in die AccI-Schnittstelle des Vektors pBLCAT4 (Büscher et al., 1988), (tkCAT-Konstrukte), bzw. des Vektors pTATA-CAT (König et al., 1989), (TATA-CAT-Konstrukte).

isoliert, in heterologem Sequenzzusammenhang, eine unverändert starke Induktion der c-fos-Transkription.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vivo* "footprinting"-Analysen in F9-Zellen legen es diese Ergebnisse nahe, daß die Bildung des ternären Komplexes keine unabdingbare Voraussetzung für die Induktion der c-fos-Transkription durch Serum und durch Phorbolster ist. p62<sup>TCF</sup> scheint jedoch die Basalexpression des c-fos-Promotors zu erhöhen.

### **3. Untersuchung der *in vivo* Phosphorylierung von SRF während der Induktion von c-fos durch Phorbolster**

Obwohl es *in vivo* offensichtlich zelltyp-spezifische Unterschiede in der Multiproteinkomplex-Bildung über dem c-fos-SRE gibt, so ändert sich die Bindung der Proteine an das SRE während der Induktion von c-fos durch Phorbolster (diese Arbeit; König, 1991) oder Wachstumsfaktoren (Herrera et al., 1989) nicht. Dies legt es nahe, daß die SRE-vermittelte Regulation des c-fos-Gens über konstitutiv an die DNA bindende Proteinkomplexe erfolgt. Hierbei könnten Protein-Modifikationen oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beteiligt sein. Da die Bindung von SRF an das SRE sowohl für die positive als auch für die negative Regulation von c-fos über das SRE notwendig ist (Greenberg et al., 1987; Treisman, 1987; Leung & Miyamoto, 1989; Shaw et al., 1989a; Rivera et al., 1990) und da bekannt ist, daß SRF phosphoryliert ist (Prywes et al., 1988; Manak et al., 1990), lag es nahe zu untersuchen, ob die transiente Aktivierung der c-fos-Transkription durch Phorbolster eventuell mit Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von SRF einhergeht. Um das SRF-Protein analysieren zu können, habe ich zunächst Antiseren gegen SRF in Kaninchen erzeugt. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das die Sequenzen des bakteriellen trpE-Proteins vor der menschlichen SRF-cDNA (Norman et al., 1988) enthielt. Mit Hilfe dieses Konstruktes wurde ein trpE-SRF-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und durch Gelelektrophorese gereinigt. Dieses Fusionsprotein wurde dann zur Immunisierung der Kaninchen verwendet. Die Spezifität der so erhaltenen Seren ist in Abb. 11 gezeigt. Die Antiseren erkennen sowohl SRF, das *in vitro* in einem Retikulocytenlysat synthetisiert wurde in Immunpräzipitationen

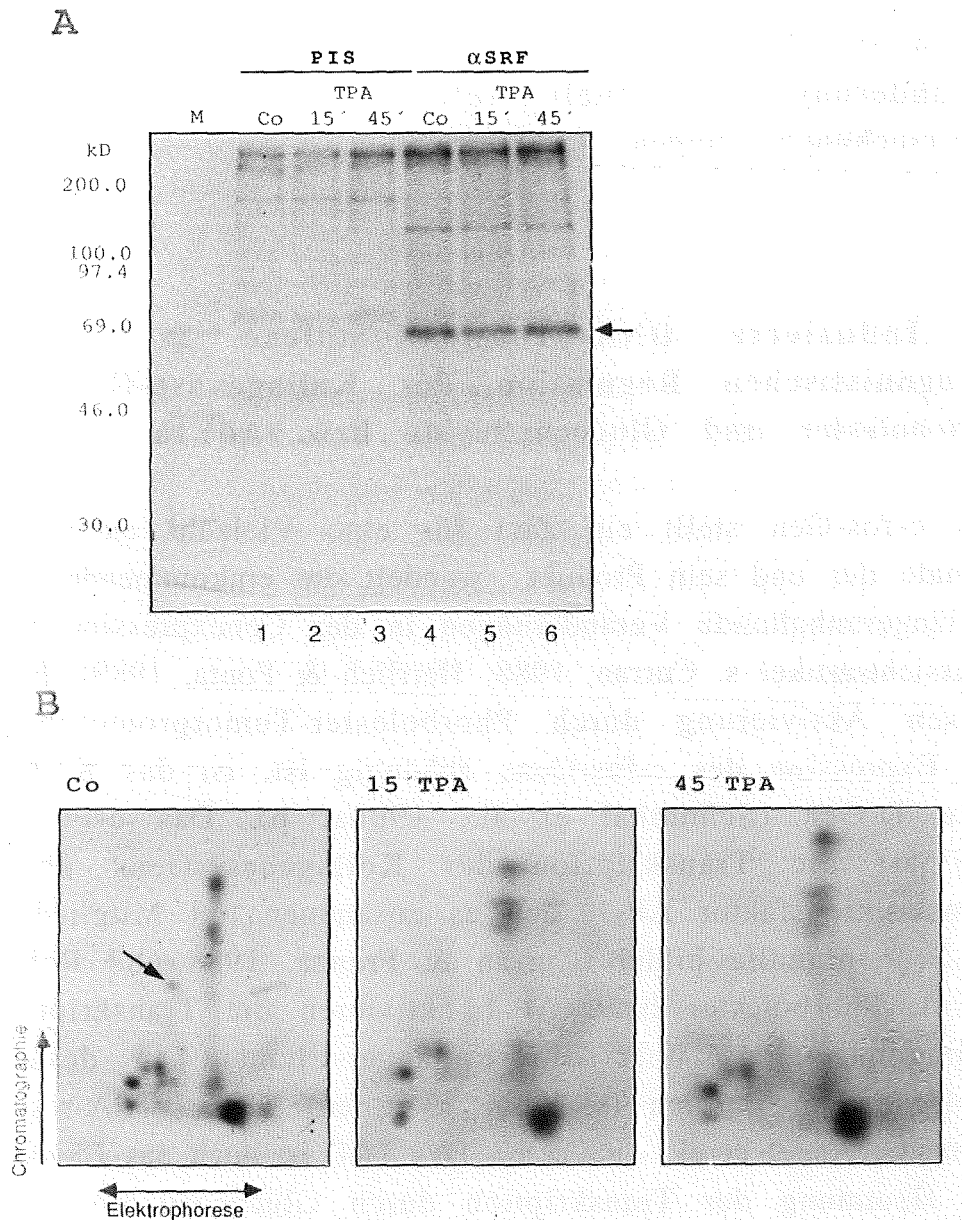


**Abb. 11** Untersuchung der Spezifität der erzeugten anti-SRF-Antisera. **A.** Immunpräzipitationen von [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin markiertem, *in vitro* synthetisiertem SRF aus Kaninchen-Retikulozytenlysat mit verschiedenen Kaninchen-Antisera. Die Immunpräzipitate wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (PAGE) aufgetrennt. M, Protein-Größenmarker; PIS, Präimmenserum; J4-J6, Antiseren von Kaninchen "Jacky" nach 4-6. Antigeninjektion ("boost"); S3 Antiserum von Kaninchen "Sam" nach 3. Antigeninjektion. **B.** "Western-blot"-Analyse von Kernextrakt aus TPA-stimulierten (90 min, 100ng/ml) HeLa-Zellen mit anti-SRF-Antiserum ( $\alpha$ SRF, S3) und Präimmenserum (PIS), nach Auftrennung der Proteine auf einem 10% SDS-PAGE. Die Balken neben den Gelspuren markieren Größen von Markerproteinen (in kD). **C.** Gelretardationsanalyse mit einer radioaktiv markierten SRE-Oligonukleotidprobe (s. Abb. 8a) und Kernextrakt aus TPA-stimulierten HeLa-Zellen (s. o.). -, ohne Serum; PIS, mit Präimmenserum (1 $\mu$ l);  $\alpha$ SRF, mit anti-SRF Antiserum (S3, 1 $\mu$ l); cI, Komplex I; cII, Komplex II; f, freie Oligonukleotid-Probe. Die Extrakte wurden mit den Seren (und unspezifischer Kompetitor-DNA, s. Material und Methoden) für 20 min auf Eis vorinkubiert, bevor die Oligonukleotidprobe zugegeben wurde. Die weitere Inkubation erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben.

(Abb. 11A), als auch SRF-Protein aus Kernextrakten, das nach denaturierender Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel auf einer Membran immobilisiert wurde ("Western-blotting", Abb.

11B). Im "Western-blot" wird außer der erwarteten Bande bei 67kD zusätzlich eine Bande bei ca. 90kD erkannt. Die Antiseren beeinflussen außerdem das Wanderungsverhalten der SRF-haltigen DNA-Protein-Komplexe (I und II) in Gelretardationsanalysen mit einem radioaktiv markierten SRE-Oligonukleotid (Abb. 11C) und erkennen somit SRF auch unter nativen Bedingungen.

Zur Analyse der SRF-Phosphorylierung wurden F9-Zellen für 165 min mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat markiert, das Zell-Lysat mit anti-SRF-Antiserum immunpräzipitiert und das Präzipitat auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 12A). Verglichen mit dem Präzipitat des Präimmuserums (Abb. 12A, Bahnen 1-3) sind zwei spezifische Phosphoprotein-Banden zu sehen (Bahnen 4-6), wobei die Hauptbande das Molekulargewicht von SRF von 67kD aufweist (Treisman et al., 1987; Schröter et. al., 1987; Norman et al., 1988). Bei dieser (eindimensionalen) Analyse war keine Änderung im Laufverhalten von SRF und in der Menge des in SRF eingebauten Phosphats zwischen unbehandelten und für 15 bzw. für 45 min mit TPA behandelten Zellen feststellbar. Um mögliche subtile Veränderungen in der Phosphorylierung von SRF zu erfassen, wurden zweidimensionale Phosphopeptid-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die (wie in Abb. 12A) aufgetrennten Immunpräzipitate auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, die SRF-Banden ausgeschnitten und das Protein mit Chymotrypsin gespalten. Die erhaltenen Peptide wurden zweidimensional (1. Dimension Dünnschichtelektrophorese; 2. Dimension Dünnschichtchromatographie) aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 12B). Das so erhaltene Phosphopeptidmuster umfaßt mehrere Signale, die sich mit Ausnahme eines schwachen Signals, das nur in unbehandelten F9-Zellen auftritt (s. Pfeil in Abb. 12B, Co), nach TPA-Behandlung der Zellen nicht ändern. Dieses schwache Peptidsignal wurde in zwei unabhängigen Experimenten nur mit SRF aus unbehandelten Zellen erhalten. Ein gänzlich unverändertes Phosphopeptid-Muster wurde nach Trypsinspaltung von SRF aus HeLa-Zellen und A431-Zellen vor und nach Behandlung mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) berichtet (Prywes et al., 1988; Manak et al., 1990), so daß die Phosphorylierung von SRF in diesen Zellen eher eine konstitutive als eine durch Wachstumsfaktoren induzierte Modifikation sein



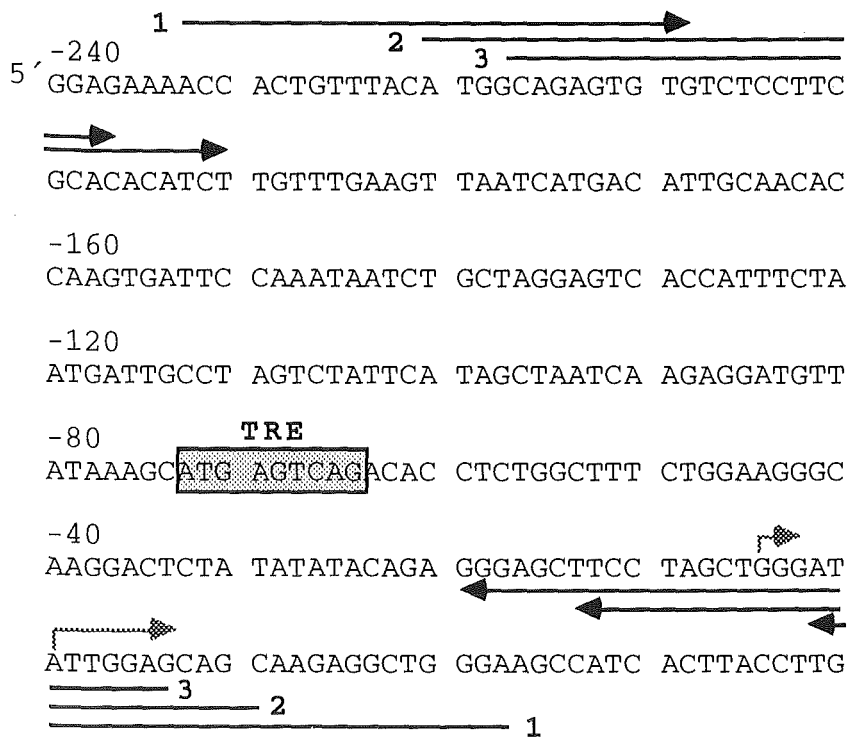
**Abb. 12** Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von SRF in F9-Teratokarzinom-Stammzellen vor und nach Behandlung mit TPA. **A.** SDS-Polyacrylamidgel-Auftrennung von Immunpräzipitaten aus Lysaten [ $^{32}$ P]Orthophosphat-markierter Zellen. PIS, Präimmunserum;  $\alpha$ SRF, anti-SRF Antiserum (S3); M, Protein-Größenmarker; Co; unbehandelte Zellen; 15', 45', Zellen, die für 15 bzw. 45 min mit TPA (100ng/ml Endkonzentration) behandelt wurden; Pfeil markiert SRF-Bande. **B.** Zweidimensionale Phosphopeptidanalyse von immunpräzipitiertem SRF (nach Chymotrypsinspaltung) aus unbehandelten (Co) und für 15 bzw. 45 min mit TPA behandelten F9-Zellen (s. Material und Methoden). Der Pfeil markiert das Peptidsignal, das nur mit SRF aus unbehandelten Zellen erhalten wurde.

könnte. Ob die Veränderung des schwachen Peptidsignals in F9-Zellen spezifisch für die TPA-Behandlung ist und ob diese Veränderung funktionell relevant ist müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## **B. Induzierte DNA-Protein-Komplexe *in vivo* in der antagonistischen Regulation des Kollagenase-Gens durch Phorbolster und Glucocorticoide bzw. AdE1a**

Das c-fos-Gen stellt ein Ziel für eine Vielzahl extrazellulärer Signale dar und sein Produkt wandelt die einkommenden Signale in längeranhaltende Veränderungen in der Genexpression um (als Übersichtsartikel s. Curran, 1988; Herrlich & Ponta, 1989). Ein Gen, dessen Aktivierung durch Phorbolster-Tumorpromotoren von der Expression des c-fos-Gens abhängig ist, ist das Kollagenase (Typ I)-Gen (Schönthal et al., 1988a, b). Das c-Fos-Protein aktiviert die Transkription des Kollagenase-Gens über den Transkriptionsfaktor AP-1, den es zusammen mit Mitgliedern der Jun-Proteinfamilie bildet (Curran & Franza, 1988 und Referenzen darin). Phorbolster bzw. AP-1 aktivieren die Transkription des Kollagenase-Gens über ein Enhancer-Element in dessen 5'-flankierendem Bereich (s. Abb. 13), dem TRE ("TPA-responsive element", Angel et al., 1987a, b). Das TRE ist auch das Element, das die Hemmung der Transkription durch Glucocorticoide und das Adenovirus E1a (AdE1a)-Protein vermittelt (Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Offringa et al., 1990). Obwohl das TRE für die Induktion der Kollagenase-Gen-Transkription absolut notwendig ist, werden für die volle Induktion noch andere Sequenzen distal vom TRE benötigt (Angel et al., 1987a; Auer et al., Manuskript in Vorbereitung). Durch *in vitro* DNase I-Protektionsexperimente wurde die Bindung von Proteinen an verschiedene Stellen distal vom TRE nahegelegt (Angel et al., 1987b). Im Gegensatz zu der Transkriptionsaktivierung von "immediate early"-Genen wie dem c-fos- oder dem c-jun-Gen, ist die Aktivierung der Transkription des Kollagenase-Gens durch Phorbolster von *de novo* Protein-



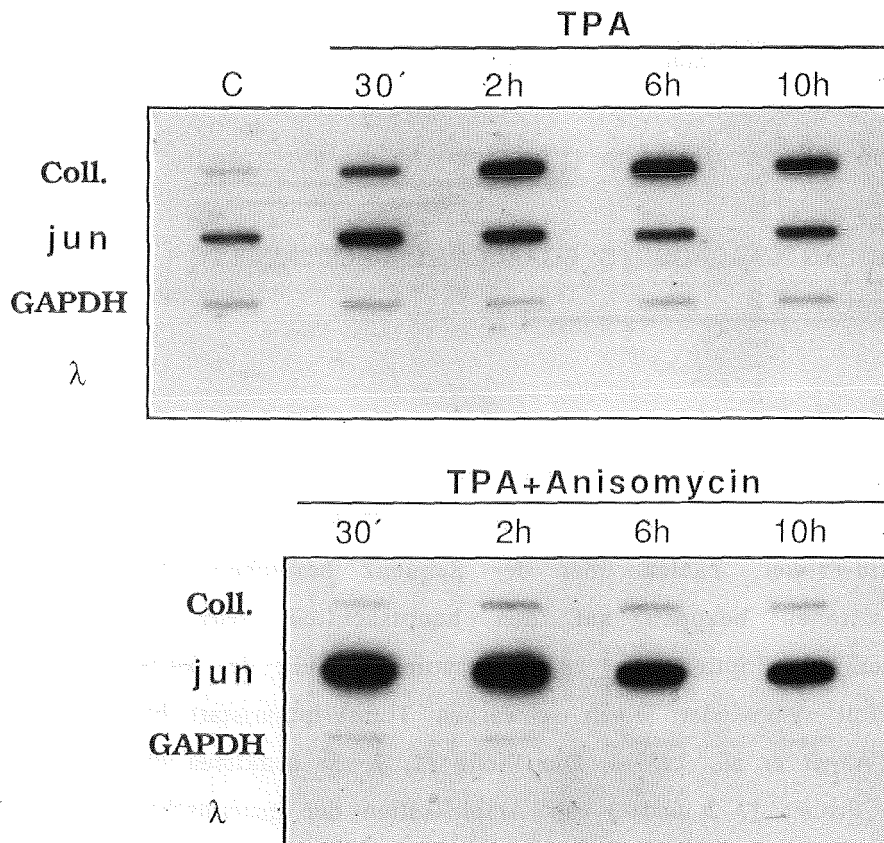


**Abb. 13** Nukleotidsequenz des 5'-flankierenden Bereiches des menschlichen Kollagenase-Gens (Angel et al., 1987a) mit den Positionen der für die ligationsvermittelte PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer. Zahlen über der Sequenz bezeichnen die Nukleotidpositionen bezogen auf den hauptsächlich benützten Startpunkt der Transkription (+1, langer schattierter Pfeil; der kurze schattierte Pfeil symbolisiert einen schwachen Transkriptionsstart bei Position -5, Angel et al., 1987a). Die Pfeile (1, 2, 3) markieren die Position der Primer 1, 2 und 3 zur Amplifikation der genomischen Fragmente (vgl. Abb. 2) des kodierenden Stranges (Pfeile unter der Nukleotidsequenz) und des nicht-kodierenden Stranges (Pfeile über der Nukleotidsequenz). Die TRE-Sequenz ist eingerahmt und schattiert.

synthese abhängig (Angel et al., 1987a; diese Arbeit). Es stellte sich somit die Frage, ob im Gegensatz zu der konstitutiven Proteinbindung am c-fos-SRE, die Phorbolsterinduktion des Kollagenase-Gens mit der Bindung von Proteinen an Sequenzen des Kollagenase-Promotors *in vivo* einhergeht und wie Glucocorticoide und AdE1a mit der AP-1-vermittelten Aktivierung über das TRE interferieren.

