



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5566 B

**Mechanismen der
Transkriptionskontrolle
des Proto-Onkogens
*c-jun***

I. Herr
Institut für Genetik

Februar 1995

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5566 B

**Mechanismen der Transkriptionskontrolle
des Proto-Onkogens *c-jun***

Ingrid Herr
Institut für Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1995

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Die Expression des *c-jun* Proto-Onkogens bzw. die Synthese des cJun Proteins spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zell-Proliferation und Transformation, Differenzierung und der Antwort von Zellen auf genotoxische Substanzen. Die Transkription von *c-jun* wird sehr schnell und transient nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, dem Phorbol-ester TPA und UV-Bestrahlung induziert und danach sehr schnell wieder auf Basalwerte reprimiert. Dagegen tritt im Verlauf der Differenzierung oder Transformation eine konstitutiv erhöhte *c-jun* Expression auf. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der Transkriptionskontrolle des *c-jun* Gens aufgeklärt. Durch die Analyse von *c-jun* Promotor-Mutanten konnten zwei AP-1 ähnliche Bindungssequenzen, Jun 1 und Jun 2, identifiziert werden, die für die schnelle, transiente Induktion durch TPA und UV verantwortlich sind. Beide Bindungsstellen werden mit hoher Affinität von cJun/ATF-2 Komplexen erkannt. In undifferenzierten F9-Zellen, die kein cJun Protein synthetisieren, bindet ATF-2 als Homodimer, oder im Komplex mit einem bisher unbekanntem Faktor, und vermittelt dadurch die Induzierbarkeit des *c-jun* Promotors durch UV oder während der Differenzierung. Die Faktoren CTF, NF-Jun und FP kooperieren mit cJun/ATF-2 (bzw. ATF-2 Homodimeren) und tragen zur maximalen basalen, sowie induzierten Aktivität bei, können jedoch selbst keine Induzierbarkeit vermitteln. Sp1 dagegen hat einen negativen Effekt auf die Induktion des *c-jun* Promotors durch TPA und UV-Licht. Jun 1 und Jun 2 sind auch für die Aktivierung von *c-jun* durch das E1A Protein des Adenovirus, sowie während der Differenzierung wichtig. *In vivo* sind alle identifizierten Protein-Bindungsstellen, einschließlich Jun 1 und Jun 2, schon in nicht-stimulierten Zellen, vollständig besetzt. Während der Phasen der transkriptionellen Aktivierung und nachfolgender Repression ändert sich das Muster der Proteinbindung nicht. Dies läßt darauf schließen, daß der *c-jun* Promotor von einem "semi-aktiven" Zustand sehr schnell durch post-translationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) von Promotor-assoziierten cJun und ATF-2 Proteinen maximale Aktivität erreicht. Eine permanente Aktivierung von DNA-gebundenem cJun/ATF-2 ist als Ursache der konstitutiven Expression von *c-jun* in Adenovirus-transformierten Zellen anzusehen. Der Mechanismus der Transkriptionskontrolle des *c-jun* Gens ähnelt der Situation am Promotor des *c-fos* Proto-Onkogens. Daher könnte die phosphorylierungsabhängige Aktivitätskontrolle von Promotor-assoziierten Transkriptionsfaktoren ein generelles Prinzip für die schnelle und transiente Regulation von "immediate-early" Genen sein.

Transcriptional control of the proto-oncogene *c-jun*

Summary

Expression of the *c-jun* proto-oncogene e.g. the synthesis of the cJun protein plays a crucial role during regulation of cell proliferation, transformation, differentiation and the cellular response to genotoxic agents. Transcription of *c-jun* is rapidly and transiently induced by treatment of cells with growth factors, the phorbol-ester TPA and UV-irradiation. Subsequently promoter activity is quickly repressed to basal levels. In contrast, during the time-course of differentiation or transformation a constitutive enhanced expression of *c-jun* occurs. In the work presented the mechanism of transcriptional control of the *c-jun* gene was detected. By analysis of *c-jun* promoter-mutants two AP-1 like binding sites, Jun 1 and Jun 2 were identified of which both are responsible for the rapid and transient induction by TPA or UV. Jun 1 and Jun 2 are recognized with high affinity by protein complexes containing cJun/ATF-2. In undifferentiated F9 cells, which do not synthesize any cJun proteins, ATF-2 binds as a homodimer or in complex with a factor which has not been identified as yet and mediates by this way the inducibility of the *c-jun* promoter by UV or during differentiation. The factors CTF, NF-Jun and FP cooperate with cJun/ATF-2 (e.g. ATF-2 homodimers) and contribute to maximal and induced activity, but are not able to mediate inducibility by themselves, whereas Sp1 has a negative effect on *c-jun* promoter inducibility by TPA and UV-light. In addition Jun 1 and Jun 2 are also necessary for activation of *c-jun* by the E1A protein of adenovirus, as well as during differentiation. *In vivo* all identified protein-binding sites, including Jun 1 and Jun 2 are already fully occupied in non-stimulated cells. During the phases of transcriptional activation and subsequent repression the pattern of protein-binding is not changed. This leads to the suggestion that the *c-jun* promoter quickly reaches maximal activity from a "semi-active" status through post-translational modifications (for example phosphorylation) of promoter-associated cJun and ATF-2 proteins. A permanent activity of DNA-bound cJun/ATF-2 is the reason for the constitutive expression of *c-jun* in adenovirus-transformed cells. The mechanism of transcriptional control on the *c-jun* gene closely resembles the situation as described for the *c-fos* proto-oncogene. Therefore, it is suggested that the phosphorylation-dependent activity-control of promoter-associated transcription-factors is a general requirement for the rapid and transient regulation of "immediate-early" genes.

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinder-Serumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol-Transferase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cFos	zelluläres Fos
cJun	zelluläres Jun
cpm	counts per minute
CTAB	Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-Papier	Diethylaminoethyl-Papier
dI/dC	Desoxyinosin-5'-phosphat/Desoxycytidin-5'-phosphat
DMEM	Dulbeccos modified Eagle-Medium
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-Aminoethylether)-Tetraessigsäure
FCS	Foetales Kälberserum
FP	"Footprint"
g	Gramm
GBq	Gigabequerel
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Jun 1	proximale AP-1 Bindungsstelle des <i>c-jun</i> Promotors
Jun 2	distale AP-1 Bindungsstelle des <i>c-jun</i> Promotors
kd	Kilodalton
l	Liter
M	Molarität

N	Normalität
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NF-κB	Nuklearer Faktor-kappa B
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert, Ionenstärke
PIPES	Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rATP	ribo-Adenosin-5'-triphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarkoma Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRF	Serum Reponse Factor
TAD	Transaktivierungsdomäne
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit/Enzymeinheit
UV	Ultraviolette Strahlung
vFos	virales Fos
vJun	virales Jun
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abkürzungen

Einleitung	1
Material	10
Bezugsquellen.....	10
Allgemein verwendete Lösungen.....	12
Radiochemikalien.....	12
Enzyme.....	13
Zelllinien und Kulturbedingungen.....	13
Bakterien und Kulturbedingungen.....	13
Antikörper.....	14
Oligonukleotide.....	14
Plasmidkonstruktionen.....	16
Methoden	17
<i>I. Allgemeine Arbeitsmethoden</i>	17
Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	17
Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....	17
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	17
Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktions- endonukleasen.....	17
Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese.....	18
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	18
Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase.....	19
Hybridisieren von komplementärer Einzelstrang Oligo- nukleotid-DNA.....	20
Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-DNA mit Klenow-DNA-Polymerase.....	20
Präparation von Zellextrakten.....	21
Proteingehaltbestimmung mit der Biorad-Methode.....	22

<i>II. DNA-Klonierungstechniken</i>	22
Ligation von DNA-Fragmenten.....	22
Mutagenese mithilfe der Polymerasenkettenreaktion.....	22
Präparation kompetenter E.coli Bakterien.....	24
Transformation kompetenter Bakterien.....	24
Einfrieren von Bakterien.....	24
Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA.....	25
"Minipreps".....	25
<i>III. Zellkultur und Transfektionen</i>	26
A. Zellkultur.....	26
Ablösen von Zellen.....	26
Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	26
B. Transfektionen.....	26
<i>IV. Analytische Methoden</i>	27
Northern Blot.....	27
"Nuclear Run-On"-Analysen.....	29
RNase-Protektionsanalyse.....	31
"CAT-Assay".....	32
"Luciferase-Assay".....	33
Immunfluoreszenz.....	33
<i>In vivo</i> Dimethylsulfat-"Footprint"-Analyse.....	34
<i>In vitro</i> Dimethylsulfat-"Footprint"-Analyse.....	35
Gelretardations-Analyse.....	36
Methylierungs-Interferenz-Analyse.....	37
Ergebnisse	38
<i>I. Transkriptionelle Regulation des durch Phorbolester und UV-Licht induzierbaren Gens c-jun</i>	38
Die Funktionen von Jun 1, Jun 2, CTF, NF-Jun, Sp1 und FP bei der frühen Induktion des c-jun Promotors.....	39
<i>II. In vitro Bindungsstellen des c-jun Promotors</i>	39
<i>III. In vivo DNA-Protein-Interaktionen an Promotoren von frühen und späten Genen</i>	47
<i>IV. In vitro DNA-Protein-Interaktionen an Jun 1, Jun 2 und FP</i>	55

Die in vitro Proteinbindung an Oligonukleotide der AP-1 Sequenz von Kollagenase, t-Pa, Jun 1 und Jun 2.....	56
Komplex 1 ist spezifisch für Jun 1 und Jun 2; Komplex 2 bindet sowohl an Jun 1, als auch an die AP-1 Sequenz von Kollagenase und t-Pa.....	57
Die Protein-DNA Kontakte an Jun 1 und an der AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors sind <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> identisch.....	59
Komplex 1 ist stabiler als Komplex 2.....	63
Komplex 2 besteht vor allem aus Jun- und Fos-Proteinen, während Komplex 1 Jun- und ATF-2-Proteine enthält.....	66
Der Faktor FP bindet spezifisch und unabhängig von Jun 2 während der Induktion und nachgeschalteter Repression des <i>c-jun</i> Promotors.....	69
<i>V. Die in vivo Proteinbesetzung des c-jun Promotors ändert sich nicht nach Transformation von Zellen mit Adenovirus.....</i>	<i>74</i>
<i>VI. Die Besetzung von Jun 1 und Jun 2 unter zellulären Bedingungen, in denen cJun Protein fehlt.....</i>	<i>77</i>
<i>VII. Vor und nach der Differenzierung von F9- und HL60-Zellen ändert sich die in vivo Proteinbesetzung des c-jun Promotors nicht.....</i>	<i>78</i>
Diskussion.....	84
<i>I. Zwei AP-1 Bindungsstellen spielen die entscheidende Rolle in der Regulation des c-jun Promotors und werden von cJun/ATF-2 Heterodimeren erkannt.....</i>	<i>84</i>
<i>II. E1A wirkt reprimierend auf die Bindung von Jun/Jun oder Jun/Fos Dimere, während es die Transaktivierungs- aktivität von Jun/ATF-2 Heterodimeren verstärkt.....</i>	<i>86</i>
<i>III. FP, NF-Jun, Sp1, CTF und RSRF kooperieren mit Jun 1 und Jun 2, können jedoch selbst keine Induzierbarkeit vermitteln.....</i>	<i>88</i>
<i>IV. Der c-jun Promotor wird über einen putativen Multiprotein- komplex gesteuert, dessen Aktivität durch post- translationale Modifikationen verändert wird.....</i>	<i>90</i>

<i>V. UV-Licht und TPA aktivieren den c-jun Promotor über unterschiedliche Signalketten.....</i>	<i>93</i>
<i>VI. Die Regulation des c-jun Promotors in undifferenzierten F9-Zellen.....</i>	<i>95</i>
<i>VII. Die Regulation des c-jun Promotors während der Differenzierung.....</i>	<i>96</i>
<i>VIII. Die Repression des c-jun Promotors.....</i>	<i>97</i>
Literaturverzeichnis.....	101

Lebenslauf

Einleitung

Jede Zelle unseres Körpers enthält die genetische Information von ungefähr 100 000 Genen, deren Transkription von RNA-Polymerase II, TBP (TATA-Binding-Protein) und einer Reihe von Initiationsfaktoren, den sogenannten TAFs (TATA-Associated Factors) vermittelt wird (Roeder, 1991). Diese Enzyme werden jedoch nur aktiv, wenn Transkriptionsfaktoren ein Gen "aufrufen". Eine solche Induktion spezifischer Gene kann durch Substanzen wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Phorbol-ester und durch Bestrahlung mit UV-Licht ausgelöst werden (Angel und Karin, 1991; Herrlich und Ponta, 1989; Angel, 1994). Als Folge davon wird eine Signalkette von der Zytoplasmamembran bis in den Zellkern in Gang gesetzt, die dort Transkriptionsfaktoren, die an distale Kontrollelemente im Promotor ihrer Zielgene binden, aktiviert oder reprimiert.

Der Transkriptionsfaktor AP-1

Eine elementare Rolle bei der Regulation vieler Gene spielt der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein-1), der durch oben angeführte Faktoren (Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Phorbol-ester und Bestrahlung mit UV-Licht) in einen aktiven Zustand überführt wird. AP-1 vermittelt die Expression seiner Zielgene durch Bindung an die Konsensus-Sequenz 5'-TGA^G/CTCA-3', die häufig in der Promotorregion zellulärer und viraler Gene vorkommt. Unter diesen Genen sind besonders solche, die zu Wachstum und Zellteilung benötigt werden. Sie kodieren zum Beispiel für Metallothionein, Kollagenase, Stromelysin, Plasminogen-Aktivator, CD44, SV40 und Polyoma (Angel et al., 1987a + b, 1988; Schönthal et al., 1988a + b; Sassone-Corsi et al., 1988; Medcalf et al., 1990; Hofmann et al., 1993).