# 1. Die Aktivierung der Transkription des Kollagenase-Gens durch TPA geht mit der Bindung von Proteinen an den Promotor des Gens *in vivo* einher

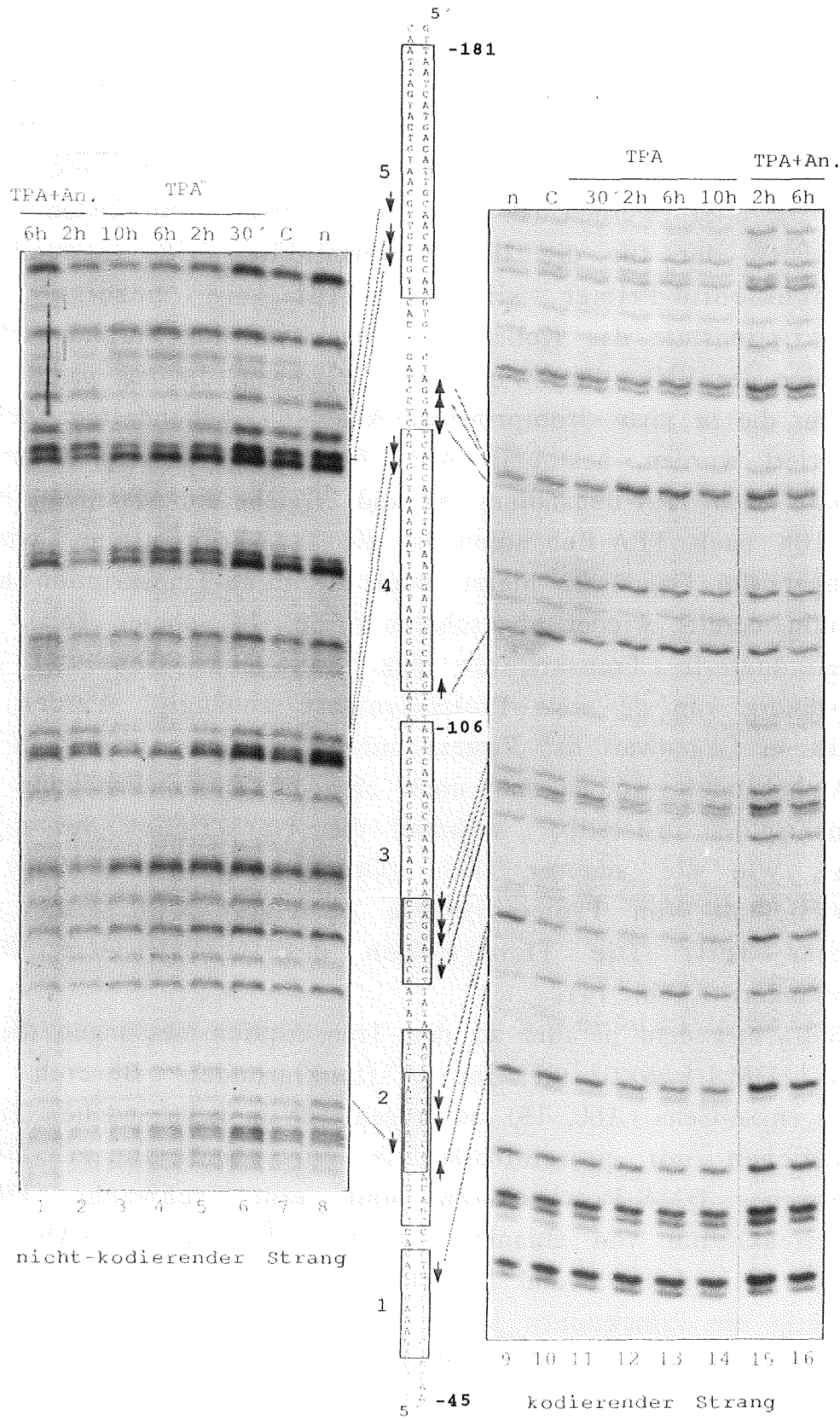
Um zu untersuchen, ob die Behandlung von Zellen mit Phorbolestern zu einer Bindung von Proteinen an den Kollagenase-Promotor führt, wurden *in vivo* DMS-"footprinting"-



**Abb. 14** "Nuclear run-on"-Analyse der Transkription in primären menschlichen Hautfibroblasten (CRL 1497), die entweder unbehandelt belassen wurden (C) oder für die angegebenen Zeiten (30', 2h, 6h, 10h) mit TPA oder TPA und Anisomycin behandelt wurden. Coll., Kollagenase-Gen; jun, c-jun-Gen; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen; λ, Hybridisierung der Transkripte mit Lambda-Phagen-DNA als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung. Die Zellen wurden vor der TPA-Behandlung (100ng/ml Endkonzentration) für 48h in DMEM/0.5% FCS kultiviert. Im Falle der Behandlung mit Anisomycin (100µg/ml Endkonzentration) wurden die Zellen für 20 min mit Anisomycin inkubiert, bevor TPA zugegeben wurde.

Experimente in primären menschlichen Hautfibroblasten (CRL 1497) durchgeführt, die für unterschiedliche Zeiten (30 min, 2h, 6h, 10h) mit dem Phorbol ester TPA behandelt wurden. Diese Zellen zeigen nur eine geringe Basalexpression des Kollagenase-Gens und die Transkription des Kollagenase-Gens kann durch TPA stark stimuliert werden (P. Angel, unveröffentlichte Daten). Die Positionen der für die ligationsvermittelte PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Abb. 13 gezeigt. Die Transkriptionsrate des Kollagenase-Gens (und im Vergleich dazu diejenige des IEG c-jun) wurde mit Zellkernen, die aus parallel zu den für die *in vivo* "footprinting"-Analysen behandelten Zellen präpariert wurden, bestimmt (Abb. 14). Die Transkription steigt 30 min nach TPA-Behandlung an und erreicht ein Maximum nach 6h. 10h nach TPA-Behandlung ist die Transkriptionsrate wieder geringer. Im Gegensatz hierzu wird die c-jun-Transkription nach 30 min bereits wieder abgeschaltet (Abb. 14, oberer Teil). Die TPA-induzierte Transkription des Kollagenase-Gens ist fast vollständig von *de novo* Proteinsynthese abhängig. Werden die Zellen in Gegenwart des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin mit TPA behandelt, so ist nur noch eine marginale Erhöhung der Transkription feststellbar, während die Transkription des c-jun-Gens, wie die anderer IEGs (Greenberg et al., 1986) in Abwesenheit von Proteinsynthese gesteigert wird (Abb. 14, unterer Teil). Die Transkription des GAPDH-Gens blieb unverändert (Abb. 14).

Betrachtet man parallel zu den Transkriptionsmessungen die *in vivo* DMS-Reaktivität im 5'-flankierenden Bereich des Kollagenase-Gens (Abb. 15), so zeigen sich in unbehandelten Zellen (verglichen mit proteinfreier, *in vitro* methylierter DNA) schwache DMS-Protektionen und eine schwache DMS-Hyperreaktivität von Guaninen in der TRE-Sequenz (Abb. 15; Bahnen 7 und 8, 9 und 10). Behandlung der Zellen mit TPA verstärkt die Protektionen und die Hyperreaktivität nach 2h, eine weitere Verstärkung ist nach 6h feststellbar (Bahnen 4-7 und 10-13, s. auch Abb. 19A und quantitative Auswertung in Abb. 19B). Nach 10h TPA-Behandlung tritt wieder eine leichte Reversion der Veränderungen in der DMS-Reaktivität ein (erkennbar in Bahn 14;



**Abb. 15** *In vivo* DMS-"footprinting" des 5'-flankierenden Bereiches des Kollagenase-Gens in primären menschlichen Hautfibroblasten (CRL 1497), die entweder unbehandelt belassen wurden (C) oder für die angegebenen Zeiten (30', 2h, 6h, 10h) mit TPA oder TPA und Anisomycin (An.) behandelt wurden. n, *in vitro* methylierte, proteinfreie ("nackte") genomische DNA. Bereiche der Promotorsequenz (Angel et al., 1987a), die durch DNase I-"footprinting" als Proteinbindungsstellen *in vitro* definiert wurden (Angel et al., 1987b) sind eingerahmt (mit 1-5 bezeichnet). Die Zahlen rechts von der Sequenz geben die Nukleotidpositionen in Bezug auf den Startpunkt der Transkription (+1) an. Die Numerierung unterscheidet sich von derjenigen in Angel et al. (1987a) (s. Abb. 13) um eine Nukleotid, aufgrund eines bei den *in vivo* "footprinting"-Experimenten gefundenen, zusätzlichen Guanins zwischen den ursprünglichen Nukleotidpositionen -61 und -62. Dieses Guanin wurde auch bei der Sequenzierung von klonierten Kollagenase-Promotorsequenzen gefunden (H.-P. Auer, unveröffentlichte Daten). Punktierter Bereich in Box 2, TRE (Angel et al., 1987b); punktierter Bereich überlappend mit Box 3, PEA3-Erkennungssequenz (Gutman & Wasylyk, 1990). Nach oben gerichtete Pfeile symbolisieren DMS-Hyperreaktivitäten, nach unten gerichtete Pfeile DMS-Protektionen. Die Zellen wurden vor der TPA-Behandlung (100ng/ml Endkonzentration) für 48h in DMEM/0.5% FCS kultiviert. Im Falle der Behandlung mit Anisomycin (100µg/ml Endkonzentration) wurden die Zellen für 20 min mit Anisomycin inkubiert, bevor TPA zugegeben wurde.

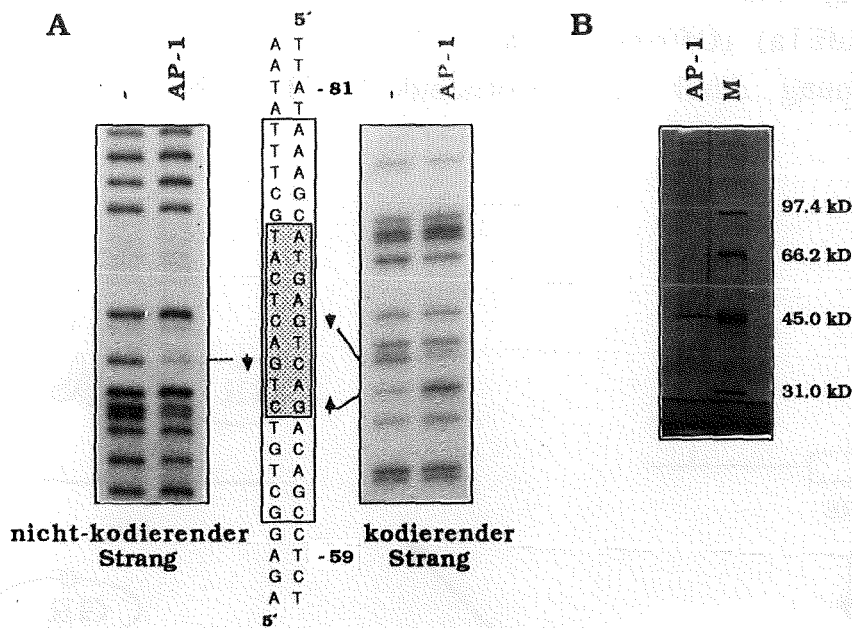
in Bahn 3 wurde weniger Probe auf das Gel geladen, normalisiert auf unveränderte Banden tritt ebenfalls eine leichte Abschwächung der Protektion auf). Interessanterweise induziert TPA auch Veränderungen im DMS-Reaktivitätsmuster an Promotorregionen proximal (Box 1) und distal (Boxen 3-5) vom TRE (Abb. 15). Diese Bereiche wurden ursprünglich durch DNase I-"footprinting"-Experimente als Proteinbindungsstellen *in vitro* identifiziert (Angel et al., 1987b). Eine dieser Bindungsstellen (Box 3) enthält eine PEA3-Erkennungssequenz, die den Transkriptionsfaktor PEA3 bindet und mit dem TRE synergistisch in Bezug auf die Phorbolsterinduktion wirkt (Gutman & Wasylyk, 1990). Die Proteine, die mit den anderen Bindungsstellen interagieren, sind bisher unbekannt. Der Zeitverlauf der TPA-induzierten Veränderungen in der DMS-Reaktivität der PEA3-Sequenz ist identisch mit dem für die Besetzung des TREs (Abb. 15). Wird die Proteinsynthese während der TPA-Induktion durch Anisomycin

gehemmt (für 2h und 6h), bleiben die Veränderungen im DMS-Reaktivitätsmuster an den Proteinbindungsstellen, einschließlich des TRE, aus (Abb. 15, Bahnen 1 und 2, 15 und 16).

Die Besetzung des Kollagenase-TRE und davon distal liegender Bindungsstellen mit Proteinen *in vivo* korreliert also zeitlich mit der transkriptionellen Aktivierung des Kollagenase-Gens nach Induktion durch TPA.

## **2. Die TPA-induzierten DMS-Reaktivitätsveränderungen am TRE *in vivo* beruhen auf der Interaktion mit AP-1**

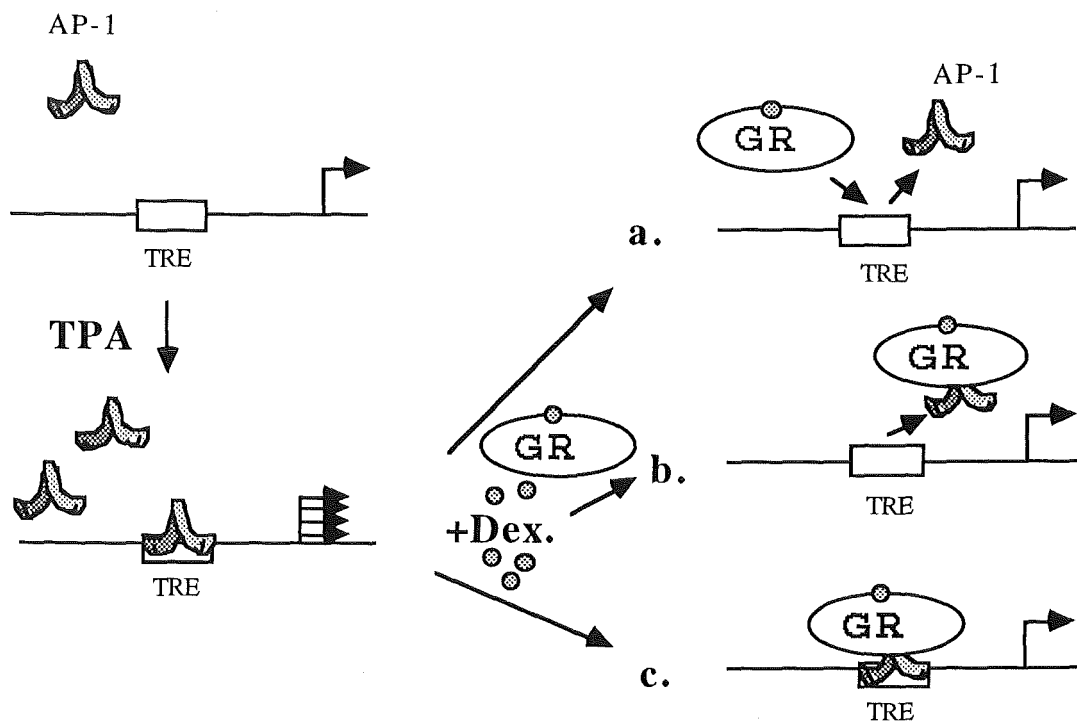
Um zu prüfen, ob das in lebenden Zellen erhaltene DMS-Reaktivitätsmuster am TRE auf der Bindung von AP-1 beruht, habe ich *in vitro* DMS-Protektionsanalysen mit affinitätsgereinigtem AP-1 und klonierten Kollagenase-Promotorsequenzen durchgeführt. Die verwendete AP-1-Fraktion ist in Abb. 16B nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Silberfärbung gezeigt. Die Fraktion enthält außer der deutlich sichtbaren Jun-Proteinbande (im Bereich von 45kD) auch Fos-Protein (nur sehr schwach erkennbar als heterogene Bande zwischen 50kD und 60kD). Dies wurde durch die Interferenz von anti-Fos-Antiserum mit dem von der AP-1-Fraktion gebildeten DNA-Protein-Komplex in Gelretardationsanalysen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das mit dieser Fraktion erhaltene *in vitro* DMS-Reaktivitätsmuster (Abb. 16A) ist mit dem am TRE *in vivo* erhaltenen Muster identisch (vgl. Abb. 15, Abb. 19 und Abb. 21). Das am weitesten distal gelegene Guanin im TRE, das *in vivo* schwach geschützt wird, kann *in vitro* auch durch nichtfraktionierte Kernextrakte aus TPA-induzierten HeLa-Zellen nicht geschützt werden (Daten nicht gezeigt). Die Experimente legen es somit nahe, daß AP-1 oder ein sehr nahe verwandter Proteinkomplex nach Phorbolsterstimulation an das TRE *in vivo* bindet.



**Abb. 16** *In vitro* DMS-Reaktivität am Kollagenase-TRE nach Bindung von gereinigtem AP-1. **A.** Guanin-Leiter für den kodierenden und nicht-kodierenden Strang. -, ohne Protein; AP-1, mit affinitätsgereinigtem AP-1. Symbole wie in Legende zu Abb. 15. **B.** Silberfärbung der verwendeten AP-1-Fraktion nach Auftrennung auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel. Das AP-1 wurde aus Kernextrakten von HeLa-Zellen affinitätsgereinigt. Die Zellen wurden vor der Extraktpräparation für 90 min mit 100ng/ml TPA (Endkonzentration) behandelt. M, Protein-Größenmarker; AP-1, affinitätsgereinigte AP-1-Fraktion.

### 3. Mögliche Mechanismen für den Antagonismus zwischen Glucocorticoidrezeptor und AP-1

Es ist seit langem bekannt, daß der tumorpromovierenden Wirkung von Phorbolestern durch Applikation von Glucocorticoidhormonen entgegengewirkt werden kann (Nelson, 1962; Belman & Troll, 1972; Scribner & Slaga, 1973). Darüberhinaus konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, daß die durch Phorbolester induzierte Transkription AP-1-abhängiger Gene durch Glucocorticoidhormone (Mordacq & Linzer, 1989; Diamond et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b) und durch das Adenovirus E1a-Protein (AdE1a) (Offringa et al., 1988 und 1990) reprimiert wird. Die Hemmung durch Glucocorticoide erfolgt über einen vom



**Abb. 17** Schematische Darstellung möglicher Mechanismen für den Antagonismus zwischen Glucocorticoidrezeptor (GR) und AP-1 am TRE des Kollagenase-Gens (s. auch Text). Dex., Dexamethason. Die waagrecht Linien mit dem Kästchen (TRE) symbolisieren den 5'-flankierenden Bereich des Kollagenase-Gens; die Anzahl der Pfeile darauf zeigt die Transkriptionsaktivität an.



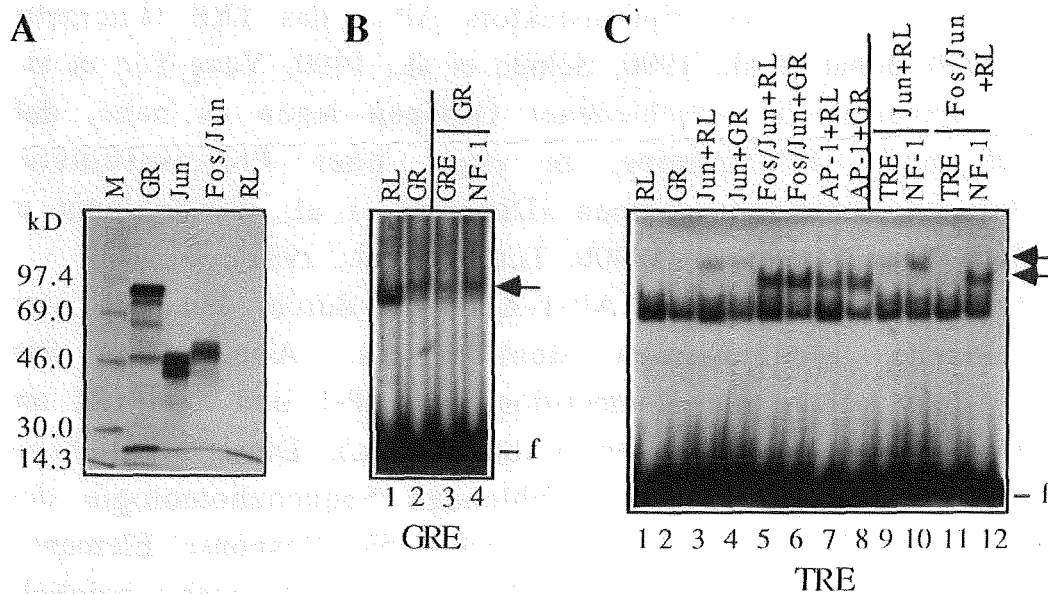
Glucocorticoidrezeptor (GR) abhängigen Mechanismus über die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors AP-1, das TRE (Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b). Experimente verschiedener Gruppen legen es nahe, daß der GR und AP-1-Proteine, *in vitro*, über Protein-Protein-Interaktionen assoziieren können (Diamond et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Touray et al., 1991).

Für die Hemmung der AP-1-Aktivität durch den GR sind verschiedene Mechanismen denkbar (s. Abb. 17). Ein Mechanismus könnte die Konkurrenz von AP-1 und dem GR um die Bindung an das TRE sein (Abb. 17, a.). Diese Möglichkeit erscheint jedoch aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie des TRE mit der GR-Bindestelle ("Glucocorticoid Response Element", GRE; Beato, 1989 und Referenzen darin) nicht sehr wahrscheinlich. Wenn der GR jedoch, wie *in vitro*, auch *in vivo* mit AP-1 interagieren kann, ergeben sich zwei weitere Möglichkeiten, die beide AP-1 als Ziel für die Glucocorticoidrepression haben. Die Interaktion von GR und AP-1 könnte zu einer Hemmung der DNA-Bindung von AP-1 führen (b.) oder aber der GR könnte an AP-1 binden und dessen Transaktivierungsfähigkeit hemmen, ohne die DNA-Bindung von AP-1 zu verhindern (c.).

#### **4. Der Glucocorticoidrezeptor interferiert nicht mit der DNA-Bindung von Fos/Jun und gereinigtem AP-1 *in vitro***

Die Ergebnisse von *in vitro* Experimenten bezüglich des Mechanismus der Interferenz zwischen AP-1 und GR sind widersprüchlich. Jonat et al. (1990) zeigten in Gelretardationsanalysen, daß die TRE-Bindungsaktivität in Extrakten aus TPA- bzw. aus TPA plus Dexamethason (synthetisches Glucocorticoid)-behandelten Zellen nicht verändert ist. Andererseits berichteten Yang-Yen et al. (1990b), daß die DNA-Bindungsfähigkeit eines bakteriell exprimierten (und unvollständigen) Jun-Proteins in Anwesenheit des GR reduziert ist.

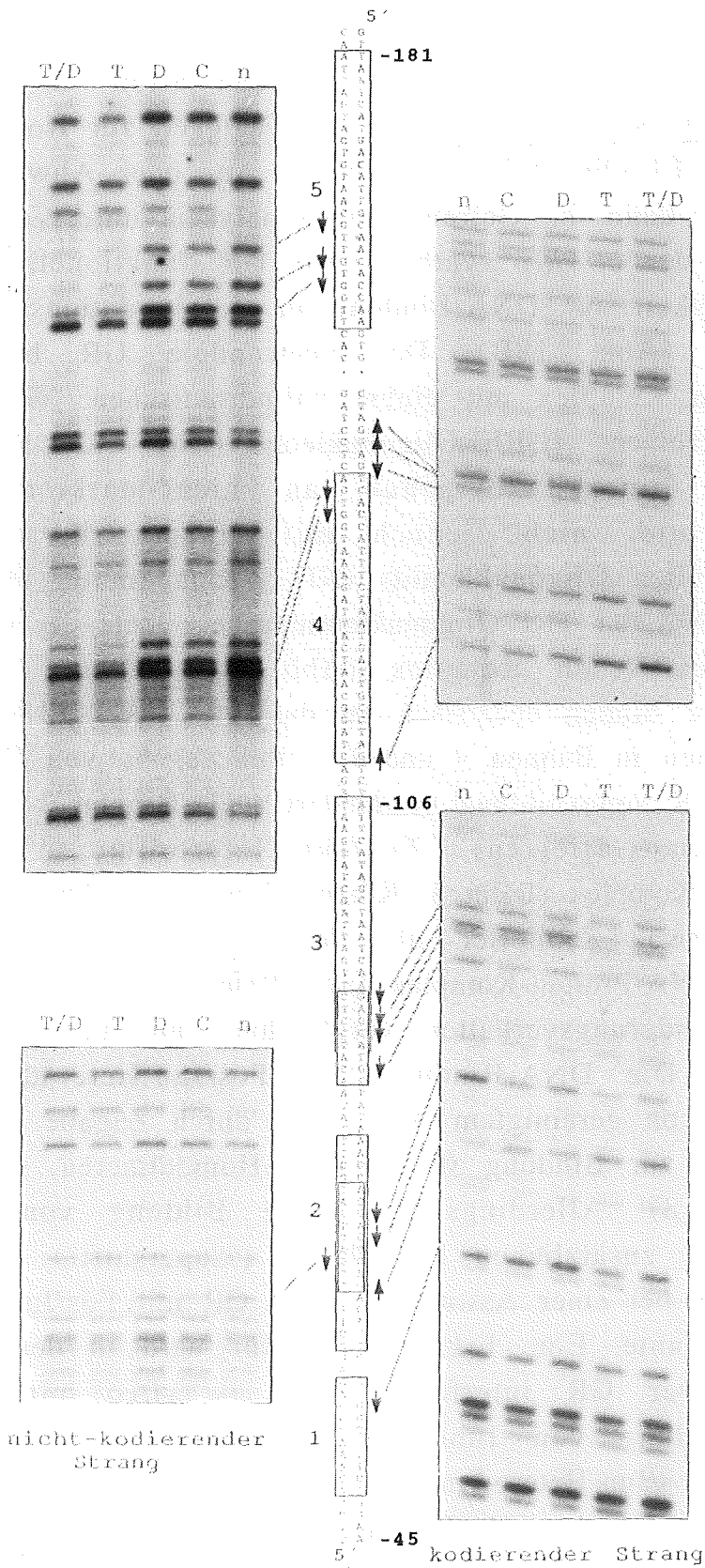
Da an der Aktivierung des Kollagenase-Gens sowohl Fos als auch Jun beteiligt sind (Schönthal et al., 1988a, b; Chiu et al., 1988), habe ich zunächst untersucht, ob sich eine GR-abhängige Reduktion der *in vitro* TRE-Komplexbildung auch mit Fos/Jun-

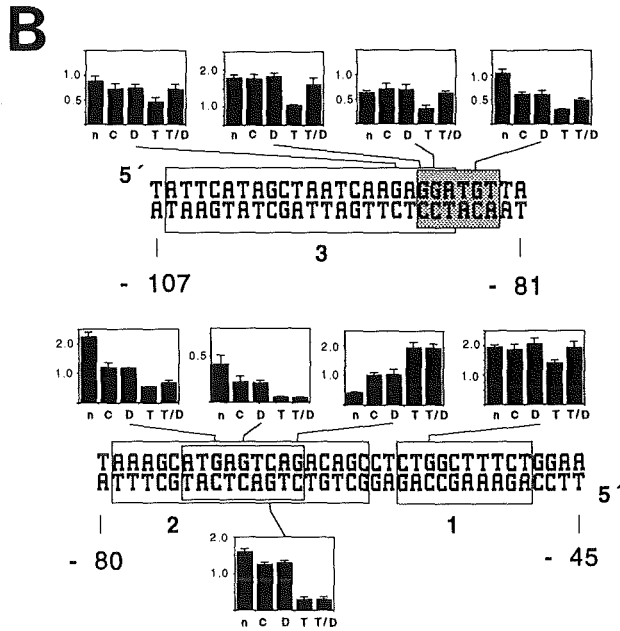


**Abb. 18** Einfluß von *in vitro* hergestelltem Glucocorticoidrezeptor (GR) auf die DNA-Bindungsfähigkeit *in vitro* synthetisierter Jun/Jun-Homodimere, Fos/Jun-Heterodimere und gereinigtem AP-1 **A.** SDS-Polyacrylamidgel-Auftrennung der verwendeten, *in vitro* hergestellten Proteine. Die in *in vitro* synthetisierten RNAs wurden in nukleasebehandeltem Kaninchen-Retikulocytenlysate in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]Methionin translatiert. Die so programmierten Retikulocytenlysate wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. M, Protein-Größenmarker; GR, Jun, Fos/Jun; Retikulocytenlysate, die mit den entsprechenden RNAs programmiert waren; RL, nicht-programmiertes Retikulocytenlysate. **B.** Gelretardationsexperiment mit *in vitro* hergestelltem GR und einer radioaktiv markierten GRE-Oligonucleotidprobe (s. Material und Methoden). RL, nicht-programmiertes Retikulocytenlysate (4µl, Bahn 1); GR, mit GR-RNA programmiertes RL (4µl, Bahn 2); Bahnen 3 und 4 zeigen Ansätze mit einem 25-fachen molaren Überschuß an nicht-markiertem GRE-Oligonucleotid oder einem nicht verwandten Oligonucleotid (NF-1). **C.** Gelretardationsanalyse mit einem radioaktiv markierten TRE-Oligonucleotid (s. Material und Methoden) und *in vitro* translatiertem Jun (2µl, Bahnen 3 und 4), kotranslatiertem Fos/Jun (2µl, Bahnen 5 und 6) oder affinitätsgereinigtem AP-1 (Bahnen 7 und 8) in Anwesenheit von 4µl nicht-programmiertem Retikulocytenlysate (RL) oder von mit GR-RNA programmiertem RL (GR). Die Bahnen 1 und 2 zeigen die Bindung von 4µl RL bzw. GR alleine. In den Bahnen 9-12 sind Konkurrenzexperimente gezeigt, die in Gegenwart eines 25-fachen molaren Überschußes an nicht-markiertem TRE-Oligonucleotid oder eines NF-1-Oligonucleotids durchgeführt wurden. Pfeile markieren die spezifischen DNA-Protein-Komplexe; f, freies, markiertes Oligonucleotid.

Heterodimeren und mit affinitätsgereinigtem AP-1 feststellen läßt. Hierzu wurden GR-, Jun- und Fos-Proteine *in vitro* synthetisiert (*in vitro* Transkription/*in vitro* Translation im Kaninchen Retikulozytenlysat; s. Abb. 18A). Die Fähigkeit zur Komplexbildung mit einer TRE-Oligonukleotidprobe in An- oder Abwesenheit von GR wurde dann in Gelretardationsanalysen untersucht. Um zu prüfen, ob der *in vitro* synthetisierte GR funktionell ist, wurde seine Fähigkeit zur DNA-Bindung in Gelretardationsexperimenten untersucht (Abb. 18B). Der verwendete GR bildet einen spezifischen Komplex mit einem palindromischen "Glucocorticoid Response Element" (GRE)-Oligonukleotid (Abb. 18B, Bahn 2), der sich mit einem Überschuß an nicht-markiertem GRE-Oligonukleotid, nicht jedoch mit einem Überschuß eines nichtverwandten Oligonukleotids (NF-1) kompetieren läßt (Bahnen 3 und 4). Mit der TRE-Oligonukleotidprobe bildete der GR dagegen keinen spezifischen Komplex (Abb. 18C, Bahn 2). Jun/Jun-Homodimere binden spezifisch an das TRE (Abb. 18C, Bahn 3; Kompetitionen in Bahnen 9 und 10). Bei Zugabe von GR wird die spezifische Komplexbildung vermindert (vgl. Bahnen 3 und 4). Der von (kotranslatierten) Fos/Jun-Heterodimeren gebildete spezifische Komplex (Bahn 5, Kompetitionen in Bahnen 11 und 12) wandert etwas schneller als der von Jun/Jun-Homodimeren gebildete DNA-Protein-Komplex (vgl. Bahnen 3 und 5) und ist in seinem Wanderungsverhalten vergleichbar mit gereinigtem AP-1 (Bahn 7). Die DNA-Bindung der Fos/Jun-Heterodimeren und diejenige von gereinigtem AP-1 wird durch Zugabe von GR, im Unterschied zur Bindung von Jun-Jun-Homodimeren, nicht gestört (Bahnen 5-8). Allerdings ist keine Bildung von langsamer wandernden, zusätzlichen Komplexen ("supershift") nachweisbar, wie man es bei einer Assoziierung des GR mit Fos/Jun oder AP-1 erwarten könnte. Eine Erklärung hierfür wird in der Diskussion gegeben. Der GR interferiert also *in vitro* mit der DNA-Komplexbildung von Jun/Jun-Homodimeren, die viel weniger stabil als Fos/Jun-Heterodimere sind (Rauscher et al., 1988; Smeal et al., 1989), nicht jedoch mit der DNA-Bindung von Fos/Jun-Heterodimeren oder von affinitätsgereinigtem AP-1.