Jeder AP-1 Transkriptionsfaktor besteht aus zwei Untereinheiten, die aus einer Kombination der verschiedenen Mitglieder der Jun, Fos und ATF/CREB Proteinfamilien gebildet werden (Angel und Karin, 1991). Durch Mutationsanalysen wurden charakteristische Eigenschaften entdeckt, die zwischen diesen Proteinen konserviert sind und zu deren Einordnung in die "bZip" Proteinfamilie geführt hat (Landschulz et al., 1988). bZip steht für die Aminosäuresequenz zweier unabhängig voneinander wirkenden Einheiten der DNA-Bindedomäne. Die "basische Region", eine Folge von Aminosäuren mit starker positiver Ladung, ist für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung verantwortlich (Vogt und

für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung verantwortlich ist (Vogt und Bos, 1990). Die andere Einheit, der "Leuzin-Zipper", bezeichnet einen amphipatischen Helixbereich (bestehend aus ungefähr 35 Aminosäuren, von denen jede siebte Aminosäure ein Leuzin ist), der "coiled coil" Interaktionen eingeht (Landschulz et al., 1988). Durch sowohl hydrophobe als auch ionische Wechselwirkungen innerhalb dieser Region können die Proteine miteinander dimerisieren. Fos und Jun Proteine bilden stabile Heterodimere. Aufgrund der elektrostatischen Eigenschaften des Leuzin-Zippers können Fos Proteine keine Homodimere ausbilden. Im Gegensatz dazu können sowohl Jun, als auch CREB/ATF Proteine Homodimere bilden. cJun kann auch mit spezifischen Mitgliedern der CREB/ATF (ATF-2, ATF-a, CRE-BPa) Protein-Familie heterodimerisieren, während Fos keine effizienten CREB/ATF Heterodimere bildet (Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991; Nomura et al., 1993; Chatton et al., 1994). Da Protein-Dimerisierung Voraussetzung für die Bindung an die AP-1 Bindestelle ist, kann Fos, in Abwesenheit von Jun, nicht an DNA binden. Durch diese vielfältigen Möglichkeiten einer Dimerisierung der Mitglieder der AP-1 Familie ergeben sich mehr als 100 Kombinationsmöglichkeiten. Je nach Art der Dimere verändern sich die regulatorischen und die Bindungseigenschaften von AP-1, worauf später noch ausführlicher eingegangen wird.

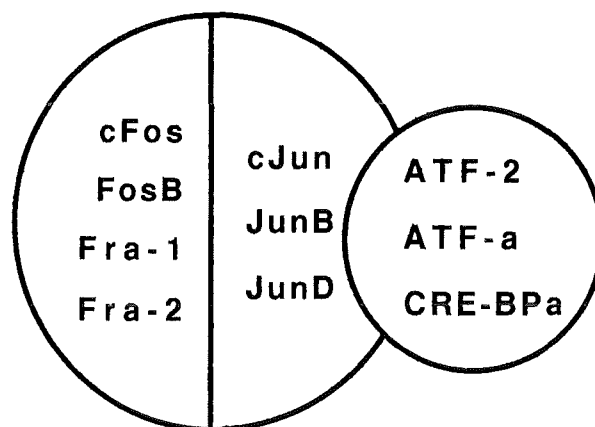


Abb. 1 Die verschiedenen Mitglieder des AP-1 Transkriptionsfaktors und Möglichkeiten der Dimerisierung. Die Mitglieder der Fos Familie (cFos, FosB, Fra-1, Fra-2) können nicht homodimerisieren, aber mit Proteinen der Jun Familie (cJun, JunB, JunD) heterodimerisieren. Im Gegensatz dazu können sowohl Jun, als auch CREB/ATF Proteine als Homodimere an DNA binden. Außerdem formen Jun mit CREB/ATF Proteinen Heterodimere, wie durch die überlappenden Kreise symbolisiert ist.

DNA Bindung alleine führt noch zu keiner Aktivierung des Gens. Vielmehr muß der N-Terminus von cJun und der C-Terminus von cFos, bzw. Domänen anderer AP-1 Untereinheiten mit dem basalen Transkriptionskomplex in Wechselwirkung treten (Angel et al., 1989; Gebel et al., unveröffentlicht). Voraussetzung für diese Wechselwirkung ist die posttranslationale Modifikation dieser Domänen.

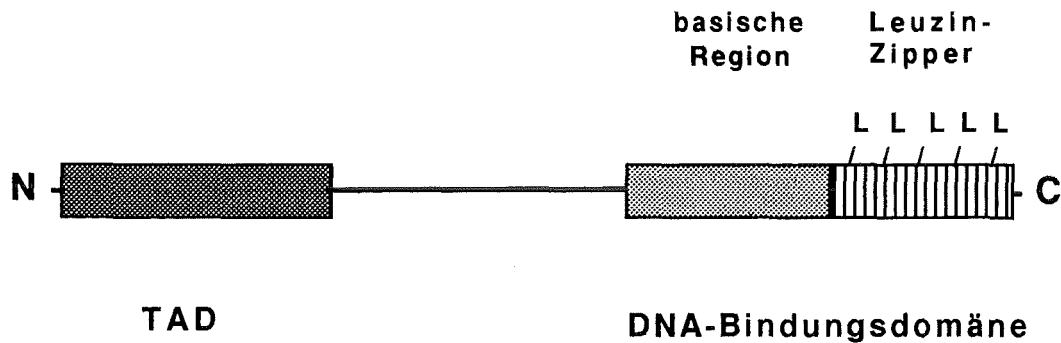


Abb. 2 Schematische Darstellung des cJun Proteins. N, amino-terminales Ende; C, carboxyterminales Ende; TAD, Transaktivierungsdomäne; L, Leuzin.

Mehrere Ketten der Signalübertragung, die von der Zellmembran bis in den Zellkern reichen, induzieren AP-1, das dadurch externe Stimuli sowohl in kurz-, als auch langzeitige Veränderungen der Gen-Expression umsetzt. Daher spielt AP-1 eine zentrale Rolle bei der Proliferation und der Differenzierung (Angel und Karin, 1991). Ein Beispiel sind embryonale F9-Teratokarzinoma oder HL60-Leukämie Zellen, bei denen im Verlauf der Differenzierung die Menge an *c-jun* Transkripten (bei HL60-Zellen auch an *c-fos* mRNA) kontinuierlich ansteigt, und dann konstitutiv erhöht bleibt (Müller et al., 1985; Yang-Yen, 1990; Sherman, 1990 und Abb. 26). Die bedeutende Funktion, die AP-1 in der Zelle innehat, wird bekräftigt durch transgene Mäuse, bei denen diese beiden Gene entweder ausgeschaltet oder überexprimiert wurden. Das Fehlen von *c-fos* resultiert in Störungen des Knochenwachstums (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992), da es zu keiner terminalen Differenzierung der Osteoclasten kommt (Grigoriadis et al., 1994). Transgene Mäuse, bei denen *c-fos* konstitutiv überexprimiert ist, weisen phänotypische Veränderungen in der Milz, dem Thymus und im Knochen auf (Rüther et al., 1987; 1988; 1989). Zu späteren Zeitpunkten bilden sich Knochentumoren aus, die durch eine mehrere hundertfach erhöhte Kollagenase I Expression (im Gegensatz zum normalen Knochengewebe in Wildtyp Mäusen) charakterisiert sind.

Zellen durch eine verstärkte Bindung des konstitutiv überexprimierten Fos Proteins an die AP-1 Bindestelle induziert werden. Ähnliche dramatische Auswirkungen hat eine Null-Mutation des *c-jun* Gens. Mäuseembryonen ohne funktionelles cJun Protein sterben am 12. Tag nach der Befruchtung infolge von Defiziten in der Entwicklung der foetalen Leber (Johnson et al., 1993; Hilberg et al., 1993). Anscheinend ist das *c-jun* Gen ab Tag 12 der murinen Embryonalentwicklung absolut lebensnotwendig, während es für die Proliferation und Differenzierung bis zur "Mid-Gestation" nicht unbedingt erforderlich zu sein scheint, oder durch andere Mitglieder der Jun Familie ersetzt werden kann. Ein cJun abhängiger Prozess scheint zur Überlebensfähigkeit von Zellen nach UV-Bestrahlung beizutragen, da Maus-Fibroblasten ohne funktionelles cJun Protein UV-Licht gegenüber viel sensitiver sind als normale Fibroblasten (Schreiber und Wagner, persönliche Mitteilung).

Wegen dieser wichtigen Funktion von Fos und Jun in der Zelle muß ihre Transkription und die DNA-Bindeaktivität, sowie die transaktivierende Funktion der Proteine sehr fein kontrolliert werden. Die Modulation der AP-1 Aktivität ist notwendig für eine flexible Gen-Regulation, die verschiedenen zellulären Stimuli angepaßt ist.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Regulation von cJun, da dieses zum einen durch Homodimerisierung direkt selbst Gene reguliert und zum zweiten als Dimerpartner für Fos und CREB/ATF Proteine fungiert. Darüberhinaus besitzt cJun, im Vergleich zu JunB oder JunD eine viel effizientere Transaktivierungsaktivität (Chiu et al., 1989; Hirai et al., 1989).

Die Regulation der cJun Aktivität

Die cJun Aktivität kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden: Auf der Transkriptionsebene, durch Dimerisierung mit Jun, Fos und CREB/ATF Proteinen, durch direkte oder indirekte Interaktionen von cJun mit anderen zellulären Proteinen (van Dam et al., 1990; Angel und Karin, 1991; Bengal et al., 1992; Jonat et al., 1990; de Groot et al., 1990). Schließlich wird die Funktion des cJun Proteins durch post-translationale Modifikation der DNA-Bindedomäne und der Transaktivierungsdomäne gesteuert (Angel und Karin, 1991; Binetruy et al., 1991; Radler-Pohl et al., 1993).

Die Regulation der Transkription von c-jun

Die Menge an *c-jun* Transkripten erhöht sich sehr schnell nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen (TNF α ,

Interleukin 1), Tumorpromotoren, UV-Licht und nach der Expression des E1A Proteins des Adenovirus (Angel und Karin, 1991; van Dam et al., 1990; Devary et al., 1991; van Dam et al., 1994). Die verstärkte Transkription des *c-jun* Gens kehrt danach innerhalb von zwei bis drei Stunden wieder auf Basalwerte zurück. Diese Induktion der Transkription ist auch möglich, wenn die Proteinneusynthese durch Hemmstoffe inhibiert ist (Ryseck et al., 1988; Mehta et al., 1989). (Eine Ausnahme bildet die Induktion des *c-jun* Gens, die durch das E1A-Protein des Adenovirus vermittelt wird, da zur Expression von E1A eine Proteinsynthese notwendig ist). Dies weist darauf hin, daß die Induktion von *c-jun* von Faktoren bewerkstelligt wird, die schon in der Zelle existieren. Durch Analyse von Deletionsmutanten des *c-jun* Promotors wurden bisher zwei AP-1 ähnliche Bindestellen (Jun 1: TGACATCA und Jun 2: TTACCCTCA) gefunden, die Funktionen bei der transkriptionellen Aktivierung des *c-jun* Promotors nach Behandlung von Zellen mit UV-Licht (Devary et al., 1991; Stein et al., 1992) und Phorbolestern (Angel et al., 1988; Stein et al., 1992), oder durch das E1A Protein des Adenovirus (van Dam et al., 1990) zu haben scheinen. Obwohl Jun 1 und Jun 2 im Vergleich zur AP-1 Konsensus Sequenz (TGAG/C TCA) eine zusätzliche Base in der Mitte der Kernsequenz haben, bestätigten *in vitro* DNA-Bindungs-Studien, daß die Jun 1 Sequenz von AP-1 gebunden wird. cJun Homodimere können an den eigenen Promotor binden und verursachen dadurch eine autokatalytische Aktivierung eines Minimalpromotor Konstruktes, das die Jun 1 Bindestelle enthält (Angel et al., 1988).

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren, die für die Veränderungen der *c-jun* Transkription verantwortlich sind, kann über deren DNA-Bindungsdomäne oder Transaktivierungsdomäne moduliert werden.

Die Regulation von cJun über die DNA-Bindung von AP-1

Für die Regulation von cJun über die DNA-Bindung von AP-1 sind Phosphorylierungen (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992), Redoxreaktionen (Abate et al., 1990; Oehler et al., 1993), Austausch des Dimerpartners (Hai und Curran, 1991) und die Interaktion mit anderen Proteinen (Auwerx und Sassone-Corsi, 1991) von Bedeutung.

In nicht-stimulierten Zellen sind innerhalb der DNA-Bindedomäne von cJun zwei Serine in den Positionen 243 und 249, sowie zwei Threonine in den Positionen 231 und 239 phosphoryliert (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren wird vermutlich von den Proteinkinasen GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) und CKII (Kaseinkinase II) vermittelt (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Die

Behandlung von Zellen mit TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) führt zu einer Dephosphorylierung dieser Aminosäuren und zu einer Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität (Boyle et al., 1991). Ein cJun Protein, bei dem diese vier Aminosäuren mutiert sind kann, im Vergleich zum Wildtyp Protein, ein Kollagenase Promotorkonstrukt viel effizienter aktivieren, obwohl die Transaktivierungsdomänen beider Proteine identisch sind (Hagmeyer et al., 1993). Dies deutet auf eine verstärkte Bindungsaktivität dieser cJun Mutante hin.