A





**Abb. 19** *In vivo* DMS-Reaktivität im 5'-flankierenden Bereich des Kollagenase-(TypI)-Gens in menschlichen primären Hautfibroblasten CRL (1497), die entweder unbehandelt belassen wurden (C) oder für 6h mit Dexamethason (D); TPA (T) oder TPA und Dexamethason gleichzeitig (T/D) behandelt wurden. **A.** Guanin-Leitern für den kodierenden und nicht-kodierenden Strang. n, *in vitro* methylierte, proteinfreie ("nackte") genomische DNA; C, D, T, D/T, DNA von Zellen, die wie oben angegeben, behandelt wurden. Bereiche der Promotorsequenz die durch DNase I-"footprinting" als Proteinbindungsstellen *in vitro* definiert wurden (Angel et al., 1987b) sind eingerahmt (mit 1-5 bezeichnet). Die Zahlen rechts von der Sequenz geben die Nukleotidpositionen in Bezug auf den Startpunkt der Transkription (+1) an. Punktierter Bereich in Box 2, TRE (Angel et al., 1987b); punktierter Bereich überlappend mit Box 3, PEA3-Erkennungssequenz (Gutman & Wasylyk, 1990). Nach oben gerichtete Pfeile symbolisieren DMS-Hyperreaktivitäten, nach unten gerichtete Pfeile DMS-Protektionen. Die Zellen wurden vor der Behandlung mit TPA (100ng/ml Endkonzentration) und/oder Dexamethason ( $10^{-7}$ M) für 48h in DMEM/0.5% FCS gehalten. **B.** Quantitative Auswertung der DMS-Reaktivität in den Boxen 1-3. Es ist nur die DMS-Reaktivität (in willkürlichen Einheiten) derjenigen Guanine gezeigt, die signifikant beeinflusst werden. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Striche über den Säulen zeigen die Standardfehler der Mittelwerte an.

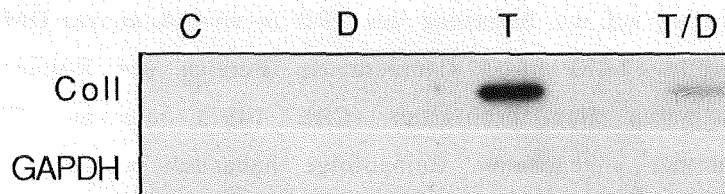
## 5. Glucocorticoid-Behandlung reprimiert die Phorbol-ester-induzierte Transkription des Kollagenase-Gens, ohne die Besetzung des TRE *in vivo* zu verändern

Die entscheidende Frage lautet jedoch: Was passiert mit der TPA-induzierten Bindung von AP-1 an das Kollagenase-TRE *in vivo* unter Bedingungen der Glucocorticoidrepression? Zur Klärung dieser Frage habe ich *in vivo* "footprinting"-Analysen in primären menschlichen Hautfibroblasten durchgeführt, die mit TPA in An- oder Abwesenheit inhibierender Dosen des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason behandelt wurden. Abb. 19A zeigt ein Beispiel eines solchen *in vivo* "footprinting"-Experimentes, bei dem die Zellen entweder nicht behandelt wurden oder für 6h mit Dexamethason, für 6h mit TPA oder für 6h mit TPA und Dexamethason gleichzeitig behandelt wurden. TPA-Behandlung der Zellen führt, wie schon oben dargestellt, zu einer Besetzung der verschiedenen Proteinbindungsstellen (Boxen 1 und 3-5) und der Bindung von AP-1 an das TRE (Abb. 19A, vgl. Bahn C, unbehandelte Zellen und Bahn T, TPA-behandelte Zellen; Abb. 19B). Die TPA-induzierten Veränderungen in der DMS-Reaktivität des TRE werden in Anwesenheit von gleichzeitig gegebenem Dexamethason nicht verändert oder aufgehoben, mit Ausnahme des Guanins in Position -72, das nach Dexamethason-Behandlung etwas weniger stark protektiert wird (Abb. 19, Bahn T/D; s. auch quantitative Auswertung mehrerer Experimente in Abb. 19B). Jedoch ist die TPA-induzierte Transkription des Kollagenase-Gens unter diesen Bedingungen stark reprimiert (Abb. 20).

Die Besetzung des TRE nach TPA-Gabe und die erkennbaren DNA-Protein-Kontakte am TRE sind auch dann unverändert, wenn Dexamethason nicht gleichzeitig mit TPA, sondern vor oder nach TPA gegeben wird. Auch wenn Dexamethason 30 min vor TPA gegeben wird, wird die TPA-induzierte Bindung von AP-1 nicht verhindert, obwohl die Transkription stark reprimiert wird (Abb. 21A, Bahnen 2-4 und 9-11; Abb. 21B). Selbst wenn Dexamethason erst 5.5h nach TPA gegeben wird, wird die Transkription des Kollagenase-Gens stark gehemmt, und zwar schon 30 min nach der Zugabe des Glucocorticoids; aber auch hier wird AP-1 nicht von seiner Bindungsstelle entfernt (Abb. 21A, Bahnen 1 und 3, 10 und 12; Abb. 21B). Diese Experimente zeigen, daß der GR die

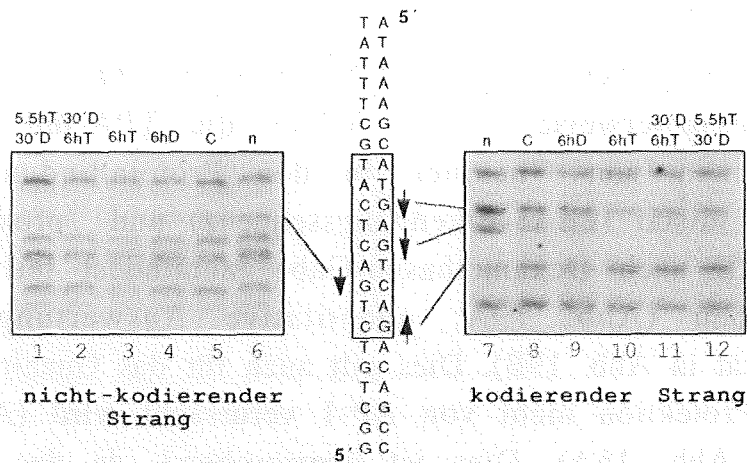
Transkription des Kollagenase-Gens reprimiert, ohne die DNA-Bindung von AP-1 zu hemmen und, daß diese Repression unabhängig davon ist, ob der GR vor AP-1 aktiviert wird oder nachdem AP-1 bereits an die DNA gebunden hat.

Interessanterweise werden jedoch die TPA-induzierten DMS-Protektionen von Guaninen in den Proteinbindungsstellen unmittelbar distal (PEA3-Erkennungssequenz) und proximal (Box 1) vom TRE nach Dexamethason-Gabe, zumindest teilweise, wieder aufgehoben (Abb. 19A; quantitative Auswertung der DMS-Reaktivität in Abb. 19B). Dies gilt auch für das Guanin -72 im TRE, dessen Protektion nicht von AP-1 verursacht wird (Abb. 19A und B, vgl. Abb. 16A). Dies ist überraschend, da das TRE für die Glucocorticoid-vermittelte Repression des Kollagenase-Gens ausreicht (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b). Andererseits könnte man einen solchen Effekt erwarten, wenn der GR mit AP-1 interagiert, ohne dessen Bindungsfähigkeit an das TRE zu hemmen. Durch die Bildung eines großen Proteinkomplexes am TRE könnte die Proteinbindung an Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft sterisch behindert werden.

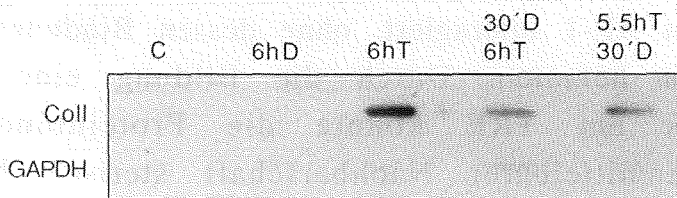


**Abb. 20** "Nuclear run-on"-Analyse der Transkription in menschlichen primären Hautfibroblasten (CRL 1497), die parallel mit den Zellen für eines der genomischen "footprinting"-Experimente (Abb. 19) behandelt wurden. C, unbehandelte Zellen, D, Dexamethason ( $10^{-7}$ M für 6h); T, TPA (100ng/ml Endkonzentration, für 6h); T/D, TPA plus Dexamethason für 6h. Die Zellen wurden vor der Behandlung mit TPA bzw. Dexamethason für 48h in DMEM/0.5% FCS kultiviert. Coll, Kollagenase (TypI)-Gen; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen.

A



B



**Abb. 21** Untersuchung des Einflusses der Reihenfolge von Glucocorticoidrezeptor- bzw. AP-1-Aktivierung auf die Besetzung des TRE *in vivo*. **A.** *In vivo* DMS-Reaktivität der AP-1-Bindestelle (TRE) im 5'-flankierenden Bereich des Kollagenase-Gens in menschlichen primären Hautfibroblasten (CRL 1497), die mit TPA und/oder Dexamethason in der angegebenen Reihenfolge behandelt wurden. n, proteinfreie ("nackte"), *in vitro* methylierte DNA; C, DNA von unbehandelten Zellen; 6hD, DNA von Zellen, die für 6h mit Dexamethason ( $10^{-7}M$ ) behandelt wurden; 6hT, DNA von Zellen, die für 6h mit TPA (100ng/ml) behandelt wurden; 30'D 6hT, DNA von Zellen, die 30 min mit Dexamethason vorbehandelt wurden, bevor TPA für 6h zugegeben wurde (Dexamethason war für insgesamt 6.5h im Medium); 5.5hT 30'D; DNA von Zellen, die für 5.5h mit TPA behandelt wurden, bevor Dexamethason für weitere 30 min zugegeben wurde (TPA war für insgesamt 6h im Medium). Nach oben gerichtete Pfeile symbolisieren DMS-Hyperreaktivitäten, nach unten gerichtete Pfeile DMS-Protektionen. Die TRE-Sequenz ist eingerahmt und schattiert. **B.** "Nuclear run-on"-Analyse der Transkription mit Kernen aus Zellen, die parallel mit den für die *in vivo* "footprinting"-Experimente verwendeten Zellen behandelt wurden. Coll, Kollagenase-(TypI)-Gen; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen.

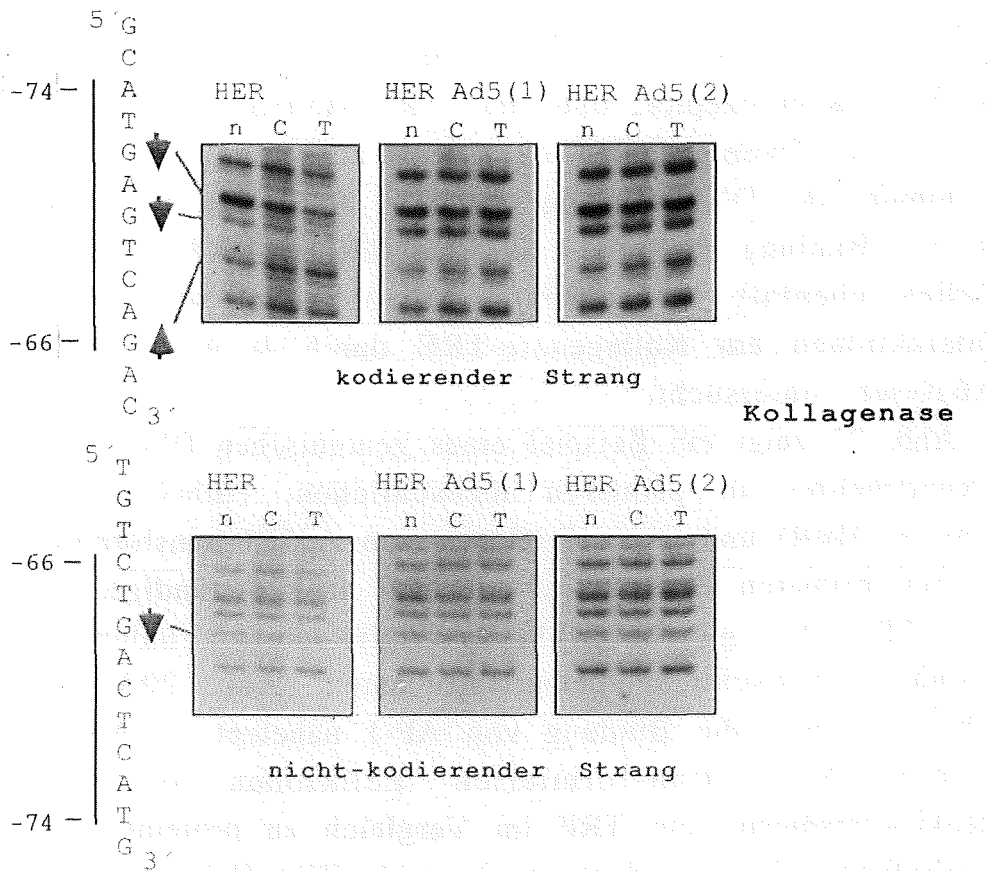


## 6. In Adenovirus E1-transformierten Zellen findet keine Besetzung des TRE *in vivo* statt

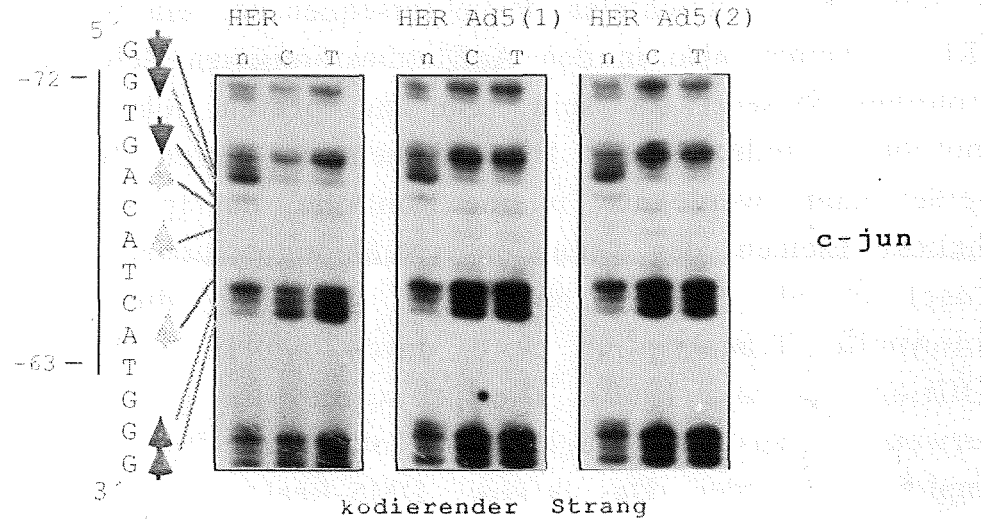
Das Adenovirus E1a (AdE1a)-Protein hemmt die Phorbol ester-induzierte Transkription des Kollagenase (Typ I)-Gens, wie der Glucocorticoidrezeptor, über das TRE (Offringa et al., 1990). *In vitro* Experimente legten es jedoch nahe, daß AdE1a zu keiner Hemmung der DNA-Bindung von AP-1 führt. Um zu prüfen, ob die *in vivo* Bindung von AP-1 an das TRE in AdE1-transformierten Zellen ebenfalls unbeeinflusst ist, habe ich die DNA-Protein-Interaktionen am Kollagenase-TRE durch *in vivo* "footprinting"-Analysen untersucht.