Neben Phosphorylierung wurde ein weiterer Mechanismus der Kontrolle der DNA Bindung von cJun identifiziert, der über die Oxidation des Cystein-Restes 269 in der DNA-Bindungsdomäne läuft (Abate et al., 1990; Oehler et al., 1993). Mutation dieses Cysteins, zusammen mit einer Mutation von Serin 243, bewirkt eine konstitutive und Redox-unabhängige Bindung (Oehler et al., 1993). Interessanterweise sind diese beiden Aminosäuren die einzigen Mutationen, die zwischen cJun und seinem viralen Gegenstück vJun in der DNA-Bindungsdomäne unterschiedlich sind. Dadurch könnte vJun beide negativ wirkenden Regulationsmechanismen der DNA Bindung umgehen und eine maximale Bindungsaktivität erreichen.

Die Aktivierung des *c-jun* Promotors könnte demnach über eine verstärkte Bindung von Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Dieser Regulationsmechanismus scheint beim Kollagenase Promotor zu existieren, da dessen Aktivierung über Neusynthese von Fos und Jun und eine verstärkte Bindung von AP-1 verläuft (König et al., 1992).

Die Aktivität von cJun könnte auch über die Zusammensetzung des bindenden AP-1 Komplexes reguliert werden, da die Transkription der verschiedenen Jun und Fos Gene nicht koordiniert reguliert wird, sondern abhängig vom extrazellulären Stimulus ist. Im Gegensatz zur *c-jun* und *junB* Transkription, die stark durch Stimulation der Zellen mit Serum oder TPA verstärkt werden kann, wird die Transkription von *junD* dadurch nur unwesentlich beeinflusst (Hirai et al., 1989). Gleichzeitig unterscheiden sich die Fos und Jun Proteine stark in ihren transaktivierenden Eigenschaften. cJun ist ein effizienter Aktivator seines eigenen und des Kollagenase-Promotors, während JunB und JunD nur schwach transaktivieren (Chiu et al., 1989; Hirai et al., 1989). Dagegen ist JunB, wie cJun, ein wirkungsvoller Aktivator von Promotoren, die multimere AP-1 Bindestellen enthalten (Chiu et al., 1989). Je nach Zusammensetzung der Untereinheiten der Homo- und Heterodimere verändern sich auch die DNA-Bindungseigenschaften. Die Heterodimere, die zwischen den verschiedenen Jun und Fos Proteinen

gebildet werden, haben im Vergleich zu Jun/Jun Homodimeren eine verstärkte Bindeaktivität. Jun/Fos Heterodimere binden bevorzugt an asymmetrische, 7-mer TREs, während Jun Homodimere die Bindung an eine symmetrische 8-mer CRE Sequenz bevorzugen (Nakabeppu und Nathans, 1989; Ryseck und Bravo, 1991). Der Austausch von Fos in einem Fos/Jun Heterodimer gegen ATF-2 verhindert die Bindung an ein TRE, erlaubt aber eine effiziente Bindung an ein CRE (Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991; van Dam et al., 1993). Die Sequenzspezifität wird außerdem von den flankierenden Nukleotiden des TRE oder CRE beeinflusst (Ryseck und Bravo, 1991). Abhängig vom stimulierenden Agens werden demnach unterschiedliche Fos und Jun Proteine synthetisiert, die die Gesamtaktivität von AP-1 bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von cJun zu regulieren, liegt in den Interaktionen von cJun mit anderen zellulären Proteinen. MyoD, ein muskelspezifischer Transkriptionsfaktor, hemmt die DNA-Bindung von Jun (Bengal et al., 1992). Der Glukocorticoid-Rezeptor interagiert über einen bis jetzt unbekanntes Mechanismus mit Jun. Es wird dadurch die Aktivität von Jun/Fos Heterodimeren gehemmt, ohne deren DNA-Bindungsaktivität zu verändern (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; König et al., 1992). Differenzierung von embryonalen Stammzellen, wie F9, durch Behandlung mit Retinsäure, führt zu einer transkriptionellen Aktivierung des *c-jun* Gens, die konstitutiv erhöht bleibt. Diese Aktivierung von *c-jun* scheint indirekt durch den Retinsäurerezeptor β (RAR β) vermittelt zu werden, der ebenfalls induziert wird, aber nicht an den *c-jun* Promotor bindet (de Groot et al., 1990; 1991). Das Adenovirus-Protein E1A beeinflusst die Expression und die Aktivität der AP-1 Transkriptionsfaktor Familie ebenfalls indirekt. E1A ist als ein essentieller Bestandteil in die Transformation der Zelle durch Adenoviren involviert und löst die konstitutive Erhöhung der Menge an *c-jun* Transkripten aus. Trotzdem ist die transaktivierende Funktion von AP-1 (Fos/Jun), das an den Kollagenase Promotor bindet, komplett inhibiert (van Dam et al., 1990).

Die Regulation der Transaktivierungsdomäne von cJun

Unabhängig von der Regulation der DNA-Bindung wird die Transaktivierungsfunktion von cJun durch Phosphorylierung reguliert. Dabei sind zwei Serine involviert, die sich an den Positionen 63 und 73 des menschlichen cJun-Proteins befinden (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991; Adler et al., 1992; Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Die Phosphorylierung dieser Serine kann durch TPA sowie durch UV-Licht induziert werden (Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al.,

1993). Außerdem tritt eine Stimulation der Phosphorylierung durch Expression verschiedener Onkogene, darunter Ha-Ras, Raf, Src (Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991; 1992) und durch Stimulation von Zellen mit EGF (Epidermal Growth Factor) und Interleukin-1 auf (Sachsenmeier et al., 1994).

Diese Phosphorylierung von cJun in der TAD wird sehr effizient nach Behandlung von Zellen mit UV-Licht ausgelöst. cJun und seine Dimerpartner scheinen essentielle Komponenten bei der Antwort der Zelle auf genotoxische Agentien und zellulären Stress zu sein. UV-Licht induziert die Transkription des *c-jun* Gens (Devary et al., 1991; Stein et al., 1992) und ein cJun-abhängiger Prozess trägt zur Überlebensfähigkeit von Zellen nach UV-Bestrahlung bei (Schreiber und Wagner, persönliche Mitteilung). Die Auswirkungen von UV-Licht auf die Zelle sind unterschiedlich, da je nach Dosis Mutationen entstehen, die die Transformation der Zelle verursachen können oder zum Absterben der Zelle führen. Dies geschieht durch Schäden an der DNA, wo UV-Licht die Bildung von Thymin-Dimeren oder anderer Photoprodukte auslöst. Neueste Ergebnisse deuten auf eine direkte Wirkung von UV-Licht auf die Plasmamembran und darin enthaltene Rezeptoren hin, deren Phosphorylierung eine Signal-Kaskade bis in den Zellkern verursacht. Negativ-dominante Mutanten der zytoplasmatischen Proteine Src, Ras und Raf-1 reduzieren die UV-Antwort (Devary et al., 1992; Radler-Pohl, 1993) und scheinen daher als Komponenten dieses Signaltransduktionsweges notwendig zu sein. MAP-Kinase phosphoryliert cJun *in vitro* (Radler-Pohl et al., 1993). Kürzlich wurde eine Jun-Kinase gefunden, die zwischen Zellkern und Zytoplasma transloziert und cJun abhängig von der UV-induzierten Phosphorylierungskaskade *in vitro* in der TAD phosphoryliert (Hibi et al., 1993).

Die Aktivierung des cJun Proteins nach Phosphorylierung in der Transaktivierungsdomäne könnte durch einen direkten oder indirekten Kontakt (über Ko-Aktivatoren) der TAD mit dem basalen Transkriptionskomplex bewerkstelligt werden. Nach Phosphorylierung würde sich dieser Kontakt oder Einfluß verstärken. Kürzlich wurde das Protein p52/54 identifiziert, das mit der phosphorylierten Form von cJun interagiert und als Ko-Aktivator dienen könnte (Oehler et al., 1992).

Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *c-jun* Gens.

Als extrazelluläre Stimuli, die den *c-jun* Promotor regulieren, wurde die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht, sowie deren Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA gewählt. Beide Substanzen wurden verwendet, weil sie wichtige zelluläre Prozesse in Gang setzen, bei denen cJun unbedingt notwendig ist. Zum einen scheint cJun in die UV-Antwort der Zelle involviert zu sein und trägt zum Überleben bestrahlter Zellen bei. Zum anderen spielt cJun eine wichtige Rolle bei der Proliferation. Dieser physiologische Zustand kann auch durch TPA hervorgerufen werden, das die Proteinkinase C aktiviert und damit Wachstumsfaktoren imitiert. Gleichzeitig soll der Mechanismus der konstitutiven, transkriptionellen Aktivierung des *c-jun* Promotors während der Transformation der Zelle durch das E1A Protein des Adenovirus und während der Differenzierung von F9 und HL60 Zellen definiert werden. Die Untersuchung der Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *c-jun* Gens wirft folgende Fragen auf:

1. Existieren außer den beiden AP-1 Bindestellen (Jun 1 und Jun 2) noch andere regulatorische Sequenzen auf dem *c-jun* Promotor?
2. Welche Funktion haben regulatorische Sequenzen auf dem *c-jun* Promotor für dessen basale und induzierte Aktivität? Beeinflußt eine komplexe Chromatinstruktur, wie sie in der lebenden Zelle vorliegt, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor?
3. Wie setzt sich der spezifische AP-1 Komplex zusammen, der die *c-jun* Promotoraktivität reguliert und welche Faktoren binden an andere regulatorische Sequenzen?

Material

Bezugsquellen

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in pro analysi (p.A.) Qualität bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser (über ein Milli-Q Reinstwasser-System [Millipore] gereinigt) in sterilen Gefäßen angesetzt und bei geeigneter Temperatur gelagert.

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
BES	Sigma, München
BIORAD-Proteinassay	Biorad, München
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Casaminsäuren	Difco, Detroit
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Chloramphenicol	Sigma, München
Chloroform (p.A.)	Merck, Darmstadt
Chloroform (technisch)	Roth, Karlsruhe
CTAB	Sigma, München
DEAE-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMS	Fluka, Buchs
DMSO	Fluka, Buchs
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DTT	Boehringer, Mannheim

EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
FCS	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
F12-Medium	Gibco, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt
GeneClean	Dianova, Hamburg
Glasplättchen	Bender & Hobein, Karlsruhe
Glycergel	Dako, Hamburg
Glycylglycine	Sigma, München
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma, München
Guanidinhydrochlorid	Sigma, München
Guanidinthiocyanat	Fluka, Buchs
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hyperfilm XR®	Amersham, Braunschweig
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Luciferin	Promega, Heidelberg
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Membranfilter BT1+BT2	Schleicher & Schüll, Dassel
Methanol	Roth, Karlsruhe
NACS-Prepac-Säulen	BRL, Eggenstein
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Natriumsarcosyl	Geigy, Leverkusen
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Nonidet P-40	Sigma, München
para-Formaldehyd	Sigma, München
PEG	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piperidin	Fluka, Buchs
PIPES	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, München
poly dl/dC	Boehringer, Mannheim
Propanol	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
rATP	Pharmacia, Freiburg
RNase A	Sigma, München
RPMI (defizient)	Sigma, München
Salmon-Sperm DNA	Sigma, München
Saccharose	Serva, Heidelberg
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Biorad, München
TPA	Sigma, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Biorad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Whatman 3MM®	Bender und Hobein, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Zinkchlorid	Sigma, München

Allgemein verwendete Lösungen

20x SSC: 3M NaCl; 0,25M Na-Citrat.

100x Denhardts: 2%BSA; 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% Ficoll.

100% Pippi: 0,5M NaH₂P₀₄, 0,5M Na₂HP₀₄, 1,5% Na₄P₂O₇.

PBS: 123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH 7,3.

Radiochemikalien

D-threo-(dichloracetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (7,4MBq/ml, 2,11GBq/mmol), [α -³²P]dCTP, (370MBq/ml, 11000GBq/mmol), [α -³²P]CTP, (740MBq/ml, 30000GBq/mmol), [γ -³²P]ATP, (370MBq/ml, 500GBq/mmol), [α -³²P]UTP, (370MBq/ml, 15TBq/mmmol) wurden von

Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

Enzyme

Alle Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) und USB (Cleveland/Bad Homburg) bezogen. Taq-Polymerase wurde von Amersham-Buchler oder Pharmacia bezogen, Proteinase K von Merck.

Zelllinien und Kulturbedingungen

HeLa-Zellen (Menschliche Zervix-Karzinomzelllinie), wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), ergänzt mit 8% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert.

GM637 (SV40-transformierte, menschliche Haut-Fibroblasten), **293** (menschliche, embryonale Nierenzellen, die mit der Adenovirus 5-E1A Region transformiert wurden) und **NIH 3T3-Zellen** (embryonale Maus-Fibroblasten) wurden in DMEM/10% FCS bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert.

CRL1497 (primäre, diploide, menschliche Hautfibroblasten aus einer Hautbiopsie von einem gesunden, 1 Monat alten, weiblichen Donor; American Type Culture Collection) und **GM1604** (primäre, diploide, menschliche Lungenfibroblasten), wurden in DMEM/15% FCS bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert.

HL60 (menschliche, promyeloitische Leukämie-Zellen). Wachstum in "Roswell Park Memorial Institute" (RPMI) Medium 1640 mit 15% FCS, und 1mM L-Glutamin bei 37°C und 6% CO₂.

F9 (undifferenzierte Maus-Teratokarzinom-Zellen aus einem Testis-Teratokarzinom einer Maus des Stammes 129 [Bernstine et al., 1973]; erhalten von Dr. Peter Angel, IGEN, KfK Karlsruhe) wurden in einer 1:1 Mischung aus DMEM und F12-Medium, supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 170µM β-Mercaptoethanol bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert.

Bakterien und Kulturbedingungen

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der Stamm **E. coli K12 XL1 blue** verwendet. Die Kultur erfolgte in **TY-Medium** (1% -Trypton, 1% Hefeextrakt, 0,1% Casaminsäuren, 0,5% NaCl). Bei Bedarf wurde dieses Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt.

Für die Präparation kompetenter Zellen wurde **PSI-Medium** (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,4% MgSO₄; 10mM KCl, pH 7,7) verwendet.

Antikörper

Prä-Immuneserum: Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen.

Castor: Das Kaninchenserum gegen das 75kd trpE-vJun-Fusionsprotein (enthält das gesamte vJun) (Angel et al., 1988a). Wurde von Prof. Dr. Hans Jobst Rahmsdorf, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

Feelgood: Dieses Kaninchenserum gegen das 75kD trpE-vJun-Fusionsprotein wurde von Dr. Thomas Oehler zur Verfügung gestellt. "Castor" und "Feelgood" erkennen unterschiedliche Epitope in vJun (Oehler, unveröffentlicht).

Fos X: Das Kaninchenserum ist gegen ein in Bakterien exprimiertes β -Gal-Fos-Fusionsprotein (AS 52-252 des FBR-fos (van Beveren et al., 1983) und AS 275-316 des FBJ-fos (van Beveren et al., 1984) gerichtet und wurde von Prof. Dr. Hans Jobst Rahmsdorf, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

anti-ATF-2: ATF-2 (F2BR-1) ist ein monoklonaler Maus IgG-Antikörper gegen menschliches ATF-2 Protein (Firma Santa Cruz Biotechnology).

PEP 1: PEP1 ist ein polyklonaler IgG-Antikörper aus Kaninchen, der präferentiell das cJun Protein erkennt (Firma Dianova).

Ziege-anti-Kaninchen: polyklonaler, mit Rhodamin gekoppelter, Antikörper aus Ziegen, der IgG-Antikörper aus Kaninchen erkennt (Firma Dianova).

Oligonukleotide:

Primer für die PCR-Mutagenese:

NF-Jun-Mutante:

Primer b: 5'-AGGGTGGAGTCTAGATATTGACGGGCGGGC-3', (Jun 65)

Primer b': 5'-GCCCCGCCGTCAATATCTAGACTCCACCCT-3', (Jun 66)

FP-Mutante:

Primer b: 5'-TCATCCCGTGAGATCTAGAGGGCCAGAGAA-3', (Jun 67)

Primer b': 5'-TTCTCTGGGCCCTCTAGATCTCACGGGATGA-3', (Jun 68)

Primer a: 5'-GATTAAGTTGGGTAACGCCAGG-3', (CAT 2-P1)

Primer c: 5'-TTAGCTCCTGAAAATCTCGCCAAGCTC-3', (CAT-Primer)

Oligonukleotide für genomische "Footprint"-Analysen:

25mer Linker: 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3'

11mer Linker: 5'-GAATTCAGATC-3'

Menschliches und Maus c-jun-Gen:

kodierender Strang:

Primer 1: 5'-CTCGGGAATAGGTCTGGGCTC-3'

Primer 2: 5'-AGGTCGGGCTCGAGTTGTGAATAGAC-3'

Primer 3: 5'-TCGGGCTCGAGTTGTGAATAGACGATGGTCAG-3'

nicht-kodierender Strang:

Primer 1: 5'-GTAGGAGAAAGAAGGGCC-3'

Primer 2: 5'-GAGAAAGAAGGGCCCGACTGTA-3'

Primer 3: 5'-GAAAGAAGGGCCCGACTGTAGGAGGGC-3'

für das Maus *c-jun* Gen wurde folgender Primer 3 verwendet:

Primer 3 5'-GAAAGAAGGGCCCAACTGTAGGAGCGC-3'

Menschliches Kollagenase-Gen:

kodierender Strang:

Primer 1: 5'-TCCCAGCCTCTTGCTGCTCCAATAT-3'

Primer 2: 5'-GCTGCTCCAATATCCCAGCTAGGAA-3'

Primer 3: 5'-CTCCAATATCCCAGCTAGGAAGCTCCC-3'

nicht-kodierender Strang:

Primer 1: 5'-ACCACTGTTTACATGGCAGAGTGTG-3'

Primer 2: 5'-ATGGCAGAGTGTGTCTCCTTCGCAC-3'

Primer 3: 5'-CAGAGTGTGTCTCCTTCGCACACATCT-3'

Menschliches Gewebeplasminogen-Aktivator-Gen:

nicht-kodierender Strang:

Primer 1: 5'-GGGACATAGGACTCTAAAGGAAGATG-3'

Primer 2: 5'-GACTCTAAAGGAAGATGATTCTTAAGGTCCC-3'

Primer 3: 5'-GGAAGATGATTCTTAAGGTCCCATCCCCTCC-3'

Oligonukleotide für Gelretardations-Analysen:

<i>Jun 1</i>	5'-AGCTGGGGTGACATCATGGG-3' 5'-GATCCCCATGATGTCACCCC-3'
<i>Jun 2</i>	5'-AGCTAGCATTACCTCATCCC-3' 5'-GATCGGGATGAGGTAATGCT-3'
<i>Jun 2+FP</i>	5'-AGCATTACCTCA-3' 5'-GGCCCGCGGAGGCTCACGGGATGAGGTAATGCT-3'
<i>mFP/Jun 2</i>	5'-AGCTAGCATTACCTCATCCCGTAGCATGCCGCG-3' 5'-GGCCCGCGGCATGCTACGGGATGAGGTAATGCT-3'
<i>mJun 2/FP</i>	5'-AGCTAGCATTCAAAGGTCCCGTGAGCCTCCGCG-3' 5'-GGCCCGCGGAGGCTCACGGGACCTTTGAATGCT-3'
<i>Col-AP-1</i>	5'-AGCTAGCATGAGTCAGACAC-3' 5'-AGCTGTGTCTGACTCATGCT-3'

<i>tPa-AP-1</i>	5'-GATCTCAATGACATCACGGCT-3'
	5'-GATCAGCCGTGATGTCATTGA-3'
<i>mCol-AP-1</i>	5'-AGCTAAAGTGGTGACTCATCACTAT-3'
	5'-AGCTATAGTGATGAGTCACCACTTT-3'

Plasmidkonstruktionen

Die *c-jun* Promotorfragmente -132/+170WT, -132/+170 Δ AP-1 (Angel et al., 1988b), -132/+170 Δ CTF und -132/+170 Δ Sp1 (Angel, unveröffentlicht) wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme Stu I und Nde I aus dem Vektor pBLCAT3 ausgeschnitten. Die 0,2kb großen Fragmente wurden in den Vektor pBLCAT5 (ebenfalls mit den Restriktionsenzymen Stu I und Nde I geschnitten) umklontiert. Dieser Schritt war notwendig, da der Vektor pBLCAT3 außerhalb der *c-jun*-Promotor Sequenz ein Element enthält, das durch Phorbol ester induzierbar ist.

Die Jun-Promotormutanten pBLCAT5-283/+190 Δ FP und -283/+190 Δ NF-Jun wurden durch PCR-Mutagenese der Plasmide pBLCAT5 -283/+190WT und -195WT (Stein, unveröffentlicht) hergestellt (vergleiche "PCR-Mutagenese") - die entstandenen, mutierten Fragmente, die eine Größe von 0,5kb hatten, wurden dabei mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III und Bgl II in einen pBLCAT5-Vektor kloniert.

Aus dem *c-jun* Promotorkonstrukt pBLCAT5-203/+190 (van Dam, unveröffentlicht) wurde durch Restriktionsverdau ((Bgl II/Hind III) ein 0,2kb Fragment ausgeschnitten. Dieses wurde für ein *in vitro* Dimethylsulfat-"Footprint"-Experiment verwendet.

Methoden

I. Allgemeine Arbeitsmethoden

Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zu der nukleinsäurehaltigen, wässrigen Lösung wurde dasselbe Volumen Phenol gegeben und gut gemischt. Die entstandene Emulsion wurde zur Trennung der Phasen kurz zentrifugiert und die wässrige Oberphase abgenommen. Zu dieser wurde die gleiche Menge eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24 :1) gegeben, gemischt und nach Trennung der Phasen durch Abzentrifugieren die wässrige Oberphase zur weiteren Verwendung isoliert.

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 zugegeben. Die Präzipitation erfolgte für mindestens 30min bei -20°C oder für 5-15min bei -80°C. Das Präzipitat wurde anschließend bei 10.000rpm 10-20min lang abzentrifugiert, mit 80%igem Ethanol gewaschen, nochmals für 5min 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 von 1 bei 260nm entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA, 40µg/ml RNA oder 20µg/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 µg DNA wurden 2-3U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerinlösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 37°C für mindestens 2h.

Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

A. mittels Agarosegelen

erfolgte auf 1%igen Agarosegelen (mit 0,3µg/ml Ethidiumbromid) in 90mM Tris-base; 90mM Borsäure und 2,5mM EDTA, pH 8,3, in einer (Horizontal-) Gelelektrophoresekammer bei 35-45mA (50-100V). Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz über einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 254nm) sichtbar gemacht.

B. mittels denaturierenden Polyacrylamidgelen

6-20%ige denaturierende Polyacrylamidgele enthielten 8,3M Harnstoff und wurden aus einer Stammlösung bestehend aus 30% Acrylamid und 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid in 90mM Tris-base, 90mM Borsäure und 2,5mM EDTA, pH 8,3, hergestellt. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS, Endkonzentration 0,83Vol.-%) und N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED, Endkonzentration 0,05Vol.-%) zwischen zwei Glasplatten.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

A. mittels Elektroelution auf DEAE-Papier

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde durch Fluoreszenz über einem UV-Transilluminator (254nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell unterhalb des Fragmentes ein Spalt in die Agarose geschnitten. In diesen Spalt wurde ein Stückchen DEAE-Papier gesteckt und anschließend die Elektrophorese fortgesetzt, bis das Fragment vollständig an das DEAE-Papier gebunden war. Zur Elution des DNA-Fragmentes wurde das DEAE-Papierstückchen zerkleinert, in ein 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und in 1,5M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1mM EDTA für 20min bei 37°C inkubiert. Um die Flüssigkeit vom Papier zu trennen, wurde mit einer Injektionsnadel ein Loch in den Boden des Reaktionsgefäßes gestochen, das Gefäß in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt und kurz abzentrifugiert. Die Flüssigkeit mit dem DNA-Fragment in dem größeren Reaktionsgefäß wurde schließlich mit Ethanol präzipitiert.

B. mittels Elektroelution mit der Biotrap-Kammer

Nach Ausschneiden des DNA-Fragments aus dem Gel wurde dieses in einer Biotrap-Elutionskammer (Schleicher & Schüll) von der Agarose getrennt. In die Kammer wurden Membranfilter (BT1 und BT2) eingesetzt, so daß am Pluspol eine "Falle" für die Anreicherung der DNA-Moleküle entstand. Zur Durchführung der Elution wurde die Biotrap-Kammer in eine horizontale Elektrophoresekammer gestellt und

anschließend die Gelstückchen mit 90mM Tris-base; 90mM Borsäure und 2,5mM EDTA, pH 8,3 bedeckt. Ebenso wurde die Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer aufgefüllt, bis der Pegel mit demjenigen innerhalb der Elutionskammer übereinstimmte. Bei einer Spannung von 200V wurde dann die Elektroelution durchgeführt.

Die negativ geladenen DNA-Fragmente wanderten dabei unter dem Einfluß des elektrischen Feldes zur Anode, d.h., in die Falle des Elutionsgerätes. Nach 1,5h wurde die Stromrichtung für 20s umgepolt, um an der Membran haftende DNA-Moleküle abzulösen und danach die wässrige DNA-Lösung mit einer Plastikpipette abgezogen. Nach einer Phenol-Extraktion wurde das DNA-Eluat mit Ethanol gefällt.

C. Geneclean

Die Isolierung von DNA-Fragmenten durch "Geneclean" wurde mit Lösungen eines Kits der Firma Dianova durchgeführt. Das DNA-Fragment im Agarosegel wurde in 1/2 Volumen "TBE-Modifier" und 4,5 Volumen NaJ-Stammlösung aufgenommen und für 5min bei 45°C inkubiert, um die Agarose zu lösen. In diese Suspension wurden 5µl Glasmilch pipettiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die DNA an die feinen Glaskügelchen binden kann. Der Glasmilch/DNA-Komplex wurde durch kurzes Abzentrifugieren pelletiert und der Überstand verworfen. Um Reste der verflüssigten Agarose und des TBE-Puffers zu entfernen, wurde 3 x mit je 400µl "New Wash" gewaschen und das Eppendorfgefäß kurz getrocknet. Die DNA wurde in 30µl Wasser durch 5-minütige Inkubation bei 45°C von den Glaskügelchen eluiert.

Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase

Zur radioaktiven Markierung von Primer für *in vivo* "Footprint"-Analysen wurden 20pmol einzelsträngige Oligonukleotid-DNA mit 12µl [γ -³²P]ATP und 20U T4-Polynukleotidkinase in 30µl 50mM Tris-HCl, pH 7,6; 10mM MgCl₂; 5mM DTT; 0,1mM Spermidin und 0,1mM EDTA für 1h bei 37°C inkubiert. Das markierte Oligonukleotid wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 10µg Hefe- oder E. coli-tRNA mit Ethanol präzipitiert.