Abb. 22 zeigt ein Beispiel eines genomischen DMS-"footprinting" Experimentes in primären menschlichen, embryonalen Retinoblasten (HER) und in zwei Klonen von Ad5E1-transformierten HER. In den primären Zellen wird am TRE nach 6-stündiger Behandlung mit TPA das gleiche DMS-Reaktivitätsmuster induziert wie in primären menschlichen Hautfibroblasten (Abb. 22A, HER; vgl. Abb. 19), was die Bindung von AP-1 nahelegt (s. Abb. 16A). In beiden Ad5E1-transformierten Zellklonen ist das DMS-Reaktivitätsmuster am TRE im Vergleich zu proteinfreier, *in vitro* methylierter DNA jedoch auch nach TPA-Gabe nicht verändert (Abb. 22A, HER Ad5(1) and Ad5(2)). Dies gilt auch für die anderen Proteinbindungsstellen im Kollagenase-Promotor (Daten nicht gezeigt). Die betrachteten Promotorsequenzen, einschließlich des TREs, scheinen also in den AdE1-transformierten Zellen nicht mit Proteinen besetzt zu sein. Um zu prüfen, ob ein anderes phorbol ester-induzierbares DNA-Element in diesen Zellen besetzt werden kann, wurde als "interne Kontrolle" das (proximale) AP-1-ähnliche Element des c-jun-Gens (Nukleotidpositionen -72 bis -63, Angel et al., 1988b) untersucht. Die von diesem Element vermittelte Transkription wird durch AdE1a nicht reprimiert (Offringa et al., 1990). Hierfür wurde die genomische DNA verwendet, aus der auch die Kollagenase-Promotorfragmente amplifiziert wurden. Das *in vivo* DMS-Reaktivitätsmuster im und um das jun-TRE ist sowohl in den primären Zellen als auch in beiden Ad5E1-transformierten Klonen an mehreren Guaninen (und Adeninen) verändert, verglichen mit *in vitro* methylierter,

**A**



**B**



**Abb. 22** *In vivo* DMS-"footprinting"-Analysen in primären (HER) und zwei Klonen von Ad5 E1-transformierten menschlichen, embryonalen Retinoblasten (HERAd5(1) und (2)). **A.** *In vivo* DMS-Reaktivität im kodierenden und nicht-kodierenden Strang des TRE [Nukleotidpositionen -66 bis -74, bezogen auf den Startpunkt der Transkription (+1), mit senkrechter Linie markiert, Angel et al., 1987a, b. Zu Nukleotidpositionen s. Legende zu Abb. 15] im Kollagenase-(TypI)-Gen. **B.** *In vivo* DMS-Reaktivität im kodierenden Strang der (proximalen) AP-1-ähnlichen Bindungsstelle (Nukleotidpositionen -63 bis -72, mit senkrechter Linie markiert, Angel et al., 1988b) im c-jun-Gen. n, proteinfreie ("nackte"), *in vitro* methylierte DNA; C, DNA von unbehandelten Zellen; T, DNA von Zellen, die für 6h mit TPA (100ng/ml Endkonzentration) behandelt wurden. Die Zellen wurden vor der TPA-Behandlung für 48h in DMEM/0.5% FCS kultiviert. Ausgefüllte Pfeile symbolisieren Veränderungen in der DMS-Reaktivität von Guaninen, schattierte Pfeile Veränderungen in der DMS-Reaktivität von Adeninen. Nach oben gerichtete Pfeile zeigen DMS-Hyperreaktivitäten, nach unten gerichtete Pfeile DMS-Protektionen an.

proteinfreier DNA (Abb. 22B). TPA-Behandlung ändert das DMS-Reaktivitätsmuster nicht weiter (Abb. 22B). Dies zeigt, daß in den AdE1-transformierten Zellen nicht jede AP-1 (-ähnliche) Bindungsstelle beeinflußt wird. Die Nichtbesetzung des Kollagenase-TRE in den transformierten Zellen scheint spezifisch für dieses Element und das daran bindende AP-1 zu sein. Die Ergebnisse legen es nahe, daß AdE1a, im Gegensatz zu den berichteten *in vitro* Ergebnissen (Offringa et al., 1990), *in vivo* zu einer Hemmung der Bindung von AP-1 an das Kollagenase-TRE führt. Diese Implikation wird durch Transfektionsexperimente unterstützt, in denen eine AdE1a-vermittelte Repression allein durch die DNA-Bindungsregion des c-jun-Proteins auf chimäre Proteine übertragen werden kann (P. Angel et al., Manuskript in Vorbereitung).

AdE1a und der Glucocorticoidrezeptor scheinen also mit der AP-1-abhängigen Phorbolsterinduktion des Kollagenase-Gens über unterschiedliche Mechanismen zu interferieren. Während der GR die Aktivität von AP-1 hemmt, ohne dessen DNA-Bindung zu beeinflussen, verhindert AdE1a die Bindung von AP-1 an die DNA *in vivo*.

## Diskussion

Die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen DNA-Elementen ist die Voraussetzung für die Steuerung des genetischen Programms jeder Zelle (als Übersichtsartikel s. Maniatis et al., 1987; Mitchell & Tjian, 1989). Die komplexen physiologischen Vorgänge in der Zelle und die Organisation ihrer genomischen DNA in Chromatin (als Übersichtsartikel s. Eissenberg et al., 1985; Wolffe, 1990) machen ein Verständnis genregulatorischer Mechanismen allein aufgrund von *in vitro* DNA-Bindungsstudien jedoch unmöglich. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob und wie positiv und negativ wirkende extrazelluläre Signale die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit der DNA in lebenden Zellen (*in vivo*) beeinflussen.

Am Beispiel zweier durch Phorbolster-Tumorpromotoren induzierter Gene, dem "immediate early"-Gen *c-fos* und dem von ihm über den Transkriptionsfaktor AP-1 gesteuerten Kollagenase (Typ I)-Gen, wurde gezeigt, daß ein und dieselbe Signalkette für die Genaktivierung einmal präformierte, konstitutiv an die DNA bindende Proteinkomplexe, wie im Falle des *c-fos*-Gens, aber auch induzierbar an die DNA bindende Proteinkomplexe, wie bei der Regulation des Kollagenase-Gens, benützt. Sowohl die präformierten DNA-Protein-Komplexe am *c-fos*-SRE als auch das durch Phorbolster zur Bindung an das Kollagenase-TRE induzierte AP-1 sind auch Ziele für die negative Regulation der Gene. Das *c-fos*-SRE vermittelt die negative Autoregulation des Gens (König et al., 1989; Lucibello et al., 1989) und die erhaltenen Ergebnisse legen hierfür einen Mechanismus nahe, der über konstitutiv an das SRE gebundene Proteinkomplexe wirkt. AP-1 ist Ziel der antagonistischen Wirkungen von Phorbolestern und des Adenovirus (Ad) E1a-Proteins bzw. von Glucocorticoiden auf die Transkription des Kollagenase-Gens. Die erhaltenen Ergebnisse legen es nahe, daß der Glucocorticoidrezeptor die AP-1-Aktivität hemmt, ohne dessen DNA-Bindung *in vivo* zu beeinflussen, während AdE1a die Besetzung der AP-1-Bindestelle verhindert.

## Konstitutive Bindung von Proteinen an das c-fos-SRE *in vivo*

Das bereits in unbehandelten NIH 3T3- und F9-Zellen veränderte *in vivo* DMS-Reaktivitätsmuster am SRE und der angrenzenden AP-1-ähnlichen Bindungsstelle legt es nahe, daß diese DNA-Sequenzen schon vor der Aktivierung des c-fos-Gens mit Proteinen besetzt sind. Die DMS-Behandlung der Zellen führte zu keiner Induktion der c-fos-Transkription (s. Abb. 1), so daß die gefundene Besetzung des SRE mit Transkriptionsfaktoren als Folge der DMS-Behandlung während der "footprinting"-Reaktion sehr unwahrscheinlich erscheint. Außerdem zeigte sich eine Besetzung des SRE in unbehandelten Zellen *in vivo* auch bei Verwendung eines anderen DNA-modifizierenden Agens, nämlich UV-Strahlung ("photofootprinting", Becker & Wang, 1984). Obwohl UV-Strahlung zu einer Aktivierung des c-fos-Gens führt (Büscher et al., 1988), scheint eine induzierte DNA-Bindung von Proteinen durch die UV-Behandlung unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen. Die Zellen wurden für zehn Sekunden bei 0°C bestrahlt und dann sofort lysiert. Eine enzymatische Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sollte dabei nicht stattfinden. Diese Ergebnisse der genomischen DMS- und "photofootprinting"-Experimente sind konsistent mit der von Renz et al. (1985) berichteten Beobachtung, daß eine DNase I-hypersensitive Stelle um Nukleotidposition -290 (bezogen auf den Startpunkt der Transkription +1), und damit in unmittelbarer Nähe des SRE, im c-fos-Promotor bereits in ruhenden Maus-Fibroblasten vorhanden ist und sich während der Stimulation des c-fos-Gens durch Serum nicht ändert.

In NIH 3T3-Zellen ergibt sich ein DMS-Reaktivitätsmuster, das identisch ist mit dem von Herrera et al. (1989) in der menschlichen, epidermalen Karzinomzelllinie A431 beschriebenen Muster. Bei den DNA-bindenden Proteinen handelt es sich somit wohl um das murine Gegenstück zu dem beschriebenen Multiproteinkomplex in menschlichen Zellen. *In vitro* DMS-Protektionsanalysen mit isolierten Proteinen legen es nahe, daß der Multiproteinkomplex in A431-Zellen ein SRF-Dimer, p62<sup>TCF</sup> und mindestens ein weiteres Protein, das proximal von SRF bindet, umfaßt (Herrera et al., 1989). Obwohl die AP-1-ähnliche

Bindungsstelle (Piette & Yaniv, 1987; Sassone-Corsi et al., 1988; Schönthal et al., 1989; Fisch et al., 1989) unmittelbar 3' vom SRE AP-1 (Fos/Jun) *in vitro* binden kann (Shaw et al., 1989a), handelt es sich bei dem an diese Sequenz *in vivo* bindenden Protein mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um AP-1 (Fos/Jun). Die hier durchgeführten *in vivo* "footprinting"-Experimente in undifferenzierten F9-Teratokarzinom-Stammzellen zeigen dasselbe DMS-Reaktivitätsmuster an der AP-1-ähnlichen Bindungsstelle wie in NIH 3T3-Zellen (diese Arbeit) und in A431-Zellen (Herrera et al., 1989), obwohl undifferenzierte F9-Zellen keine detektierbaren Mengen an AP-1 (Fos/Jun) enthalten (Kryszke et al., 1987; Müller & Wagner, 1984; Rütter et al., 1985; meine eigenen, nicht publizierten Ergebnisse). Außerdem können das SRE und die AP-1-ähnliche Bindungsstelle, zumindest *in vitro*, nicht gleichzeitig mit SRF und AP-1 (Fos/Jun) besetzt werden (Shaw et al., 1989a).

#### **Ein Zelltyp-spezifischer Unterschied in der Multiprotein-komplexbildung über dem c-fos-SRE *in vivo***

Die wahrscheinlichste Interpretation der in den genomischen "footprinting"-Experimenten beobachteten, fehlenden Protektion der beiden Guanine -319 und -318 an der 5'-Grenze des SRE ist die, daß p62<sup>TCF</sup> *in vivo* in F9-Zellen nicht in die Komplexbildung involviert ist und sich somit kein ternärer Komplex ausbildet. Die Methylierung dieser Guanine verhindert die ternäre Komplexbildung *in vitro* (Shaw et al., 1989b) und diese Guanine werden *in vitro* nur dann vor Methylierung geschützt, wenn p62<sup>TCF</sup> im Komplex vorhanden ist (Herrera et al., 1989). Außerdem legen es *in vitro* DNase I-"footprinting"- und UV-"crosslinking"-Experimente mit SRF und gereinigtem p62<sup>TCF</sup> nahe, daß p62<sup>TCF</sup> unmittelbar 5' vom SRE und damit im Bereich der Guanine -319 und -318 direkte Kontakte mit der DNA bildet (P. E. Shaw, persönliche Mitteilung, Manuskript eingereicht). Die Differenzierung der F9-Zellen mit Retinsäure zu Zellen, die Ähnlichkeit zu primären, parietalen Endoderm-Zellen aufweisen (Strickland & Mahdavi, 1978) führt zu keiner Veränderung des DMS-Reaktivitätsmusters. Eine verstärkte Bindung von p62<sup>TCF</sup> scheint somit auch in den so differenzierten F9-Zellen nicht

stattzufinden. An der Besetzung der AP-1-ähnlichen Bindungsstelle ändert sich ebenfalls nichts, obwohl die Differenzierung von F9-Zellen mit Retinsäure zu einer Induktion der, in undifferenzierten Zellen nicht nachweisbaren, AP-1-Bindungsaktivität führt (Kryszke et al., 1987; Yang-Yen et al., 1990a; meine eigenen, nicht veröffentlichten Daten).

Kernextrakte aus undifferenzierten F9-Zellen besitzen jedoch, wie diejenigen aus NIH 3T3-Zellen, die Fähigkeit zur Bildung des ternären Komplexes *in vitro* (s. Abb. 8). Dies impliziert, daß p62<sup>TCF</sup> in beiden Zelltypen vorhanden ist, die DNA-Bindung *in vivo* jedoch in Zelltyp-spezifischer Weise reguliert wird. Die Ergebnisse unterstreichen, zusammen mit früher beschriebenen, ähnlichen Befunden über andere Transkriptionsfaktoren (Ephrussi et al., 1985; Becker et al., 1987; Mueller & Wold, 1989; Pfeifer et al., 1990) die Wichtigkeit solcher *in vivo* Experimente. Es ist bisher nicht klar was zu dem Zelltyp-spezifischen Unterschied in der Komplexbildung am *c-fos*-SRE *in vivo* führt. Möglicherweise unterscheiden sich die Zelltypen in einem zusätzlichen, für die ternäre Komplexbildung notwendigen Protein oder in der Aktivität eines modifizierenden Enzyms. Solche Faktoren könnten für die Komplexbildung *in vitro* nicht notwendig sein oder modifizierende Enzyme (z. B. Kinasen oder Phosphatasen) könnten durch die Extraktpräparation aktiviert werden und zur Bindung von p62<sup>TCF</sup> *in vitro* führen.

Sowohl in NIH 3T3-Zellen als auch in F9-Zellen war weder 15 Minuten nach TPA-Stimulation, wenn die *c-fos*-Transkription maximal ist, noch 60 Minuten nach TPA-Gabe wenn die Transkription bereits wieder abgeschaltet ist (vgl. Abb. 7) eine Veränderung im EMSA-Reaktivitätsmuster zu erkennen. Die Ergebnisse legen es somit nahe, daß sich die Besetzung des SRE mit Proteinen im Verlauf der transienten Induktion der *c-fos*-Transkription nicht ändert.

### **Die Rolle des ternären Komplexes bei der Induktion der *c-fos*-Transkription**

In F9-Zellen ist auch während der Induktion der *c-fos*-Transkription keine Bindung von p62<sup>TCF</sup> *in vivo* und damit keine Bildung des ternären Komplexes feststellbar. In Übereinstimmung

damit ist die Induktion des mutierten c-fos-Promotorkonstruktes -356pm18, das keinen ternären Komplex mehr ausbilden kann, durch TPA und Serum in diesen Zellen nicht beeinträchtigt. Überraschenderweise ist auch in NIH 3T3-Zellen die Induktion sowohl dieses Konstruktes als auch die der SREel-Oligonukleotidkonstrukte (s. Abb. 8a und Abb. 10) nicht vermindert. Allerdings ist die allgemeine Promotor-Effizienz des -356pm18 Konstruktes in NIH 3T3-Zellen (nicht in F9-Zellen) niedriger. Die in den "nuclear run-on"-Analysen gemessene Transkriptionsrate des endogenen c-fos-Gens war in F9-Zellen um ein Vielfaches niedriger als in NIH 3T3-Zellen (nach Normalisierung auf gleiche Mengen an zur Hybridisierung eingesetzten, markierten Transkripten), während der Induktionsfaktor der Transkription nach TPA-Behandlung beider Zelltypen vergleichbar war (s. Abb. 7). Dies bedeutet, daß in F9-Zellen bei gleicher Induzierbarkeit des c-fos-Gens durch TPA, die basale Transkription im Unterschied zu NIH 3T3-Zellen stark reduziert ist. Dies liegt nicht an einer mangelnden Bindung von SRF an das SRE, denn die von SRF verursachten Veränderungen im DMS-Reaktivitätsmuster im SRE (alle beeinflussten Guanine außer Positionen -319 und -318; Herrera et al., 1989) sind in F9- und NIH 3T3-Zellen vergleichbar stark ausgeprägt (s. Abb. 4). Ein Grund für die erniedrigte Basalexpression von c-fos könnte die fehlende Bindung von p62<sup>TCF</sup> *in vivo* sein.

Die Ergebnisse der genomischen "footprinting"-Experimente in F9-Zellen, die "nuclear run-on"-Analysen und die Transfektionsexperimente legen es somit nahe, daß die Bildung des ternären Komplexes keine Voraussetzung für die transiente *Induktion* der c-fos-Transkription durch Serum und Phorbol ester ist; sie scheint jedoch für die *Effizienz* des c-fos-Promotors eine Rolle zu spielen.

Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu Daten zu sein, die in anderen Labors erhalten wurden. Ergebnisse von Shaw et al. (1989b) legten es nahe, daß die Bildung des ternären Komplexes für die effiziente Induktion von c-fos-Promotorkonstrukten in NIH 3T3-Zellen notwendig ist. Eine andere Untersuchung von Graham & Gilman (1991) in BALB/c 3T3-Zellen impliziert dagegen, daß zwar die Induktion durch Phorbol ester, nicht aber die Seruminduktion von der ternären Komplexbildung abhängt. Da



SRF zusammen mit p62<sup>TCF</sup> *in vitro* eine mindestens fünfzigfach höhere Bindungsaffinität zum SRE aufweist (Schröter et al., 1990), könnte p62<sup>TCF</sup> als stabilisierender Faktor wirken, der SRF hilft effizienter an das SRE zu binden, anstatt selbst als Ziel für extrazelluläre Signale zu dienen. Diese Erklärung schließt die Möglichkeit ein, daß SRF selbst oder ein SRF-assoziiertes, von p62<sup>TCF</sup> unterschiedliches Protein, Endpunkt für unterschiedliche Signalketten sein könnte. Damit konsistent ist die Beobachtung, daß in den beiden oben angeführten Studien (Shaw et al., 1989b; Graham & Gilman, 1991) die Induzierbarkeit der Konstrukte, die keinen ternären Komplex mehr bilden können, lediglich reduziert, jedoch nicht aufgehoben war. Wenn ausschließlich p62<sup>TCF</sup> das Ziel Serum- oder Phorbolster-induzierter Modifikationen wäre, sollte die Induktion der mutierten Konstrukte vollständig verhindert werden. Darüberhinaus sind die Nukleotide 5' vom SRE, die für die Bildung des ternären Komplexes notwendig sind (Shaw et al., 1989b) bei manchen SRE-ähnlichen Sequenzen anderer, mit c-fos koregulierter "immediate early"-Gene nicht konserviert (Treisman, 1990 und Referenzen darin). Die hier gegebene Erklärung schließt nicht aus, daß p62<sup>TCF</sup> unter bestimmten Bedingungen, durch eine Steigerung der SRF-Bindung an das SRE, für die Induktion von c-fos notwendig werden kann. Dies könnte in Zellen der Fall sein, die weniger SRF oder ein SRF enthalten, das (z. B. aufgrund unterschiedlicher Modifikation) weniger effizient an die DNA bindet. Daß Phorbolster, im Unterschied zu Serum, in demselben Zelltyp p62<sup>TCF</sup> für die effiziente c-fos-Induktion benötigen (Graham & Gilman, 1991), könnte seine Ursache in unterschiedlichen Effizienzen der Signalketten (Proteinkinase C-abhängige bzw -unabhängige Signalwege) haben. Phorbolster-Behandlung könnte in bestimmten Zelltypen weniger effizient in Bezug auf potentielle Modifikationen von SRF oder einem SRF-assoziierten Protein sein als Serum. Um die c-fos-Transkription effizient stimulieren zu können, wäre p62<sup>TCF</sup> in solchen Zellen von Vorteil, da es der kleineren Zahl modifizierter SRF-Moleküle helfen kann, das SRE effizient zu besetzen.

Obwohl es Zelltyp-spezifische Unterschiede in dem Multiproteinkomplex über dem c-fos-SRE gibt, so ändert sich die Besetzung des SRE während der Aktivierung des Gens durch

Phorbolester (diese Arbeit) oder Wachstumsfaktoren (Herrera et al., 1989; meine eigenen, nicht veröffentlichten Daten) nicht. Die transiente Induktion des c-fos-Gens erfolgt also über präformierte DNA-Protein-Komplexe. Dies könnte die Grundlage für die extrem schnelle Aktivierung des c-fos-Gens und anderer über SRE-ähnliche Sequenzen regulierter "immediate early"-Gene (Treisman, 1990 und Referenzen darin) sein.

Zur Steuerung der c-fos-Transkription könnten extrazelluläre Signale die Transaktivierungsfähigkeit solcher konstitutiv an die DNA gebundenen Proteinkomplexe durch posttranslationale Modifikationen oder durch die induzierte Interaktionen mit akzessorischen Proteinen (die keine detektierbaren DNA-Kontakte machen) modulieren.

### **Phosphorylierung von SRF als Regulationsmechanismus der c-fos-Transkription?**

Da p62<sup>TCF</sup> für die Induktion des c-fos-Gens durch Phorbolester nicht unbedingt notwendig ist (diese Arbeit), liegt es nahe an posttranslationale Modifikationen von SRF als Regulationsmechanismus der transienten Aktivierung des c-fos-Gens zu denken. In menschlichen Zellen liegt SRF als Phosphoprotein (Prywes et al., 1988) vor, das zusätzlich glykosyliert ist (Schröter et al., 1990). Phosphorylierungen von Transkriptionsfaktoren, die zu einer Erhöhung ihrer Transaktivierungsfähigkeit führen wurden für die Faktoren CREB (Gonzales & Montminy, 1989) und c-Jun (Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991; Pulverer et al., 1991) berichtet.

Die von mir durchgeführten Immunpräzipitationen mit einem gegen ein bakteriell exprimiertes trpE-SRF-Fusionsprotein erzeugten Antiserum (s. Abb. 11) aus Lysaten [<sup>32</sup>P]Orthophosphatmarkierter F9-Teratokarzinom-Stammzellen ergaben, daß SRF auch in diesen Zellen als Phosphoprotein vorliegt. Während der transienten Induktion des c-fos-Gens durch den Phorbolester TPA konnte jedoch in der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese (in mehreren Experimenten) keine Veränderung im Laufverhalten von oder im Phosphateinbau in immunpräzipitiertes SRF festgestellt werden. Dies läßt darauf schließen, daß SRF nach Phorbolester-Behandlung keine Modifikationen erfährt, die zu

einer so nachweisbaren Veränderung im Molekulargewicht führen. Veränderungen im (eindimensionalen) Laufverhalten nach TPA-Behandlung von Zellen wurden beispielsweise für das Fos-Protein (Barber & Verma, 1987; S. Gebel et al., Manuskript in Vorbereitung) und das c-Jun-Protein (Pulverer et al., 1991) beschrieben. Die zweidimensionale Auftrennung von SRF-Peptiden nach Chymotrypsin-Spaltung von immunpräzipitiertem, *in vivo* [<sup>32</sup>P]-markiertem SRF ergab keine grundlegende Veränderung im Phosphopeptidmuster von SRF aus unbehandelten oder aus für 15 bzw. 45 Minuten mit TPA behandelten F9-Zellen. Eine Ausnahme bildet jedoch ein schwaches Peptidsignal, das nur mit SRF aus unbehandelten Zellen erhalten wurde und nach TPA-Behandlung nicht mehr nachweisbar ist. Dies wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet und deutet auf die TPA-induzierte Dephosphorylierung eines Peptids hin. Eine Dephosphorylierung eines Phosphoserinrestes nach TPA-Behandlung (die zu einer Verstärkung der DNA-Bindung führt) wurde für das c-Jun-Protein beschrieben (Boyle et al., 1991). Ob das erhaltene Ergebnis spezifisch für F9-Zellen bzw. für die Induktion mit TPA ist und ob diese Veränderung im SRF funktionelle Relevanz besitzt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Daten anderer Gruppen legen es nahe, daß sich das Phosphorylierungsmuster von SRF in HeLa- und A431-Zellen nach Behandlung mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) nicht nachweisbar ändert (Prywes et al., 1988; Manak et al., 1990).

SRF wird *in vivo* an Serinresten phosphoryliert (Prywes et al., 1988) und enthält im N-terminalen Bereich eine Konsensus-erkennungssequenz für die Proteinkinase Casein-Kinase (CK) II (Krebs et al., 1988; Norman et al., 1988), die durch dieses Enzym phosphoryliert werden kann (Manak et al., 1990; Gauthier-Rouviere et al., 1991). Dies ist deshalb interessant, da die Aktivität von CK II nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren gesteigert wird (Sommercorn et al., 1987; Klarlund & Czech, 1988; Ackerman & Osheroff, 1989; Carroll & Marshak, 1989; Ackerman et al., 1990) und da die Mikroinjektion von CK II in embryonale Ratten-Fibroblasten (REF-52-Zellen) die Expression von c-fos induziert (Gauthier-Rouviere et al., 1991). Die Phosphorylierung von SRF an der CK II-Erkennungssequenz erhöht die Bindungsrate

("on-" und "off-rate") von SRF *in vitro*, nicht jedoch die Affinität von SRF zum SRE (Marais et al., 1992; Janknecht et al., 1992). Die Fähigkeit von SRF mit p62<sup>TCF</sup> zu interagieren wird durch Phosphorylierungen an dieser Sequenz nicht beeinflusst (Marais et al., 1992; Janknecht et al., 1992) und die Transaktivierungsfähigkeit von SRF *in vitro* wird durch Mutation dieser Phosphorylierungsstellen nicht beeinträchtigt (Janknecht et al., 1992).

Durch die veränderte Bindungsrate von SRF könnten induzierte Phosphorylierungen an der CK II-Erkennungssequenz zu einem Austausch von inaktivem SRF mit aktivem SRF am SRE führen und somit c-fos aktivieren, ohne daß sich die apparente Besetzung des SRE mit Proteinen ändern würde. Bisher konnte allerdings keine Veränderung in der Phosphorylierung der CK II-Sequenz nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden, so daß die Phosphorylierung an der CK II-Konsensussequenz eher eine konstitutive als eine durch extrazelluläre Stimuli induzierte Modifikation zu sein scheint.

### **Phorbolster-induzierte DNA-Protein-Interaktionen im Promotor des Kollagenase-Gens**

Die Phorbolsterinduktion der Transkription des Kollagenase-Gens zeigt einen anderen Zeitverlauf als die der "immediate early"-Gene; sie erreicht ihr Maximum nach ca. 6 Stunden und die Induktion ist fast vollständig von *de novo* Proteinsynthese abhängig (s. Abb. 14). Die Transkriptionsaktivität nach Phorbolster-Behandlung der Zellen korreliert mit Veränderungen in der *in vivo* DMS-Reaktivität an DNA-Sequenzen, die früher (Angel et al., 1987b) als Bindungsstellen für Proteine *in vitro* definiert wurden. Lediglich 30 Minuten nach TPA-Gabe ist in den genomischen "footprinting"-Experimenten noch keine Veränderung in der DMS-Reaktivität feststellbar. Dies könnte seine Ursache darin haben, daß die Veränderungen in der Proteinbindung so gering sind, daß sie jenseits der Nachweisgrenze der *in vivo* "footprinting"-Technik liegen. Die TPA-induzierte Besetzung von anderen Sequenzen (Box1 und Boxen 3-5), außer dem für die TPA-Induktion absolut notwendigen TRE (Angel et al., 1987a, b), ist konsistent mit dem Befund, daß für die volle TPA-

Induktion der Kollagenase-Transkription zusätzliche Sequenzen in 5'-Richtung vom TRE benötigt werden (Angel et al., 1987a; H.-P. Auer et al., Manuskript in Vorbereitung). Die PEA3-Erkennungssequenz (überlappend mit Box3, s. Abb. 19), unmittelbar distal vom TRE, kann den Transkriptionsfaktor PEA3 binden und wirkt mit dem TRE synergistisch in Bezug auf die TPA-Induktion (Gutman & Wasylyk, 1990). Die Faktoren, die mit den anderen Proteinbindungsstellen (Box 1 und Boxen 3-5) interagieren sind bisher nicht bekannt.

Die Experimente in Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin ergaben, daß die TPA-induzierte Besetzung aller untersuchten DNA-Bindungsstellen und die bereits in unbehandelten Zellen nachweisbare, schwache Besetzung des TRE in Anwesenheit von Anisomycin scheinbar vollständig aufgehoben sind (verglichen mit proteinfreier, *in vitro* methylierter DNA). Dieses Ergebnis legt es nahe, daß die Phorbolster-induzierte Besetzung der Proteinbindungsstellen im Kollagenase-Promotor und die basale Bindung von AP-1 an das TRE von *de novo* Proteinsynthese abhängig sind. Die vollständige Aufhebung der AP-1-Bindung nach 2 Stunden Anisomycin-Behandlung ist wahrscheinlich durch die kurze Halbwertszeit der AP-1-Proteine (Curran et al., 1984) bedingt. Die fehlende Besetzung der Proteinbindungsstellen in Anwesenheit von Anisomycin spiegelt somit die ausbleibende Induktion der Transkription durch TPA unter diesen Bedingungen wieder. Die Transkription sinkt in Anwesenheit von Anisomycin jedoch nicht unter den Basalwert (ohne Anisomycin) ab (s. Abb. 14), so daß dieser entweder durch sehr schwache, nicht mehr detektierbare DNA-Protein-Interaktionen an den betrachteten Protein-Bindungsstellen verursacht wird oder aber nicht von der Besetzung dieser Sequenzen abhängt.

Interessanterweise kann die Transkription von CAT-Fusions-Genkonstrukten, die 5'-Deletionsmutationen des Kollagenase-Promotors bis Position -74 enthalten (d. h. denen alle Sequenzen "stromaufwärts" vom TRE fehlen), nach transienter Transfektion in Zellen, auch ohne Proteinsynthese aktiviert werden und die Behandlung der Zellen mit Proteinsyntheseinhibitoren aktiviert bereits selbst die Transkription. Erst Konstrukte, die

Promotorsequenzen zwischen Positionen -180 und -300 enthalten, zeigen dieselbe proteinsyntheseabhängige Aktivierung der Transkription wie das endogene Kollagenase-Gen (H.-P. Auer, unveröffentlichte Daten). Was die Proteinsynthese-Abhängigkeit der Expression dieser langen Promotorkonstrukte und des endogenen Gens bestimmt ist nicht bekannt.

Das nach TPA-Behandlung der Zellen gefundene DMS-Reaktivitätsmuster am TRE entspricht dem mit affinitäts-gereinigtem AP-1 am TRE *in vitro* erhaltenen Muster (Abb. 16), so daß die in lebenden Zellen nach TPA-Behandlung induzierten Veränderungen am TRE von AP-1 oder einem sehr nahe verwandten Proteinkomplex stammen. Eine Ausnahme macht das (am weitesten distal gelegene) Guanin an Position -72 im TRE, das durch gereinigtes AP-1 *in vitro* nicht erkennbar geschützt wird. Die schwache Protektion dieses Guanin *in vivo* wird somit wohl nicht von AP-1 verursacht. Es wird auch von nichtfraktionierten Zellkernextrakten *in vitro* nicht protektiert und verhält sich damit so wie die unmittelbar benachbarte PEA3-Bindungsstelle (Daten nicht gezeigt). Die Protektion dieses Guanins *in vivo* hängt somit wahrscheinlich von der Besetzung der PEA3-Bindungsstelle ab. Möglicherweise können die PEA3- und die AP-1-Bindungsstellen nur *in vivo* zusammen besetzt werden, wie es für das c-fos-SRE und die angrenzende AP-1-ähnliche Bindungsstelle beschrieben ist (Shaw et al., 1989a; Herrera et al., 1989).

### **Mechanismus der Interferenz zwischen Glucocorticoidrezeptor und AP-1**

Glucocorticoide wirken der tumorpromovierenden und inflammatorischen Wirkung von Phorbolestern entgegen (Nelson, 1962; Belman & Troll, 1972; Scribner & Slaga, 1973) und hemmen die Aktivierung AP-1-abhängiger Gene, wie diejenige des Kollagenase (Typ I)-Gens, über die AP-1-Bindungsstelle und einen Mechanismus der den Glucocorticoidrezeptor (GR) benötigt (Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Schüle et al., 1990). Die Ergebnisse von *in vitro* Experimenten verschiedener Gruppen legen es nahe, daß der GR mit AP-1-Proteinen über Protein-Protein-Interaktionen assoziieren kann (Diamond et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b;

Touray et al., 1991). Eine entscheidende Frage bezüglich des Mechanismus der antagonistischen Wirkung von Phorbolestern und Glucocorticoiden war, ob die Glucocorticoidrepression auf der Aufhebung der DNA-Bindung von AP-1 beruht. Diese Frage wurde bisher nur durch *in vitro* Experimente (Gelretardationsanalysen) zu beantworten versucht und führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Jonat et al. (1990) berichteten, daß die TRE-Bindungsaktivität in Extrakten von mit TPA und Dexamethason behandelten Zellen, verglichen mit TPA-behandelten Zellen, nicht vermindert war. Demgegenüber zeigten Yang-Yen et al. (1990b) einen negativen Einfluß des GR auf die DNA-Bindungsfähigkeit eines bakteriell exprimierten (unvollständigen) Jun-Proteins.

Da der Transkriptionsfaktor, der das Kollagenase-Gen aktiviert jedoch sehr wahrscheinlich aus Fos/Jun-Heterodimeren besteht (Schönthal et al., 1988a, b; Chiu et al., 1988), lag es nahe zunächst den Einfluß des GR auf Fos/Jun und affinitätsgereinigtes AP-1 *in vitro* zu untersuchen. Die Ergebnisse der von mir durchgeführten Gelretardationsanalysen mit *in vitro* synthetisierten Proteinen legen es nahe, daß zwar die DNA-Bindungsfähigkeit von Jun/Jun-Homodimeren, jedoch nicht von Fos/Jun-Heterodimeren und von affinitätsgereinigtem AP-1 in Anwesenheit des GR gehemmt ist. Jun/Jun-Homodimere sind wesentlich instabiler als Fos/Jun-Heterodimere (Rauscher et al., 1988; Smeal et al., 1989). Ihre Dimerisierung könnte deshalb durch mit der GR-Assoziation verbundenen Konformationsänderungen gestört werden. Im Falle der Fos/Jun-Heterodimere und des gereinigten AP-1 konnten aber keine zusätzlichen, langsamer wandernden Komplexe ("supershift") beobachtet werden, wie man es durch die Interaktion des GR mit AP-1 (Fos/Jun) erwarten könnte. Die Protein-Protein-Interaktionen zwischen AP-1 und GR sind *in vitro* ohne kovalent-vernetzende Agenzien (chemische "cross-linker") sehr labil (Diamond et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; meine eigenen nichtveröffentlichten Daten), so daß die Komplexe aus AP-1 und GR während der Gelaufreinigung dissoziiert worden sein könnten.