Zur Einzelstrangmarkierung von Oligonukleotid-DNA für "Methylation Interference"-Experimente wurden 2,5 pmol DNA mit 3µl [γ -³²P]ATP und 10U T4-Polynukleotidkinase in 20µl 50mM Tris-HCl, pH 7,6; 10mM MgCl₂; 5mM DTT; 0,1mM Spermidin und 0,1mM EDTA, pH 8,0 für 1h bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung von nicht-eingebauten Nukleotiden erfolgte über eine Nacs-Prepac-Säule. Dabei wurde die Säule mit 1ml 1M NaCl; 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0 gewaschen und

zweimal mit 1ml 0,1M NaCl; 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0 äquillibriert. Die radioaktiv markierte Probe wurde, nachdem ihr 380µl 0,1M NaCl; 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0 zugegeben worden waren, auf die Säule geladen, mit 2ml 0,1M NaCl; 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0 nachgespült. Anschließend wurde die radioaktiv markierte DNA mit 4 x 100µl 1M NaCl; 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0 eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und in Anwesenheit von 10µg tRNA präzipitiert. Nach dem Waschen und Trocknen wurde die Probe in 100µl Wasser aufgenommen, was einer Endkonzentration von 25fmol/µl entspricht.

Hybridisieren von komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotid-DNA

Zum Hybridisieren komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotide für Gelretardations-Experimente wurden je 250pmol Einzelstrang-DNA in 40µl 60mM KCl; 12% Glycerol; 12mM Hepes; 5mM MgCl₂; 4mM Tris-HCL, pH 7,9 aufgenommen. Das Eppendorfgefäß mit der Probe wurde in ein 1l Becherglas mit 95°C heißem Wasser gegeben und über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Die Linker-Oligonukleotid-DNA für *in vivo* "Footprint"-Experimente wurde durch Hybridisierung der 25mer und 11mer großen Linkereinzelstränge erhalten. Dazu wurden beide Oligonukleotide in einer Konzentration von je 20pmol/µl in 250mM Tris-HCL, pH 7,7 zusammengegeben und für 5min auf 95°C erhitzt. Das Eppendorfgefäß mit dieser Reaktionslösung wurde danach in ein Becherglas mit 500ml Wasser gebracht und langsam auf 4°C abkühlen lassen. Hybridisierte Oligonukleotid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-DNA mit Klenow-DNA-Polymerase

Diese Art der Markierung wurde für Oligonukleotid-DNA verwendet, die in Gelretardations-Experimenten eingesetzt wurde. Zu 1µl (= 2,5pmol) doppelsträngiger Oligonukleotid-DNA mit überhängenden Enden wurden 2µl 700mM Tris-HCL, pH 7,5; 70mM MgCl₂; 2µl 10mM DTT; 1µl 10mM dNTP-Mix ohne dCTP; 3µl [α -³²P]dCTP und 1µl Klenow DNA-Polymerase I gegeben, mit Wasser auf 20µl aufgefüllt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 380µl 0,1M NaCl; 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0 aufgefüllt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die markierte Oligonukleotid-DNA wurde wie beschrieben,

über eine NACS-Prepac-Säule von nicht inkorporierter Radioaktivität abgetrennt.

Präparation von Zellextrakten

A. Proteinextrakte aus Zellkernen (Dignam et al., 1983)

Von einer 15cm Gewebekulturschale wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Gummispatel in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden 5min bei 2°C und 1700rpm abzentrifugiert und das Volumen des Zellsedimentes bestimmt (PCV = Packed Cell Volume). Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 3PCV 10mM HEPES-KOH, pH 7,9; 1,5mM MgCl₂; 10mM KCl; 0,5mM DTT und 1mM PMSF resuspendiert, für 15min auf Eis inkubiert und in einem Dounce-Homogenisator durch 15 Stöße mit einem S-Kolben aufgebrochen. Die Zellkerne wurden dann durch 2-minütige Zentrifugation bei 12000rpm sedimentiert, in 1,5 PCV 20mM HEPES-KOH, pH 7,9; 25% Glycerol; 0,42M NaCl; 1,5mM MgCl₂; 0,2mM EDTA; 0,5mM DTT und 1mM PMSF resuspendiert und für 30min unter Schütteln extrahiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (10min, 10000rpm), und der Überstand entweder weiter angereichert oder sofort (portioniert) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zur Anreicherung wurde pro ml Überstand 0,33g fein zermörseres Ammoniumsulfat in kleinen Portionen, unter ständigem Rühren, zugegeben. Die Präzipitation erfolgte auf Eis für 2h. Das Präzipitat wurde für 30min bei 25000rpm abzentrifugiert und in 1/10 des ursprünglichen Extraktvolumens 20mM HEPES-KOH, pH 7,9; 20% Glycerol; 100mM KCl; 2mM MgCl₂; 0,2mM EDTA; 0,5mM DTT und 1mM PMSF aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen 500 Volumina 20mM HEPES-KOH, pH 7,9; 20% Glycerol; 100mM KCl; 2mM MgCl₂; 0,2mM EDTA; 0,5mM DTT und 1mM PMSF für 2-3h mit drei- bis viermaligem Pufferwechsel. Der dialysierte Extrakt wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 5min bei 12000rpm zentrifugiert und der Überstand portioniert in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

B. Gesamt-Zellextrakte

Die Zellen wurden wie in Punkt A beschrieben, gewaschen, abgeschabt und abzentrifugiert. Danach wurde 1PCV 600mM KCl, 20mM HEPES/KOH, pH 7,9; 0,2mM EDTA; 0,1mM PMSF, und 1mM DTT zugegeben und der Ansatz unter zeitweiligem Mischen 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer vom Gesamt-Zellextrakt durch Zentrifugation bei 50000rpm und 2°C für 20min getrennt. Der Überstand wurde mit 1PVC 40% Glycerin; 20mM HEPES/KOH, pH 7,9; 0,2mM EDTA; 0,1mM

PMSF, und 1mM DTT versehen und portioniert in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Proteingehaltsbestimmung mit der Biorad-Methode

1-5µl einer Proteinlösung wurden mit 200µl einer 1:5 mit Wasser verdünnten "Proteinassay"-Lösung der Firma Biorad gemischt und die Absorption bei 600nm in einem Spektrometer gemessen. Durch gleichzeitiges Messen bekannter Proteinmengen von BSA wurde eine Eichkurve erstellt, mit Hilfe derer die unbekannte Proteinmenge bestimmt wurde.

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; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1mM Spermidin; 0,1 mg/ml BSA und 1mM ATP für 12-24h bei 15°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden zum Teil direkt in geschmolzener "low melting"-Agarose miteinander ligiert; dabei betrug das Reaktionsvolumen das Doppelte des eingesetzten Agarose-Volumens.

Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Ho et al., 1989)

Jeweils 20ng DNA der Jun-Promotor pBLCAT5-Konstrukte -283/+190 und -195/+170, welche die Promotorregion des *c-jun* Gens enthalten, wurden als Matrize für die Polymerasekettenreaktion verwendet. Der Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 100µl und enthielt je 10ng Matrizen-DNA, 5U Taq-Polymerase, 0,2mM dNTPs, 10µl Taq-Polymerase-Puffer und zwei verschiedene Primer in einer Konzentration von je 2pmol. Die ersten beiden Reaktionen wurden mit Primer a und Primer b', sowie mit Primer c und Primer b durchgeführt. Für das distale DNA-Fragment wurde das Konstrukt -283/+190 und für das proximale Fragment das Konstrukt -195/-170 als Matrize verwendet. Da die Primer b und b' die gewünschte Mutation enthalten, entstanden zwei komplementäre Fragmente, die im Bereich der gesetzten Mutation überlappen (Abb. 3). Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus 1min Denaturierung bei 94°C,

1,5min Hybridisierung bei 50°C und 2,5min Kettenverlängerung bei 72°C. Dieser Zyklus wurde 40 mal wiederholt. Die relativ niedrige Hybridisierungstemperatur von 50°C wurde gewählt, um es den mu-

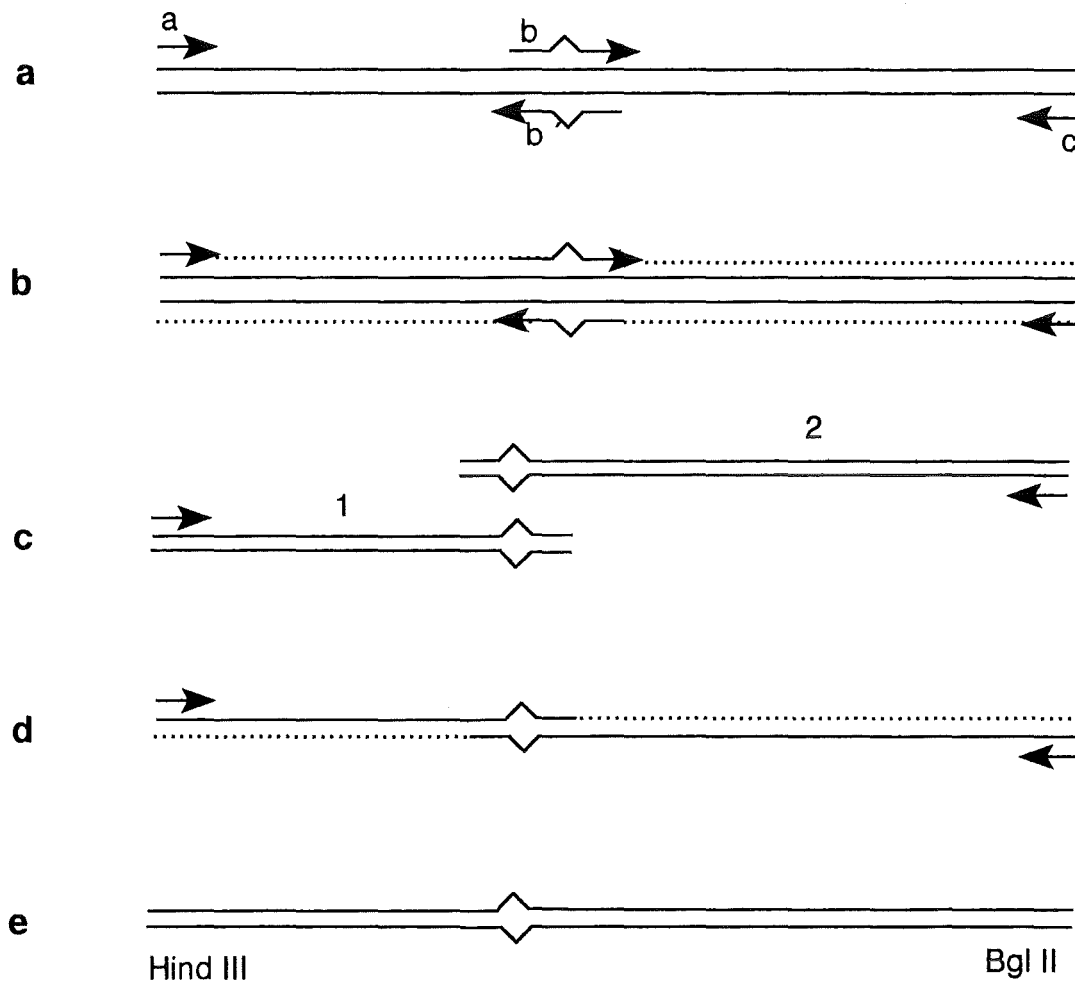


Abb. 3 Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. Schematische Darstellung der Mutagenese. Die Primer sind mit den Buchstaben a - c gekennzeichnet. Die Primer b und b' enthalten die Mutation. Die Pfeile geben die Richtung der Strangverlängerung an, die durch eine gepunktete Linie angedeutet ist. (a) Hybridisieren der Primer a und c, b und b' an das Template. (a) Strangverlängerung. (c) Nach Denaturieren und Annealen der DNA entstehen die dargestellten Produkte 1 und 2, die im Bereich der Mutation überlappen. (d) Nach erneutem Denaturieren und Annealen erfolgt die Strangverlängerung der DNA-Fragmente 1 und 2, die von Primer a und c ausgeht. (e) Das Endprodukt stellt ein Fragment dar, das die Mutation der Primer b und b' trägt. Dieses Fragment wurde an den Enden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bgl II verdaut und in einen entsprechend verdauten pBL CAT5 Vektor kloniert.

tierten Oligonukleotiden zu ermöglichen, an die Matrize zu hybridisieren. Die Produkte aus den Reaktionen wurden auf einem

1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Elektroelution isoliert. Die gereinigten Fragmente 1 und 2 wurden als Matrize für eine zweite Reaktion zusammengegeben und das gesamte Fragment mit den Primern a und c erneut unter denselben Bedingungen amplifiziert. Das Reaktionsprodukt wurde wiederum über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt, isoliert, einem Restriktionsverdau mit den Enzymen Bgl II und Hind III unterzogen und in den entsprechenden Vektor (hier pBLCAT5) kloniert.

Präparation kompetenter E.coli Bakterien (Hanahan, 1986)

Der Bakterienstamm E. coli XL1 blue wurde in TY-Medium auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C für 16h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6ml Kultur in PSI-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,28$ wachsen gelassen. Nach Zugabe von weiteren 100ml PSI-Medium wurde die Kultur bis zur $OD_{600} = 0,48$ inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Sedimentation der Bakterien bei 1500g für 10min, 4°C, wurden diese in 10ml einer 4°C kalten und sterilfiltrierten Lösung, bestehend aus 100mM RbCl₂; 50mM MnCl₂; 30mM KAc; 10mM CaCl₂, die mit 0,2M Essigsäure auf pH 7,8 eingestellt worden war, aufgenommen und für 3h auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien bei 1500g für 5min, 4°C zentrifugiert, in 10ml einer 4°C kalten Lösung aus 10mM MOPS, pH 7,0; 10mM RbCl₂; 75mM CaCl₂; 15% Glycerin resuspendiert und in 100µl Aliquots abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformation kompetenter Bakterien

50µl kompetente Bakterien wurden mit 250ng DNA vermischt und 20min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 37°C für 3min und Inkubation auf Eis für weitere 3min, wurden 450µl TY-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) zugegeben und die Kultur für 30min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz auf TY-Agarplatten, die Ampicillin (100µg/ml) enthielten, ausgestrichen und übernacht bei 37°C inkubiert.

Einfrieren von Bakterien

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

Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA

200ml einer Bakterien-Übernachtskultur (37°C, in TY-Kulturmedium mit 100µg/ml Ampicillin) wurden bei 4°C und 4000rpm für 10min abzentrifugiert und in 5ml 50mM Tris-HCL, pH 8,0; 25% Saccharose resuspendiert, in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5ml 50mM Tris-HCL, pH 8,0; 100mM EDTA, pH 8,0; 0,1% Triton X-100 versetzt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur und weiteren 10min bei 70°C (Lyse der Bakterien), wurden die Zelltrümmer durch 60-minütige Zentrifugation bei 32000rpm und 4°C von der Plasmid-DNA getrennt. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 10ml 20% PEG; 1M NaCl in 10mM Tris-HCL, pH 8,0; 0,1mM EDTA und 90min Inkubation bei Raumtemperatur präzipitiert und durch Zentrifugation bei 3000g sedimentiert. Das DNA-Präzipitat wurde 30min bei 37°C in 3ml 10mM Tris-HCL, pH 8,0; 0,1mM EDTA gelöst. Zur DNA-Lösung wurden 4,2g Cäsiumchlorid und 250µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) gegeben. Diese Lösung wurde in einem Vertikalrotor (Beckmann, VTI 65) für 16h bei 55000rpm zentrifugiert. Während der Zentrifugation bildet sich ein Dichtegradient, in dem sich die Plasmid-DNA von der RNA und der restlichen genomischen und zerstückelten Plasmid-DNA trennt. Die Plasmid-DNA wurde mit einer Spritze abgezogen und unter identischen Bedingungen für weitere 6h im Dichtegradienten zentrifugiert. Nach erneutem Abziehen der Plasmid-DNA wurde diese zur Entfernung des Ethidiumbromids mehrmals mit Wasser-gesättigtem Butanol extrahiert, bis die Lösung entfärbt war. Die DNA wurde mit 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 10000rpm für 10min und 4°C wurde das DNA-Präzipitat mit 10ml 80%igem Ethanol gewaschen und nachfolgend die DNA im Vakuumexsikkator getrocknet.

"Minipreps" (Del Sal und Schneider, 1987)

1,5ml einer Bakterien-Übernachtskultur (37°C, in TY-Kulturmedium mit 100µg/ml Ampicillin) wurden 5min bei 4000rpm abzentrifugiert, in 200µl 8% Saccharose; 0,1% Triton X-100; 50mM EDTA; 50mM Tris-HCL, pH 8,0 resuspendiert und nach Zugabe von 20µl Lysozym (10mg/ml) 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45s Kochen im Wasserbad wurde 10min bei 13000rpm zentrifugiert, um die Bakterientrümmer von der Plasmid-DNA-Lösung zu trennen. Die Bakterientrümmer wurden mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 8µl 5% CTAB in 0,5M NaCl versetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach Zentrifugation für 10min bei 13000rpm wurde die DNA in 300µl 1,2M NaCl gelöst und mit 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert. Nach pelletieren, waschen mit

80%igem Ethanol und trocknen wurde die DNA in 50µl 10mM Tris-HCL, pH 8,0 und 1mM EDTA, pH 8,0, aufgenommen.

III. Zellkultur und Transfektionen

A. Zellkultur

Ablösen von Zellen

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 37°C warmem PBS gespült und mit 0,25% oder 0,05% Trypsin (2ml pro 15cm Gewebekulturschale) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5ml Kulturmedium aufgenommen. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen durch Zentrifugation (3min, 1700rpm) vom trypsinhaltigen Medium befreit und in neuem Kulturmedium aufgenommen.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden von der Kulturschale abgelöst, abzentrifugiert und in Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO (ca. 1ml pro 5×10^6 Zellen) aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst 30min auf Eis inkubiert, danach in einem Styropor-Behälter für 3h auf -20°C abgekühlt, dann im Styropor-Behälter übernacht bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

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

B. Transfektionen

Alle Transfektionen wurden mit der Calciumphosphat-Ko-Präzipitationsmethode (Graham und van der Eb 1973, modifiziert nach Okayama-Chen, 1987) durchgeführt. Es wurden 10µg DNA pro 15cm Gewebekulturschale GM637-Zellen eingesetzt. Die Präzipitatbildung wurde in einem Volumen von 2ml durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung zunächst in 900µl H₂O aufgenommen, mit 100µl 2,5M CaCl₂-Lösung versetzt und gut gemischt. Diese Lösung wurde tropfenweise und unter leichtem Schütteln in 1ml 2 x BBS-Puffer (50mM BES; 280mM NaCl; 1,5mM Na₂HPO₄; mit 1M NaOH auf einen pH von 6,95 bei RT eingestellt) gegeben und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wurde in die Gewebekulturschale gegeben und für 12-15h auf

den Zellen belassen. Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums einmal mit PBS gewaschen und für 24h mit serumfreiem DMEM inkubiert.

IV. Analytische Methoden

Northern Blot (Denhardt, 1966)

A. Präparation von Gesamtzell-RNA durch die "Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol/Chloroform-Extraktion" (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Die Zellen einer 15cm-Gewebekulturschale wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2ml 4M GiSCN; 25mM NaCitrat, pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl; 0,1M Mercaptoethanol lysiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst und mit Hilfe einer Injektionsspritze in ein steriles 12ml Plastik-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200µl 2M Ammoniumacetat, pH 4,0 wurde mit wassergesättigtem Phenol ausgeschüttelt, 400µl Chloroform/Isoamylalkohol 49:1 zugegeben, nochmals ausgeschüttelt und das Gemisch für 10min bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10min bei 10000rpm wurde die Oberphase abgezogen und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol für 1h bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde erneut für 10min bei 10000rpm zentrifugiert und das Präzipitat getrocknet. Zur Entfernung noch vorhandener DNA-Reste wurde das Pellet erneut in 700µl 4M GiSCN; 25mM NaCitrat, pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl; 0,1M Mercaptoethanol aufgenommen und mit 70µl 2M Ammoniumacetat und 700µl Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das RNA-Pellet getrocknet, in 100µl Wasser gelöst, für 5min auf 70°C erhitzt und die Konzentration der RNA bestimmt.

B. Auftrennung der RNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der RNA wurde ein 1,4%iges Agarosegel in 10mM Na₂HPO₄, pH 6,9 in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Elektrophorese erfolgte 2-3 Stunden bei 75V und Raumtemperatur. Während der Elektrophorese wurde der Laufpuffer mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe rezirkuliert (vom + zum - Pol).

Die Proben wurden folgendermaßen aufbereitet: 20µg RNA in 4µl Wasser wurden mit 7,2µl 10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,85; 50% DMSO; 30% deionisiertes Glyoxal versetzt. Die Proben wurden 5min bei 50°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1µl RNA-Ladepuffer (50% Glycerin; 10mM Na₂HPO₄; 0,4% Bromphenolblau) und 1µl

Ethidiumbromid (1mg/ml) wurden die Proben auf dem Agarosegel aufgetrennt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

C. Northern-Blot und Hybridisierung

In eine Plastikwanne wurde 20 x SSC (3M NaCl; 0,3M NaCitrat, pH 6,5) gefüllt. Auf einen Plastikständer in dieser Wanne wurde eine Glasplatte von der Größe des RNA-Gels gelegt und darüber drei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier, das mit 20 x SSC angefeuchtet wurde und nun links und rechts der Glasplatte in die SSC-Lösung eingetaucht war. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Danach wurde das Gel an allen Seiten mit Parafilm-Streifen umrandet, so daß das SSC nur durch das Gel gesaugt werden konnte. Auf das Gel wurde ein Hybond N⁺-Filter in Gelgröße luftblasenfrei gelegt. Darüber wurde ein 3MM-Filterpapier und ein Stapel Kleenex-Tücher, die mit einer Glasplatte beschwert wurden, gelegt. Der Transfer erfolgte übernacht. Der Filter wurde 3min mit 50mM NaOH fixiert, zweimal mit 2 x SSC neutralisiert, feucht in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt, oder nach der Neutralisierung direkt in die Vorhybridisierungslösung gegeben.

Vorhybridisierung:

Die Vorhybridisierung erfolgte in 20ml Hybridisierungslösung (6 x SSC; 1% BSA; 1% Ficoll; 1% PVP; 0,5% SDS), die 100µg/ml denaturierte ssDNA (Salmon Sperm DNA) enthielt. Durchgeführt wurde die Prähybridisierung in einem Plastikbeutel für 2-4h bei 65°C unter leichtem Schütteln.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung wurde in einem Plastikbeutel durchgeführt. Pro 100cm² Filterfläche wurden 10ml Hybridisierungslösung (6 x SSC; 1% BSA; 1% Ficoll; 1% PVP; 0,5% SDS) in den Plastikbeutel gegeben und 100-500ng radioaktiv markierte DNA (1-5 x 10⁷ cpm) zugesetzt. Die radioaktive Probe wurde vorher durch 5-minütiges Kochen bei 100°C denaturiert, dann sofort auf Eis gestellt. Nach Entfernen der Luftblasen wurde der Plastikbeutel zugeschweißt und bei 65°C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der Filter aus dem Plastikbeutel genommen und für je 30min in 200ml folgender Lösungen bei 65°C gewaschen: zweimal je 15min mit 2 x SSC, 0,1% SDS; einmal 30min mit 1 x SSC, 0,1% SDS; zweimal je 15min mit 0,5 x SSC, 0,1% SDS. Der noch feuchte Filter wurde wieder in einen Plastikbeutel eingeschweißt und ein Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert. Wenn der Filter mit einer weiteren Probe hybridisiert werden sollte, wurde die alte Probe durch Kochen des

Filters in 500ml 2 x SSC, 0,5% SDS für 30min entfernt und der Filter anschließend erneut vorhybridisiert.

"Nuclear Run-On"-Analysen (Greenberg und Ziff, 1984)

A. Präparation der Zellkerne

Die Zellen wurden in eiskaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Gummispatels in 5ml kaltem PBS abgeschabt. Danach wurden die Zellen bei 1700rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 1ml 10mM Tris-HCl, pH 7,4; 10mM NaCl; 3mM MgCl₂ und 0,5% NP40 resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne abzentrifugiert (5min, 1700rpm), in 2ml 10mM Tris-HCl, pH 7,4; 10mM NaCl; 3mM MgCl₂ und 0,5% NP40 gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Kerne wurden dann in 100µl 50mM Tris-HCl, pH 8,3; 40% Glycerol; 5mM MgCl₂ und 0,1mM EDTA resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

B. "Nuclear Run-On"-Reaktion

Die aufgetauten Kerne (100µl) wurden mit 100µl Reaktionspuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 5mM MgCl₂; 300mM KCl; je 0,5mM ATP; CTP; GTP und 100µCi [α -³²P]UTP gemischt und für 30min bei 30°C inkubiert.

C. Präparation der ³²P-markierten Transkripte (Groudine et al., 1981)

Die "Run-On"-Reaktionen wurden durch Zugabe von DNase I auf eine Endkonzentration von 20µg/ml gebracht und durch 5-minütige Inkubation bei 30°C gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden dann in 1ml 1% SDS; 5mM EDTA; 10mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 100µg Proteinase K für 30min bei 42°C inkubiert und anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol extrahiert. Nach Zugabe von 25µg HefetRNA wurden 250µl 10% TCA, 60mM Na₄P₂O₇ zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat auf Nitrozellulosefilterscheiben (Porengröße 0,45µm, Durchmesser 25mm) unter Verwendung einer Mehrfachfiltereinrichtung gesammelt und dreimal mit je 10ml eiskaltem 3% TCA, 30mM Na₄P₂O₇ gewaschen. Die Filterscheiben wurden danach in Scintillationsgefäße gegeben und in 0,9ml 20mM HEPES-KOH, pH 7,5; 5mM MgCl₂; 1mM CaCl₂ mit 25µg DNase I für 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA und SDS auf 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 15min bei 65°C inkubiert. Beide Flüssigkeiten wurden vereinigt und mit 25µg

Proteinase K/ml für 30min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA in Gegenwart von 0,1M NaCl mit Ethanol präzipitiert.

D. Immobilisierung von DNA-Fragmenten an Nitrozellulose

Die Immobilisierung der DNA-Fragmente an eine Nitrozellulosemembran (BA85 SB, Porengröße 0,45µm) erfolgte mittels einer "Slot-blot"-Apparatur der Firma Schleicher & Schüll (Minifold II SRC 072/0). Die Nitrocellulosemembran wurde dazu vorher mit 2 x SSC befeuchtet. Die DNA-Fragmente wurden zunächst in 0,5M NaOH für 20min bei Raumtemperatur denaturiert. Danach wurde (auf Eis) das 8-fache des NaOH-Volumens an eiskaltem Neutralisierungspuffer (1,5M NaCl; 1M Tris-HCl, pH 7,5) zugegeben, rasch gemischt und mit Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von $3 \times 10^{-5}\%$ gebracht. Pro "Slot" wurde 1µg DNA in einem Volumen von 200-300µl aufgetragen und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch die Apparatur gesaugt.

E. Vorhybridisieren der Filter:

Die Vorhybridisierung der Nitrozellulosemembran (63 x 228mm) erfolgte in 100ml 3 x SSC; 3 x Denhardt's Lösung; 3% PiPPi; 1% SDS; 10mM EDTA, pH 8,0 und 50µg/ml niedermolekularer denaturierter Lachssperma-DNA für 2h bei 65°C (im Schüttelwasserbad).