Konsistent mit den erhaltenen *in vitro* Daten ändern sich die TPA-induzierte Besetzung und die DNA-Protein-Kontakte am TRE in Anwesenheit von Dexamethason auch *in vivo* nicht, obwohl die

Transkription des Kollagenase-Gens unter diesen Bedingungen stark reprimiert ist (vgl. Abb. 19A, B und Abb. 20). Dabei spielt es keine Rolle ob der GR vor AP-1 aktiviert wird (d. h. wenn Dexamethason vor TPA gegeben wird) oder ob der GR durch Dexamethason-Gabe erst aktiviert wird, wenn AP-1 durch TPA aktiviert wurde und bereits an der DNA sitzt (Abb. 21). Die unveränderten DNA-Protein-Kontakte am TRE *in vivo* schließen eine Konkurrenz zwischen dem GR und AP-1 um die Bindung an das TRE als Mechanismus für die Interferenz zwischen beiden Faktoren aus.

Interessanterweise wurden TPA-induzierte Protektionen von Guaninen in unmittelbarer Nachbarschaft vom TRE, nämlich in der PEA3-Erkennungssequenz und in Box 1, durch Glucocorticoid-Behandlung zumindest teilweise wieder aufgehoben (Abb. 19A, B). Da das TRE für die Glucocorticoidrepression ausreichend ist (Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Schüle et al., 1990), könnte die Aufhebung von DNA-Protein-Interaktionen an diesen, dem TRE unmittelbar benachbarten Stellen, auf eine sterische Hinderung der Proteinbindung an diesen Sequenzen hinweisen, die durch die Bildung eines großen Proteinkomplexes zwischen GR und AP-1 hervorgerufen wird.

Angesichts der unveränderten Besetzung des TRE mit AP-1 *in vivo* sind verschiedene Mechanismen denkbar wie der GR mit der AP-1-Aktivität interferieren kann: (a) Der GR modifiziert AP-1; (b) Der GR kompetiert mit AP-1 um ein akzessorisches Aktivatorprotein ("Squelching", Ptashne & Gann, 1990 und Referenzen darin); (c) Der GR verhindert die DNA-Bindung von Fos/Jun, so daß ein nicht transaktivierendes Mitglied der AP-1-Familie (welches dieselben DNA-Protein-Kontakte machen müßte) an das TRE binden kann; (d) Der GR blockiert die Transaktivierungsfähigkeit von AP-1 (Fos/Jun) durch Protein-Protein-Interaktionen ohne dessen DNA-Bindung zu beeinflussen.

Eine Glucocorticoid-vermittelte Modifikation von AP-1 bleibt eine Möglichkeit, obwohl bisher keine Veränderungen in Modifikationen von AP-1 nach Dexamethason-Behandlung gefunden wurden (S. Gebel, nichtveröffentlichte Daten). Die Konkurrenz um einen gemeinsamen Koaktivator ("Squelching") ist sehr unwahrscheinlich, da es Mutanten des GR gibt, die die



Aktivität von AP-1 nicht mehr reprimieren können, aber die immer noch selbst transaktivieren können (A. C. B. Cato et al., Manuskript in Vorbereitung). Außerdem können GR-Mutanten, die keine Transaktivierungsdomäne mehr besitzen immer noch die Aktivität von AP-1 reprimieren (Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Schüle et al., 1990; A. C. B. Cato, unveröffentlichte Daten). Die Aufhebung der DNA-Bindung von Fos/Jun durch den GR *in vivo* und die darauf folgende Besetzung des TRE mit einer inaktiven AP-1-Subspezies (wobei sich die apparente Besetzung des TRE nicht ändern würde) kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings konnte ich zeigen, daß der GR die DNA-Bindungsaktivität von Fos/Jun nicht hemmt, zumindest nicht *in vitro*. Außerdem müßte der GR bei einem solchen Mechanismus spezifisch nur die DNA-Bindung von transaktivierenden AP-1-Proteinen verhindern. Ein solcher Mechanismus könnte zudem die partielle Aufhebung der Proteinbindung in der unmittelbaren Nachbarschaft des TRE nur schwer erklären.

Zusammengenommen machen die *in vitro* und die *in vivo* DNA-Bindungsstudien sowie die früher beschriebenen Protein-Protein-Interaktionen zwischen GR und AP-1 (Diamond et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Touray et al., 1991) einen Mechanismus wahrscheinlich, bei dem der GR mit der Transaktivierungsfähigkeit von AP-1 über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen interferiert, ohne dessen DNA-Bindung zu verhindern. Der GR ist nicht das einzige Mitglied aus der Überfamilie der Steroid/Thyroid-Hormonrezeptoren (Evans, 1988), das mit der Aktivität von AP-1 interferiert. Die Retinsäure-Rezeptoren (Nicholson et al., 1990; Schüle et al., 1991; Yang-Yen et al., 1991) und die T3/T4-Rezeptoren (Zhang et al., 1991) zeigen ein ähnliches Verhalten.

Der oben nahegelegte Mechanismus ist möglicherweise nicht der einzige über den ein Steroidhormonrezeptor mit AP-1 oder AP-1-verwandten Proteinen interferieren kann. In bestimmten Promotoren sind mehr oder weniger überlappende DNA-Bindungsstellen für beide Faktoren beschrieben worden (s. Schüle & Evans, 1991 und Referenzen darin). Die Interferenz kann in diesen Fällen auf dem Ausschluß der gleichzeitigen Bindung von

Rezeptor und AP-1-Proteinen und/oder der Einbeziehung anderer (positiv oder negativ wirkender) Transkriptionsfaktoren beruhen (Schüle & Evans, 1991). Der gegenseitige Ausschluß von Signalwegen, die mit Zelldifferenzierung bzw. Zellproliferation assoziiert sind, scheint für die Zelle sehr wichtig zu sein, so daß sich vielleicht mehrere Mechanismen entwickelt haben, um dieses Ziel zu erreichen.

### **AP-1 und AdE1a**

Die Expression des Adenovirus (Ad) E1a-Proteins führt zur Immortalisierung (Ruley et al., 1984) und, zusammen mit dem AdE1b-Protein oder dem Produkt des Ha-ras-Onkogens, zur Transformation primärer, Adenovirus-permissiver Zellen (Ruley, 1983). AdE1a aktiviert die Expression von Adenovirus-Genen und verschiedener zellulärer Gene (als Übersichtsartikel s. Berk, 1986); es reprimiert jedoch auch die Expression einer Reihe von viralen und zellulären Genen (Borrelli et al., 1984; Hen et al., 1985, 1986; Stein & Ziff, 1987; Webster et al., 1988; Offringa et al., 1988, 1990; Timmers et al., 1989; Frisch et al., 1990).

AdE1a hemmt die Phorbol-ester-induzierte Transkription des Kollagenase (Typ I)-Gens, wie der Glucocorticoidrezeptor, über den Transkriptionsfaktor AP-1 (Fos/Jun) (Offringa et al., 1990). AdE1a führt dabei zu keiner Hemmung der AP-1-Synthese und zu keiner nachweisbaren Hemmung der DNA-Bindungsfähigkeit von AP-1 *in vitro* (Offringa et al., 1990). Im Gegensatz zu den berichteten *in vitro* DNA-Bindungsdaten (Offringa et al., 1990), legen es die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo* "footprinting"-Experimente in primären (menschlichen), embryonalen Retinoblasten (HER) und zwei Klonen AdE1-transformierter HER nahe, daß das TRE des Kollagenase-Gens in den AdE1-transformierten Zellen nicht besetzt ist. Auch die Behandlung der Zellen mit TPA ändert daran nichts, während in den primären Zellen die Bindung von AP-1 an das TRE durch TPA induziert werden kann (s. Abb. 22A). Die AP-1-ähnliche Bindungsstelle im Promotor des c-jun-Gens (Angel et al., 1988b) ist dagegen auch in den AdE1-transformierten Zellen besetzt. Dies zeigt einmal, daß der Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen in den transformierten Zellklonen mit der angewendeten Methode *in*

*in vivo* möglich ist und nicht etwa durch die Heterogenität der verwendeten Zellen verhindert wird. Zum anderen legt es dieses Ergebnis nahe, daß AdE1a spezifisch auf das Kollagenase-TRE bzw. die daran bindenden Proteine, nämlich AP-1 (Fos/Jun) wirkt, über die AdE1a die Repression der Transkription vermittelt (Offringa et al., 1990). Genomische "footprinting"-Experimente mit Zellen, die eine induzierbare Expression des AdE1a-Proteins erlauben (stabile Transfektanten), sollten zeigen können, ob es sich bei der beobachteten Nichtbesetzung des TRE im Kollagenase-Promotor um einen Langzeit-Effekt handelt oder ob diese Veränderung durch die kurzzeitige Expression von AdE1a erreicht werden kann (und eventuell reversibel ist). Die im Widerspruch zu den hier gefundenen *in vivo* Ergebnissen stehende, unveränderte AP-1-Bindung *in vitro* (Offringa et al., 1990) hat ihre Ursache möglicherweise in einem Verlust von die DNA-Bindung beeinflussenden Modifikationen oder Protein-Protein-Interaktionen während der Extraktpräparation. Die von den genomischen "footprinting"-Daten nahegelegte Hemmung der DNA-Bindung von AP-1 wird unterstützt durch Transfektionsexperimente, in denen die Repression durch AdE1a über die DNA-Bindungsdomäne des c-Jun-Proteins auf chimäre Proteine übertragen werden kann (P. Angel et al., Manuskript in Vorbereitung).

Der negative Einfluß des transformierend wirkenden AdE1a-Proteins auf AP-1 (Fos/Jun), dessen Komponenten Fos und Jun selbst Zellen transformieren können und mit der Zellproliferation assoziiert sind (als Übersichtsartikel s. Angel & Karin, 1991), erscheint widersprüchlich. Die Hemmung der AP-1 (Fos/Jun)-Aktivität hängt von der konservierten Region 1 (CR1) im E1a-Protein ab (Offringa et al., 1990), die auch für die Repression der Aktivität anderer Gene und die Transformation von Zellen notwendig ist (Lillie et al., 1986, 1987). Die Fähigkeit zur Repression von Genen durch AdE1a scheint somit mit dessen Transformationsfähigkeit verknüpft zu sein. Die Hemmung der AP-1 (Fos/Jun)-Aktivität könnte durch die Derepression von Genen, die durch AP-1 (Fos/Jun) negativ kontrolliert werden, zur Transformation beitragen. AdE1a führt jedoch auch zu einer Erhöhung der c-jun-Transkription (Frisch et al., 1990; van Dam et

al., 1990; meine eigenen nicht veröffentlichten Daten). Dieser Effekt ist interessanterweise ebenfalls von der für die Transformation notwendigen CRI-Domäne abhängig (van Dam et al., 1990). Das Jun-Protein kann auch mit anderen Mitgliedern der Fos-Genfamilie und mit ATF/CREB-Proteinen heterodimere Komplexe bilden (Ryseck & Bravo, 1991 und Referenzen darin; Benbrook & Jones, 1990; Macgregor et al., 1990; Hai & Curran, 1991). Die Aktivität solcher von c-Fos/c-Jun verschiedenen c-Jun-haltigen Proteinkomplexe könnte durch AdE1a unbeeinflusst sein und diese könnten dann, durch die Bindung an AP-1 (-ähnliche)-DNA-Bindungsstellen, Gene aktivieren, die in die Transformation von Zellen involviert sind. Ein Beispiel einer durch AdE1a nicht reprimierbaren AP-1-ähnlichen Bindungsstelle findet sich im c-jun-Promotor (Angel et al., 1988b). Die von diesem Element vermittelte Transkriptionsaktivierung wird, im Gegensatz zu der vom TRE des Kollagenase-Gens vermittelten Aktivierung, durch AdE1a nicht gehemmt (Offringa et al., 1990; van Dam et al., 1990) und, konsistent damit, wird die DNA-Bindung von Proteinen an dieses Element *in vivo* durch AdE1a nicht verhindert (diese Arbeit, s. Abb. 22).

AdE1a scheint jedoch auch antionkogene Wirkungen zu haben. So ist das Metastasierungspotential von Ratten-Embryofibroblasten, die zusätzlich zu transfiziertem c-Ha-ras-Onkogen (kotransfiziertes) AdE1a exprimieren, verringert, verglichen mit Zellen, die nur c-Ha-ras exprimieren (Pozzatti et al., 1986; Steeg et al., 1988). Eine AdE1a-abhängige Hemmung der Metastasierungsfähigkeit und der Tumorigenität wurde auch für einige menschliche Tumorzelllinien gefunden (Frisch et al., 1990; Frisch, 1991). Allerdings ist die Transformationsfrequenz (d. h. die Häufigkeit von morphologisch transformierten Zellkolonien) bei den Ratten-Embryofibroblasten, die, zusätzlich zu c-Ha-ras, AdE1a exprimieren stark erhöht (Pozzatti et al., 1986). Eine Ursache der Verringerung des Metastasierungspotentials nach AdE1a-Expression könnte die reduzierte Synthese von Metalloproteinasen sein (Garbisa et al., 1987; Frisch et al., 1990); dabei könnte die Hemmung der AP-1 (Fos/Jun)-Aktivität zumindest für die Repression der Kollagenase (Typ I)-Expression verantwortlich sein (Frisch et al., 1990; Offringa et al., 1990).

Die onkogenen und antionkogenen Wirkungen von AdE1a beruhen möglicherweise auf der selektiven Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren durch das AdE1a-Protein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die von Phorbolster-Tumorpromotoren induzierte Signalkette *in vivo* sowohl präformierte, konstitutive DNA-Protein-Komplexe, wie bei der "immediate early"-Antwort des c-fos-Gens, als auch induzierbar an die DNA bindende Proteinkomplexe, wie im Falle des durch AP-1 gesteuerten Kollagenase-Gens, benützt, um Gene zu aktivieren. Zwei Signalwege, die der Phorbolsteraktivierung AP-1-abhängiger Gene entgegenwirken tun dies über unterschiedliche Mechanismen. Das Adenovirus E1a-Produkt scheint die DNA-Bindung von AP-1 *in vivo* zu verhindern, während Glucocorticoide über den Glucocorticoidrezeptor mit der Aktivität von AP-1 interferieren ohne dessen DNA-Bindung aufzuheben.

Obwohl die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit DNA-Elementen für die Steuerung von Genen notwendig ist, ist die Modulation der DNA-Bindung offensichtlich nicht die einzige Möglichkeit eukaryontischer Zellen, Gene positiv und negativ zu regulieren.

## Literaturverzeichnis

- Ackerman, P. & Osheroff, N. (1989). Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 11958-11965.
- Ackerman, P., Glover, C. V. C. & Osheroff, N. (1990). Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor: Relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its  $\beta$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 821-825.
- Almendral, J. M., Sommer, D., MacDonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J. & Bravo, R. (1988). Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2140-2148.
- Angel, P. & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-157.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. & 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. & 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. & 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. & Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**, 875-885.
- Barber, J. R. & Verma, I. M. (1987). Modifications of *fos* Proteins: Phosphorylation of *c-fos*, but not *v-fos*, is stimulated by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2201-2211.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344.
- Becker, M. M. & Wang, J. C. (1984). Use of light for footprinting DNA *in vivo*. *Nature* **309**, 682-687.
- Becker, P. B., Gloss, B., Schmid, W., Strähle, U. & Schütz, G. (1986). *In vivo* protein-DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of the hormone. *Nature* **324**, 686-688.
- Becker, P. B., Ruppert, S. & Schütz, G. (1987). Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. *Cell* **51**, 435-443.
- Belman, S. & Troll, W. (1972). The inhibition of croton oil-promoted mouse

- skin tumorigenesis by steroid hormones. *Cancer Res.* **32**, 450-454.
- Benbrook, D. M. & Jones, N. C. (1990). Heterodimer formation between CREB and JUN Proteins. *Oncogene* **5**, 295-302.
- Bender, T. P. (1987). Isolation of nuclei by dounce homogenization. In Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, New York. Unit 4.10.5.
- Berk, A. J. (1986). Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20**, 45-79.
- Bernstine, E. G., Hooper, M. L., Grandchamp, S. & Ephrussi, B. (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3899-3903.
- Biggin, M. D. & Tjian, R. (1989). Transcription factors and the control of Drosophila development. *Trends in Genetics* **5**, 377-383.
- Binetruy, B., Smeal, T. & Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**, 122-127.
- Borrelli, E., Hen, R. & Chambon, P. (1984). Adenovirus 2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature* **312**, 608-612.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H. K., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M. & 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.
- Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. & Müller, R. (1986). Expression of c-fos in NIH 3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle. *EMBO J.* **5**, 695-700.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. & 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.
- Carroll, D. & Marshak, D. R. (1989). Serum-stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 7345-7348.
- Chavrier, P., Janssen-Timmen, U., Mattei, M.-G., Zerial, P., Bravo, R. & Charnay, P. (1989). Structure, chromosomal localization, and expression of the mouse zinc-finger gene *Krox-20*: multiple gene products and co-regulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 787-797.
- Chen, E. Y. & Seeburg, P. (1985). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. & Karin, M. (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of

- AP-1 responsive genes. *Cell* **54**, 541-552.
- Christy, B. & Nathans, D. (1989). Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene *zif268*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4889-4895.
- Chung, C. T. & Miller, R. H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3580.
- Church, G. M. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Curran, T. (1988). The *fos* oncogene. In Reddy, E. P., Skalka, A. M. & Curran, T. (eds.). *The Oncogene Handbook*, Amsterdam, Elsevier, pp. 307-325.
- Curran, T. & Franza, B. R. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* **55**, 395-397.
- Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. & Verma, I. M. (1984). Viral and cellular *fos* proteins: a comparative analysis. *Cell* **36**, 259-268.
- Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K. & 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. & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489.
- Eissenberg, J. C., Cartwright, I. L., Thomas, G. H. & Elgin, S. C. R. (1985). Selected topics in chromatin structure. *Ann. Rev. Genet.* **19**, 485-536.
- Ephrussi, A., Church, G. M., Tonegawa, S. & Gilbert, W. (1985). B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* **227**, 134-140.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Felsenfeld, G. & McGhee, J. D. (1986). Structure of the 30nm chromatin fibre. *Cell* **44**, 375-377.
- Fisch, T. M., Prywes, R. & Roeder, R. G. (1987). *c-fos* sequences necessary for basal expression and induction by epidermal growth factor, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, and the calcium ionophore. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3490-3502.
- Fisch, T. M., Prywes, R. & Roeder, R. G. (1989). An AP-1 site in the *c-fos* gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1327-1331.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Saboutry, S., Dani, C., Jeanteur, P. & Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1431-1442.