F. Hybridisierung der ³²P-markierten Transkripte:

Die radioaktiv markierten Transkripte wurden mit Ethanol präzipitiert, getrocknet, in 200µl 10mM Tris-HCL, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0 gelöst und jeweils ein Aliquot von 5µl im Scintillationsmeßgerät gemessen. Zur Hybridisierung wurde jeweils eine identische Menge Radioaktivität ($1-4 \times 10^6$ cpm) eingesetzt. Die Proben wurden mit 10mM Tris-HCL, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0 auf ein Volumen von 250µl gebracht und 5min bei 85°C denaturiert. Nach Abschrecken in Eiswasser wurde zu jeder Probe dasselbe Volumen 2 x Hybridisierungslösung (6 x SSC, 2 x Denhardt's; 6% PiPPi; 0,2% SDS; 20 mM EDTA; 20µg/ml niedermolekulare denaturierte Lachsspermien-DNA) gegeben, die Proben zu den einzelnen Nitrozellulosefiltern in kleine Plastikbeutel pipettiert und diese zugeschweißt. Die Hybridisierung erfolgte im Schüttelwasserbad bei 65°C für 36h.

G. Waschen der Filter:

Die Filter wurden zunächst 2h bei 64°C in 2 x SSC (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 2 x SSC 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.

H. Verwendete DNA-Fragmente:

c-fos (Maus): 3,6kb Bam HI-Fragment des Plasmids p48/3 (Rüther et al., 1985); *c-jun* (Mensch): 1,2kb Sma I/Hind III-Fragment des Plasmids phcJ-1 (Angel et al., 1988a); Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Ratte): 1,3kb Pst I-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985).

RNase-Protektionsanalyse

A. Präparation der ³²P-markierten RNA-Proben

Als Matrize für radioaktiv markierte antisense RNA wurde DNA des Plasmids SP6-tkCAT (Angel et al., 1987) mit dem Restriktionsenzym Eco RI linearisiert. Zur Synthese der Probe wurden 5µl lyophilisiertes [α -³²P]CTP in 6µl H₂O aufgenommen und 4µl 5 x SP6-Transkriptionspuffer (200mM Tris-HCl, pH 7,5; 30mM MgCl₂; 10mM Spermidin), 2µl 100mM DTT, 4µl rNTP-Lösung (2,5mM ATP; 2,5mM UTP; 2,5mM GTP), 1µl 250µMCTP, 1µl RNasin®, 1µl = 0,5µg Matrizen-DNA und 1µl SP6-Bakteriophagen-RNA-Polymerase (20U/µl, Promega) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 60min bei 40°C. Zur Entfernung der Matrizen-DNA wurden der Reaktion 5µl 500mM Tris-HCL, pH 7,5; 50mM MgCl₂, 24µl Wasser und 1µl RNase-freier DNase I zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10µg Hefe-tRNA, 150µl 4M Ammoniumacetat, pH 7,2 und 200µl Wasser zugesetzt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen, präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 40µl Wasser aufgenommen und 1µl davon im Scintillationsgerät gemessen.

B. Hybridisierung der radioaktiv markierten RNA-Proben mit Gesamtzell-RNA

20µg Gesamtzell-RNA wurden zur Entfernung von eventuell noch vorhandenen DNA-Spuren mit DNase I behandelt. Dazu wurden der RNA-Lösung 5µl 10 x DNase I-Puffer, 1µl DNase I und 1µl RNasin zugesetzt, der Ansatz mit Wasser auf ein Endvolumen von 50µl gebracht und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde mit Ethanol präzipitiert und das gewaschene Pellet getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 30µl Hybridisierungspuffer (80% Formamid, 20% 2M NaCl; 200mM PIPES, pH 6,4; 5mM EDTA) aufgenommen, der 5 x 10⁵cpm tk-CAT-Probe enthielt. Die Reaktionen wurden 5min bei 85°C

denaturiert und danach zur Hybridisierung der Proben übernacht bei 45°C inkubiert.

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

Zu jeder Hybridisierungsreaktion wurden 300µl RNase-Reaktionspuffer (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 300mM NaCl, 5mM EDTA), 2µg/ml RNase T1 und 1µl RNase A (10mg/ml) zugegeben und die Reaktionsansätze 30min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 3µl 20% SDS und 2,5µl 10mg/ml Proteinase K versetzt, 15min 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 getrocknete Pellet wurde in 4µl Formamid-Ladepuffer (80% deionisiertes Formamid, 1mM EDTA, pH 8,0, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) gelöst und auf einem 6%igem, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

"CAT-Assay"

Die transient transfizierten Zellen wurden 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Gummispatel in PBS abgeschabt und bei 3000rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde zum Zellpellet 100µl 0,25M Tris-HCL, pH 7,8 gegeben und dreimal schockgefroren, um die Zellen aufzubrechen. Die aufgebrochenen Zellen wurden 10min bei 13000rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellextrakt voneinander zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 5µl des Zellextrakts für die Proteinbestimmung verwendet. Für den CAT-Assay wurden von den verschiedenen Transfektionsansätzen konstante Mengen an Protein eingesetzt, die mit 0,25M Tris-HCL, pH 7,8 auf 78,75µl aufgefüllt wurden. Nach Zugabe von 1,25µl ¹⁴C-Chloramphenicol wurde die Reaktion mit 20µl 4mM Acetyl-Coenzym-A gestartet und nach 2h bei 37°C durch Zugabe von 1ml Ethylacetat gestoppt. Durch kurzes Mischen wurde das Chloramphenicol aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch 5min Zentrifugation bei 13000rpm wieder getrennt und die Ethylacetat-Phase abgenommen. Das Ethylacetat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet, das eingedampfte Chloramphenicol in 20µl Ethylacetat aufgenommen und durch kurzes Schütteln gelöst. Die Lösung wurde tropfenweise auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen und in eine Chromatographiekammer gestellt, die 150ml Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel enthielt. Nach 45min wurde die DC-Platte aus der Kammer genommen, getrocknet, ein Röntgenfilm aufgelegt (Hyperfilm MP[®], Amersham) und bei Raumtemperatur für 16h

exponiert. Nach Entwicklung des Films konnten durch die Signale auf dem Röntgenfilm die Positionen der verschiedenen Formen des Chloramphenicols auf den DC-Platten identifiziert werden. Das nicht-acetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am wenigsten. Die 1'-acetylierte, 3'-acetylierten und die 1',3'-diacetylierten Formen sind polarer und laufen deshalb schneller. Zur Auswertung wurden die acetylierten und nicht-acetylierten Formen aus der DC-Platte ausgeschnitten, in Szintillationsröhrchen gegeben und diese mit 5ml Emulsifier Safe® überschichtet. Die Messung der Menge an radioaktivem Chloramphenicol erfolgte für 1min in einem Szintillationszähler. Dadurch kann berechnet werden, wieviel Prozent des Chloramphenicols in seine acetylierten Formen umgesetzt wurde.

"Luciferase-Assay"

Die Präparation des Proteinextraktes erfolgte analog der Präparation zur Bestimmung der CAT-Aktivität. 40µl Proteinlösung wurden mit 350µl 25mM Glycylglycin, 15mM MgSO₄, 4mM EGTA, 1mM DTT, 2mM ATP vermischt. Dieser Reaktionsansatz wurde in ein Luminometer (Fa. Berthold) gestellt, das automatisch 100µl Luciferin (200µM Luciferin, 25mM Glycylglycin, 15mM MgSO₄, 4mM EGTA) in den Ansatz injizierte. Die pro Probe enthaltenen Units an Luciferase-Aktivität wurden automatisch berechnet und ausgedruckt.

Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf gelatinisierten Deckplättchen ("cover slips") kultiviert und nach Waschen mit PBS in einer 3%igen p-Formaldehyd-lösung (in PBS) für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden dann 3 x mit PBS gewaschen und in einer 1%igen Lösung Triton X-100 (in PBS) für 15min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Zellen mit dem Jun-spezifischen Antikörper Pep1, der 1:30 mit PBS/10% FCS verdünnt worden war, für 1h bei 37°C inkubiert, gut mit PBS gewaschen und mit einem Rhodamin-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, der ebenfalls 1:30 mit PBS/10% FCS verdünnt worden war, inkubiert. Die Deckplättchen wurden mit "Glycergel" auf einem Objektträger fixiert und die Zellen mit Hilfe eines Zeiss Diaplan Fluoreszenz Mikroskops analysiert. Für Photographien wurde ein Kodak Ektachrom P800/1600 Farb-revers Film benutzt.

***In vivo* Dimethylsulfat-"Footprint"-Analyse durch Ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion ("ligation mediated PCR", Mueller und Wold, 1989)**

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

Die Zellen (von zwei 15 cm Gewebekulturschalen pro Meßpunkt) wurden einmal mit 37°C warmen PBS gewaschen und für 2min mit 0,5% DMS in DMEM/10mM HEPES-KOH, pH 7,5 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 5ml 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 mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet.

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

100-200µg genomische DNA wurden in 200µl 50mM Na-Cacodylat; 1mM EDTA, pH 8,0 aufgenommen. Die Methylierung erfolgte durch Zugabe von 1µl DMS bei Raumtemperatur und wurde nach 30s mit 50µl 1,5M Na-Acetat, pH 7,0; 1M β-Mercaptoethanol beendet. Die DNA wurde mit 750µl eiskaltem Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Das Präzipitat wurde in 250µl 0,3M Na-Acetat, pH 7,0 aufgenommen, nochmals mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet.

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

Die getrocknete DNA wurde in 100µl 10% Piperidin gelöst und für 30min bei 90°C (in verschraubbaren Eppendorfgefäßen, da Piperidin bei hohen Temperaturen leicht flüchtig ist) inkubiert. Nach Abkühlen der Reaktionen auf Eis wurden 200µl 0,3M Na-Acetat, pH 7,0 zugegeben und die DNA mit 900µl Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde 2 x mit 80%igem Ethanol gewaschen.

D. Selektive Amplifikation und radioaktive Markierung von Piperidin-Spaltprodukten

Für die Erststrangsynthese wurden 3-15µg Piperidin-behandelte genomische DNA und 0,6pmol Primer 1 in 15µl 40mM Tris-HCl, pH 7,7 und 50mM NaCl für 3min bei 95°C denaturiert und danach zur Hybridisierung des Primers für 30min bei 45°C inkubiert. Danach wurden 8,8µl 20mM MgCl₂; 20mM DTT; je 200µM dATP; dCTP; dGTP; dTTP und 0,3µl Sequenase[®] Version 2,0 zugegeben, durch Pipettieren gemischt, und die Reaktionen weitere 15min bei 45°C inkubiert. Zur

Stabilisierung der DNA-Fragmente wurden 6µl 310mM Tris-HCl, pH 7,7 zugegeben und die Ansätze 15min bei 67°C inkubiert, um die Sequenase zu inaktivieren.

Für die Ligation des Linker-Oligonukleotids wurden die Proben auf Eis gestellt und 20µl 17,5mM MgCl₂; 42,3mM DTT; 125µg/ml BSA sowie 25µl 10mM MgCl₂; 20mM DTT; 3mM ATP; 50µg/ml BSA; 5µl hybridisiertes Linker-Oligonukleotid (=100pmol) und 1µl (=10U)T4-DNA-Ligase zugegeben und die Reaktionen bei 15°C für 3-15h inkubiert.

Nach der Ligation wurden die Reaktionen in Gegenwart von 10µg tRNA mit Ethanol präzipitiert und mit 80%igem Ethanol gewaschen. Für die PCR-Reaktionen wurden die getrockneten Präzipitate in 60µl H₂O gelöst. Zu der DNA-Lösung wurden 20µl 5 x Taq-Puffer (200mM NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 8,8; 25mM MgCl₂; 0,05% Gelatine), 5µl (=10pmol) Primer 2-Lösung, 5µl (=10pmol) einer Lösung des 25mer Linker-Oligonukleotids, 8µl eines dNTP-Mix (Konzentration jedes dNTPs 2,5mM) und 2µl Taq-DNA-Polymerase (=10U) zugegeben und gemischt. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus 1min Denaturierung bei 94°C, 2min Hybridisierung bei 63°C und 3min Kettenverlängerung bei 75°C. Dieser Zyklus wurde 20 x wiederholt. Die Proben wurden danach auf Eis abgekühlt und es wurden 2pmol ³²P-endmarkierter Primer 3 (2-5 x 10⁶cpm), 5U Taq-DNA-Polymerase und 2µl 2,5mM dNTP-Mix pro Reaktion zugegeben. Die Reaktionen wurden dann für 2min bei 95°C, 2min bei 66°C und 10min bei 75°C inkubiert und anschließend durch Abschrecken in Eiswasser gestoppt. Nach Zugabe von 295µl 260mM Na-Acetat; 10mM Tris-HCl, pH 7,5 und 4mM EDTA, pH 8,0 wurden die Reaktionen mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Die Proben wurden in 6µl Formamid-Ladepuffer (80% deionisiertes Formamid, 1mM EDTA, pH 8,0; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol) gelöst und 2,5µl davon auf einem 6%igem, denaturierenden Polyacrylamidgel (Maxam und Gilbert, 1980) aufgetrennt. Die Autoradiographie erfolgte für 2h bis eine Woche bei -80°C mit Verstärkerfolie.