- Fried, M. G. & Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of Lac repressor operator interaction by polyacrylamid gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6505-6525.
- Frisch, S. M. (1991). Antioncogenic effect of adenovirus E1a in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9077-9081.
- Frisch, S. M. & Ruley, H. E. (1987). Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* **262**, 16300-16304.
- Frisch, S. M., Reich, R., Collier, I. E., Genrich, L. T., Martin, G. & Goldberg, G. I. (1990). Adenovirus E1a represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene* **5**, 75-83.
- Galas, D. J. & Schmitz, A. (1978). DNase footprinting, a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **5**, 3157-3170.
- Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R. J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R. H., Khoury, G. & Liotta, L. A. (1987). Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. *Cancer Res.* **47**, 1523-1528.
- Garner, M. M. & Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the E. coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3047-3060.
- Gauthier-Rouviere, C., Basset, M., Blanchard, J.-M., Cavadore, J.-C., Fernandez, A. & Lamb, N. J. C. (1991). Casein kinase II induces c-fos expression via the serum response element pathway and p67<sup>SRF</sup> phosphorylation in living fibroblasts. *EMBO J.* **10**, 2921-2930.
- Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. & Evans, R. M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645-652.
- Gilbert, W., Maxam, A. & Mirzabekov, A. (1976). Contacts between the Lac repressor and DNA revealed by methylation. In *Control of ribosome synthesis, Alfred Benzon Symposium IX* (ed. N.O. Kjeldgaard and O. Maaloe), pp. 139-148. Academic Press, New York.
- Gilman, M. (1987). Ribonuclease protection assay. In Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, New York. Unit 4.7.
- Gilman, M. Z. (1988). The c-fos serum response element responds to protein kinase C-dependent and -independent signals but not to cyclic AMP. *Genes Dev.* **2**, 394-402.
- Gonzales, G. A. & Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene expression by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**, 675-680.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes

- which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1057.
- Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of the human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Graham, R. & Gilman, M. (1991). Distinct protein targets for signals acting at the c-fos serum response element. *Science* **251**, 189-192.
- Greenberg, M. E. & Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* **311**, 433-438.
- Greenberg, M. E., Hermanowski, A. L. & Ziff, E. B. (1986). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1050-1057.
- Greenberg, M. E., Siegfried, Z. & Ziff, E. B. (1987). Mutation of the c-fos gene dyad symmetry element inhibits serum inducibility of transcription *in vivo* and nuclear regulatory factor binding *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1217-1225.
- Groudine, M., Peretz, M. & Weintraub, H. (1981). Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 281-288.
- Gutman, A. & Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* **9**, 2241-2246.
- Hai, T. & Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3720-3724.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988). *Antibodies, A laboratory manual*. By Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Härtig, E., Loncarevic, I. F., Büscher, M., Herrlich, P. & Rahmsdorf, H. J. (1991). A new cAMP responsive element in the transcribed region of the human c-fos gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4153-4159.
- Hen, R., Borrelli, E. & Chambon, P. (1985). Repression of the immunoglobulin heavy chain enhancer by the adenovirus-2 E1A products. *Science* **230**, 1391-1394.
- Hen, R., Borrelli, E., Fromental, C., Sassone-Corsi, P. & Chambon, P. (1986). A mutated polyoma virus enhancer which is active in undifferentiated embryonal carcinoma cells is not repressed by adenovirus-2 E1A products. *Nature* **321**, 249-251.
- Herrera, R. E., Shaw, P. E. & 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. & Ponta, H. (1989). 'Nuclear' oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *Trends in Genetics* **5**, 112-116.

- Janknecht, R., Hipskind, R. A., Houthaeve, T., Nordheim, A. & Stunnenberg, H. G. (1992). Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *EMBO J.* **11**, 1045-1054.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H. & Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-1204.
- Kawamoto, T., Makino, K., Orita, S., Nakata, A. & Kakunaga, K. (1989). DNA bending and binding factors of the human  $\beta$ -actin promoter. *Nucleic Acids Res.* **17**, 523-537.
- Kessel, M. & Gruss, P. (1990). Murine developmental control genes. *Science* **249**, 374-379.
- Klarlund, J. K. & Czech, M. P. (1988). Insulin-like growth factor I and insulin rapidly increase casein kinase II activity in BALB/c 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 15872-15875.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J. & Herrlich, P. (1989). Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* **8**, 2559-2566.
- König, H. (1991). Cell-type specific multiprotein complex formation over the c-fos serum response element *in vivo*: ternary complex formation is not required for the induction of c-fos. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3607-3611.
- Krebs, E. G., Eisenman, R. N., Kuenzel, E. A., Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Lüscher, B. & Sommercorn, J. (1988). Casein kinase II as a potentially important enzyme concerned with signal transduction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **53**, 77-84.
- Kryszke, M.-H., Piette, J. & Yaniv, M. (1987). Induction of a factor that binds to the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* **328**, 254-256.
- Laemmli, U. D. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Lau, L. F. & Nathans, D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1182-1186.
- Leung, S. & Miyamoto, N. G. (1989). Point mutational analysis of the c-fos serum response factor binding site. *Nucleic Acids Res.* **17**, 1177-1195.
- Lillie, J. W., Green, M. & Green, M. R. (1986). An adenovirus E1a region required for transformation and transcriptional repression. *Cell* **46**, 1043-1051.
- Lillie, J. W., Loewenstein, P. M., Green, M. R. & Green, M. (1987). Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell* **50**, 1091-1100.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randell, R. J. (1951). Protein

- measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lucibello, F. C., Lowag, C., Neuberger, M. & Müller, R. (1989). *Trans*-repression of the mouse *c-fos* promoter: a novel mechanism of Fos-mediated *trans*-regulation. *Cell* **59**, 999-1007.
- Lucibello, F. C., Slater, E. P., Jooss, K. U., Beato, M. & Müller, R. (1990). Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *EMBO J.* **9**, 2827-2834.
- Macgregor, P. F., Abate, C. & Curran, T. (1990). Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1. *Oncogene* **5**, 451-458.
- Manak, J. R., de Bisschop, N., Kris, R. M. & Prywes, R. (1990). Casein kinase II enhances the DNA binding activity of serum response factor. *Genes Dev.* **4**, 955-967.
- Maniatis, T., Goodbourn, S. & Fischer, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237-1245.
- Marais, R. M., Hsuan, J. J., McGuigan, C., Wynne, J. & Treisman, R. (1992). Casein kinase II phosphorylation increases the rate of serum response factor-binding site exchange. *EMBO J.* **11**, 97-105.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* **65**, 499-560.
- McKnight, G. S. & Palmiter, R. (1979). Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* **254**, 9050-9058.
- Melton, D. A. (1991). Pattern formation during animal development. *Science* **252**, 234-241.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M. R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7035-7056.
- Metz, R. & Ziff, E. (1991). The helix-loop-helix protein rE12 and the C/EBP-related factor rNFIL-6 bind to neighboring sites within the *c-fos* serum response element. *Oncogene* **6**, 2165-2178.
- Mitchell, P. J. & Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA-binding proteins. *Science* **245**, 371-378.
- Mohun, T. J., Garrett, N. & Treisman, R. (1987). *Xenopus* cytoskeletal actin and human *c-fos* promoters share a conserved protein binding site. *EMBO J.* **6**, 667-673.
- Mordacq, J. C. & Linzer, D. I. H. (1989). Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes Dev.* **3**, 760-769.

- Mueller, P. R. & Wold, B. (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246**, 780-786.
- Müller, R. & Wagner, E. F. (1984). Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes. *Nature* **311**, 438-442.
- Nelson, D. H. (1962). Relative merits of the adreno-cortical steroids. *A. Rev. Med.* **13**, 241-248.
- Nicholson, R. C., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C. & Chambon, P. (1990). Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP-1 binding site. *EMBO J.* **9**, 4443-4454.
- Nishikura, K. & Murray, J. M. (1987). Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 639-649.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. & Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**, 989-1003.
- Offringa, R., Smits, A. M. M., Houweling, A., Bos, J. L. & van der Eb, A. J. (1988). Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucleic 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. & Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**, 527-538.
- Ogata, R. T. & Gilbert, W. (1978). An amino-terminal fragment of lac repressor binds specifically to lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5851-5854.
- Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B. & Riggs, A. D. (1989). Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* **246**, 810-813.
- Pfeifer, G. P., Tanguay, R. L., Steigerwald, S. D. & Riggs, A. D. (1990). In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes Dev.* **4**, 1277-1287.
- Piette, J. & Yaniv, M. (1987). Two different factors bind to the  $\alpha$ -domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the

- SV 40 and c-fos enhancers. *EMBO J.* **6**, 1331-1337.
- Pozzatti, R., Muschel, R., Williams, J., Padmanabhan, R., Howard, B., Liotta, L. & Khoury, G. (1986). Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. *Science* **232**, 223-227.
- Prywes, R. & Roeder, R. G. (1986). Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer. *Cell* **47**, 777-784.
- Prywes, R. & Roeder, R. G. (1987). Purification of the c-fos enhancer-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3482-3489.
- Prywes, R., Dutta, A., Cromlish, J. A. & Roeder, R. G. (1988). Phosphorylation of serum response factor, a factor that binds to the serum response element of the c-FOS enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7206-7210.
- Ptashne, M. (1988). How transcriptional activators work. *Nature* **335**, 683-689.
- Ptashne, M & Gann, A. F. (1990). Activators and targets. *Nature* **346**, 329-331.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. & Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670-674.
- Rahmsdorf, H. J. & Herrlich, P. (1990). Regulation of gene expression by tumor promoters. *Pharmac. Ther.* **48**, 157-188.
- Rattner, J. B. & Lin, C. C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell* **42**, 291-296.
- Rauscher, F. J., Voulalas, P. J., Franza, B. R. & Curran, T. (1988). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* **2**, 1687-1699.
- Renz, M., Neuberg, M., Kurz, C., Bravo, R. & Müller, R. (1985). Regulation of c-fos transcription in mouse fibroblasts: identification of DNase I-hypersensitive sites and regulatory upstream sequences. *EMBO J.* **4**, 3711-3716.
- Riabowol, K. T., Vosatka, R. J., Ziff, E. B., Lamb, N. J. & Feramisco, J. R. (1988). Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1670-1676.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, B. & Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7Å resolution. *Nature* **311**, 532-537.
- Rivera, V. M. & Greenberg, M. E. (1990). Growth factor-induced gene expression: the ups and downs of c-fos regulation. *The New Biologist* **2**, 751-758.
- Rivera, V. M., Sheng, M. & Greenberg, M. E. (1990). The inner core of the serum response element mediates both the rapid induction and repression of c-fos transcription following serum stimulation. *Genes Dev.* **4**, 255-268.

- Ruley, H. E. (1983). Adenovirus region E1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in cultures. *Nature* **304**, 602-606.
- Ruley, H. E., Moomaw, J. F. & Maruyama, K. (1984). In: Van de Woude (ed.), *Cancer Cells*, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rüther, U., Wagner, E. F. & Müller, R. (1985). Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **4**, 1775-1781.
- Ryseck, R.-P. & Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* **6**, 533-542.
- Saiki, K. R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C. & Verma, I. M. (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* **334**, 314-319.
- Schönthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. & Herrlich, P. (1988a). Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **53**, 779-787.
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. & Ponta, H. (1988b). 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. & Herrlich, P. (1989). The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of c-fos transcription. *Oncogene* **4**, 629-636.
- Schröter, H., Shaw, P. E. & Nordheim, A. (1987). Purification of intercalator-released p67, a polypeptide that interacts specifically with the c-fos serum response element. *Nucleic Acids Res.* **15**, 10145-10158.
- Schröter, H., Mueller, C. G. F., Meese, K. & Nordheim, A. (1990). Synergism in ternary complex formation between the dimeric glycoprotein p67<sup>SRF</sup>, polypeptide p62<sup>TCF</sup> and the c-fos serum response element. *EMBO J.* **9**, 1123-1130.
- Schüle, R. & Evans, R. M. (1991). Cross-coupling of signal transduction pathways: zinc finger meets leucine zipper. *Trends in Genetics* **7**, 377-381.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliwer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M. & Evans, R. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliwer, S., Ransone, L. J., Bolado, J.,

- Verma, I. M. & Evans, R. M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6092-6096.
- Scribner, J. D. & Slaga, T. J. (1973). Multiple effects of dexamethasone on protein synthesis and hyperplasia caused by a tumor promoter. *Cancer Res.* **33**, 542-546.
- Shaw, P. E., Frasch, S. & Nordheim, A. (1989a). Repression of c-fos transcription is mediated through p67/SRF bound to the SRE. *EMBO J.* **8**, 2567-2574.
- Shaw, P. E., Schröter, H. & Nordheim, A. (1989b). 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.
- Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G. & Greenberg, M. E. (1988). Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2787-2796.
- Siegfried, Z. & Ziff, E. B. (1989). Transcription activation by serum, PDGF, and TPA through the c-fos DSE: cell type specific requirements for induction. *Oncogene* **4**, 3-11.
- Smeal, T., Angel, P., Meek, J. & Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun : Jun and Jun : Fos complexes. *Genes Dev.* **3**, 2091-2100.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. & Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**, 494-496.
- Sommercorn, J., Mulligan, J. A., Lozeman, F. J. & Krebs, E. G. (1987). Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8834-8838.
- Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Pozzatti, R., Liotta, L. & Sobel, M. E. (1988). Altered expression of nm23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 E1a inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res.* **48**, 6550-6554.
- Stein, R. W. & Ziff, E. B. (1987). Repression of insulin gene expression by adenovirus type 5 E1a proteins. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1164-1170.
- Strickland, S. & Mahdavi, V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**, 393-403.
- Struhl, K. (1987). Synthesizing proteins in vitro by transcription and translation of cloned genes. In Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, New York. Unit 10.17.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4767-4771.



- Timmers, H. T. M., van Dam, H., Pronk, G. J., Bos, J. L. & van der Eb, A. J. (1989). Adenovirus E1A represses transcription of the cellular JE gene. *J. Virol.* **63**, 1470-1473.
- Touray, M., Ryan, F., Jaggi, R. & Martin, F. (1991). Characterisation of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. *Oncogene* **6**, 1227-1234.
- Treisman, R. (1985). Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell* **42**, 889-902.
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* **46**, 567-574.
- Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.* **6**, 2711-2717.
- Treisman, R. (1990). The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Seminars in Cancer Biology* **1**, 47-58.
- van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. & 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.
- Webster, K. A., Muscat, G. E. O. & Kedes, L. (1988). Adenovirus E1A products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific genes. *Nature* **332**, 553-557.
- White, T. J., Arnheim, N. & Erlich, H. A. (1989). The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* **5**, 185-189.
- Wilson, T. & Treisman, R. (1988). Fos C-terminal mutations block down-regulation of c-fos transcription following serum stimulation. *EMBO J.* **7**, 4193-4202.
- Wolffe, A. P. (1990). New approaches to chromatin function. *The New Biologist* **2**, 211-218.
- Yang-Yen, H.-F., Chiu, R. & Karin, M. (1990a). Elevation of AP-1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *The New Biologist* **2**, 351-361.
- Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. & Karin, M. (1990b). 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., Zhang, X.-K., Graupner, G., Tzukerman, M., Sakamoto, B., Karin, M. & Pfahl, M. (1991). Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: Implications for tumor promotion and inflammation. *The New Biologist* **3**, 1206-1219.
- Zhang, H., Scholl, R., Browse, J. & Somerville, C. (1988). Double strand DNA sequencing as a choice for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1220.

Zhang, X.-K., Wills, K. N., Husmann, M., Hermann, T. & Pfahl, M. (1991). Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with *jun* and *fos* oncogene activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6016-6025.