***In vitro* Dimethylsulfat-"Footprint"-Analyse**

Proteinextrakt aus Zellkernen (Dignam et al., 1983) wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation auf 60µg/µl konzentriert. Das verwendete *c-jun* -Promotor Fragment wurde durch Restriktionsverdau (Bgl II/Hind III) aus dem Plasmid pBLCAT5-203/+190 ausgeschnitten und durch Auftrennung im Agarosegel isoliert. 20fmol des Fragments wurden mit 1mg Proteinextrakt, 1µg poly (dl-dC), 1µg BSA, 20mM HEPES-KOH, pH 7,9; 20% Glycerol; 100mM KCl; 2mM MgCl₂; 0,2mM EDTA,

pH 8,0 und 0,5mM DTT in einem Volumen von 100 μ l für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ g denaturierte Hering-Sperma-DNA und 100 μ l DMS-Lösung (1 μ l DMS, 50mM Na-Cacodylat, 1mM EDTA) zugegeben und nach Mischen für 30s bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l 400mM Na-Acetat, pH 7,0; 140mM β -Mercaptoethanol; 270 μ g/ml tRNA wurde die Reaktion gestoppt und die Nukleinsäuren anschließend mit 750 μ l Ethanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 400 μ l 10mM Tris-HCl, pH 7,7; 400mM NaCl; 2mM EDTA, pH 8,0 und 0,2% SDS aufgenommen und mit 300 μ g/ml Proteinase K für 1h bei 37°C verdaut. Der Reaktionsansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und erneut mit Ethanol gefällt. Die Piperidinspaltung der DNA wurde entsprechend der *in vivo* "Footprint"-Methode durchgeführt und die getrocknete DNA in 100 μ l Wasser aufgenommen. 9 μ l dieser Lösung wurden für die ligationsvermittelte PCR verwendet und die Spaltprodukte auf einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel (Maxam und Gilbert, 1980) aufgetrennt.

Gelretardations-Analyse

A. Analyse von Proteinextrakt aus Zellkernen.

Die DNA-Bindungsreaktionen wurden in einem Volumen von 20 μ l für 30min bei Raumtemperatur durchgeführt und enthielten 2-10 μ g Proteinextrakt, 20% Glycerol; 20mM HEPES/KOH, pH 7,9; 20mM KCl; 2mM MgCl₂; 2mM Spermidin; 2,5mM EDTA, pH 8,0; 1 μ g BSA; 1 μ g poly(dI-dC) und 25fmol radioaktiv markierte Oligonukleotid-DNA. Nach der Inkubation wurde das Gemisch über ein nicht-denaturierendes 5%iges Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE bei Raumtemperatur und einer Spannung von 100V aufgetrennt. Vor dem Probenauftrag wurde das Gel bei 100V für 1h vorlaufen gelassen. Die Gele wurden ohne Fixierung getrocknet und für mindestens 1h bei -80°C mit Verstärkerfolie exponiert.

B. Analyse von Proteinextrakt aus ganzen Zellen

2-10 μ g Proteinextrakt aus ganzen Zellen wurde in 5% Glycerol; 20mM HEPES/KOH, pH 7,9; 50mM KCl; 1mM EDTA, pH 8,0; 1mM DTT; 1 μ g BSA und 1 μ g poly(dI-dC) für 30min bei Raumtemperatur mit 25fmol radioaktiv markierter Oligonukleotid-DNA inkubiert. Die Auftrennung erfolgte wie unter Punkt A. beschrieben.

Wurden in der Gelretardations-Analyse Antikörper verwendet, so wurden diese mit Proteinextrakt aus Kernen oder ganzen Zellen 1h auf Eis vorinkubiert. Danach wurde das Experiment, wie in Punkt A oder B beschrieben, weitergeführt.

Methylierungs-Interferenz-Analyse

2,5pmol einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA wurden kinasiert und danach mit 2,5pmol des komplementären Einzelstranges hybridisiert. Diese "einseitig" markierten, doppelsträngigen Oligonukleotide wurden zusammen mit 10µg Hering-Sperma DNA in 200µl 50mM Na-Cacodylat; 1mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Die Methylierung erfolgte durch Zugabe von 1µl DMS für 1min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit 50µl 1,5mM Na-Acetat, pH 7,0; 1M β-Mercaptoethanol; 10µg tRNA beendet und die DNA mit 750µl Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet. Die nun methylierten Oligonukleotide wurden mit einem Überschuß an Proteinextrakt aus Kernen (25µg = 2µl) inkubiert und durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde nicht getrocknet, sondern mit Plastikfolie abgedeckt. Bei 4°C wurde ein Röntgenfilm exponiert, dessen Lage mit radioaktiver Tinte genau markiert wurde. Nach Exposition wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1%iges Agarosegel eingebettet. Die radioaktiven Oligonukleotide wurden über eine DEAE-Membran aus dem Gel eluiert, gefällt und nach dem Trocknen einer Piperidinspaltung unterzogen. Dazu wurde die getrocknete DNA in 200µl 10% Piperidinlösung in Wasser resuspendiert und für 30min bei 90°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden 200µl 0,3M Na-Acetat zugegeben und die DNA mit 900µl Ethanol gefällt, abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 4µl Sanger-Probenpuffer (98% Formamid; 20mM EDTA, pH 8,0; 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylencyanol) resuspendiert und jeweils gleiche Mengen an Radioaktivität des freien und proteingebundenen Oligonukleotids auf einem 20%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei -80°C wurde ein Röntgenfilm exponiert.

Ergebnisse

I. Transkriptionelle Regulation des durch Phorbolester und UV-Licht induzierbaren Gens c-jun

Nach Behandlung von Zellen mit TPA erhöht sich die Transkriptionsrate von *c-jun*-, *c-fos*-, Kollagenase- und Gewebefibrinolyse-Aktivator (t-Pa). Während jedoch die beiden "immediate early" Gene *c-jun* und *c-fos* sofort reagieren und schnell wieder Basalwerte erreichen, ist die Induktion von Kollagenase und t-Pa verzögert und bleibt längere Zeit bestehen (Angel, 1987b; König et al., 1989; König, 1991; 1992b; Medcalf et al., 1990 und Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Menge an Transkripten nach UV-Bestrahlung ebenfalls auf einer erhöhten Transkription beruht, wurde die Transkriptionsrate des *c-jun* und *c-fos* Gens durch "Nuclear Run-On" in HeLa-Zellen bestimmt. Zellkerne wurden entweder aus unbehandelten Zellen, oder 30 Minuten, drei und sechs Stunden nach UV-Bestrahlung von Zellen, geerntet. Die naszierenden Transkripte wurden *in vitro* in Gegenwart von radioaktiv markierten Nukleotiden verlängert. Die radioaktiv markierte Gesamt-RNA wurde mit spezifischen DNA-Sonden, die auf Filtern immobilisiert waren, hybridisiert, wobei die DNA im molaren Überschuß war.

Die mRNA-Synthese des *c-jun* Gens nach UV-Induktion erreicht relativ schnell, schon nach 30 Minuten Maximalwerte und ist vergleichbar der des *c-fos* Gens. Innerhalb kürzester Zeit wird die Neusynthese von *c-jun* und *c-fos* Transkripten gestoppt, sodaß nach drei Stunden wieder Basalwerte angezeigt werden. Dieser zeitliche Verlauf der UV-Induktion ist fast identisch mit der Induktionskinetik beider Gene nach Behandlung der Zellen mit TPA (König, 1991). Als interne Kontrolle wurde das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH) verwendet, das nicht durch UV induzierbar ist und dessen Transkriptionsrate vor und nach UV-Bestrahlung der Zellen gleich blieb (Abb. 4). Dadurch wurde sichergestellt, daß gleiche Mengen an radioaktiv markierten Transkripten bei der Hybridisierung eingesetzt wurden.

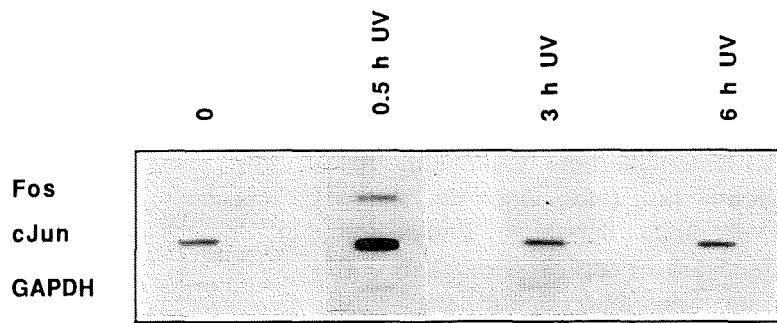


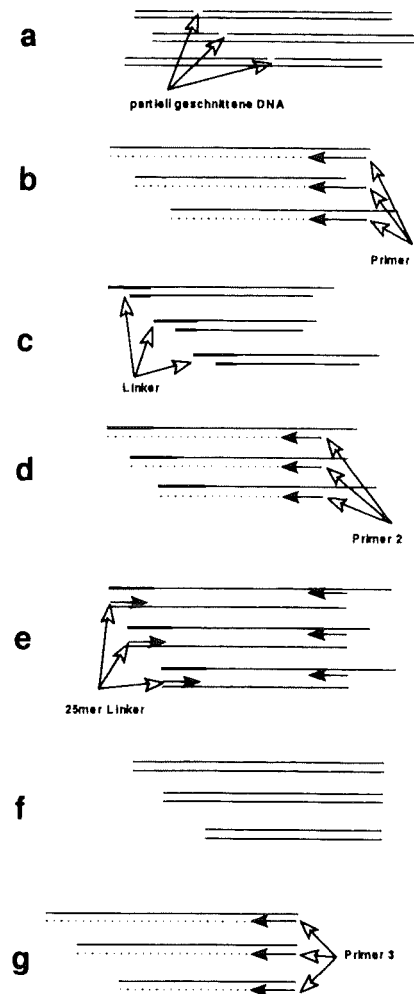
Abb. 4 Transkriptionelle Regulation von *c-jun* und *c-fos* durch UV-Licht. HeLa-Zellen wurden mit 30J/m² UV-Licht (254nm) bestrahlt. Nach 0,5, 3 und 6h wurden die Zellkerne präpariert. 0; Zellkerne aus unbehandelten Zellen. Die Transkriptionsrate von *c-fos*, *c-jun* und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurde durch eine "Nuclear Run-On"-Analyse bestimmt.

II. *In vitro* Bindungsstellen des *c-jun* Promotors

Um den Mechanismus der transkriptionellen Regulation zu verstehen, ist es notwendig, die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an den *c-jun* Promotor binden. Deshalb wurde eine *in vitro* Bindungsstudie in Form einer "Footprint"-Analyse durchgeführt.

Proteinextrakt aus Kernen unbehandelter HeLa-Zellen wurde mit einem Fragment des *c-jun* Promotors, das den Bereich -283 bis +190 umfaßt, inkubiert und anschließend mit partiell methylierenden Dosen von DMS als DNA-modifizierendem Agens (Maxam und Gilbert, 1980) behandelt. DMS methyliert vor allem 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"). Guanine (und zum Teil Adenine), die als Kontaktstelle für Proteine dienen, können entweder gar nicht, oder schwächer methyliert werden. Guanine, die in direkter Nachbarschaft zu einer Bindestelle liegen, werden manchmal besonders stark methyliert (Gilbert et al., 1976; Ogata und Gilbert, 1978). Die DNA kann dann an den Stellen modifizierter Basen durch Piperidin gespalten werden (Maxam und Gilbert, 1980 und Referenzen darin). Die Spaltprodukte wurden durch selektive Amplifikation mit Hilfe der ligationsvermittelten Polymerasekettenreaktion (LMPCR) (Mueller und Wold, 1989) detektiert (Abb. 5) und auf einem 6%igen Sanger-Sequenziergel aufgetrennt. Protektionen weisen auf nicht-methylierte Guanine innerhalb einer Bindestelle und Hypersensitivitäten auf besonders stark methylierte Guanine in der Nähe einer Bindestelle hin. Als Kontrolle wurde ein *c-jun* Promotor-

Abb. 5 Schematische Darstellung der "Footprint"-Technik durch ligationsvermittelte PCR (nach Mueller und Wold, 1989). Die DNA wird durch DMS-Behandlung partiell methyliert. Danach wird die DNA 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 und Gilbert, 1980). Im folgenden Schritt (b) wird ein Ende der Sequenzleiter durch Hybridisierung mit einem genspezifischen Oligonukleotid-Primer (Primer 1) festgelegt. Durch Verlängerung dieses Primers (gestrichelte Linie) bis zu den unterschiedlichen Spaltstellen wird eine Population von "blunt-End"-DNA-Duplexmolekülen erzeugt. An jedes dieser DNA-Moleküle wird durch T4-DNA-Ligase ein spezieller Linker an das 5'-Ende der DNA ligiert (c), wodurch die Moleküle ein Ende mit identischer Sequenz erhalten. Der Linker wird nur an das jeweils zu untersuchende Gen ligiert, da nur dieses durch die erste Primer-Verlängerung ein doppelsträngiges "blunt"-Ende 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) 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). Nach Verlängerung des Primers hat nun jedes DNA-Molekül der Sequenzleiter zwei definierte Enden (das 25mer Linker-Oligonukleotid und den zweiten, genspezifischen Primer), wodurch eine PCR möglich 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}P -endmarkierten Oligonukleotids (Primer 3) in einem einzigen Verlängerungsschritt (gestrichelte Linie) (g) radioaktiv markiert. Die Sequenzleiter wird anschließend, nach Auftrennung über ein Standard-Sequenziergel (Maxam und Gilbert, 1980), durch Autoradiographie sichtbar gemacht.



Fragment verwendet, das ohne vorherige Inkubation mit Proteinextrakt mit DMS und Piperidin-behandelt wurde.

Abb. 6 zeigt die *in vitro* "Footprint"-Analyse des nicht-kodierenden Stranges des *c-jun* Promotors. Verglichen mit der "nackten", d.h., proteinfreien Kontroll-DNA, bei der alle Guanine der untersuchten

Promotorregion zu sehen sind, sind bei der mit Proteinextrakt inkubierten DNA eine Reihe von Guaninresten durch Proteinbindung geschützt.

Eine Bindestelle ist durch Protektion der Guanine im Bereich -100 bis -79 sichtbar. Dabei handelt es sich um den Transkriptionsfaktor CTF (Angel et al., 1988). In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, die die Proteinbindungen im Bereich -132/+170 analysierten (Angel et al., 1988), ist auch die Sp1 Bindestelle (-124/-107), sowie die Jun 1 AP-1 Bindestelle (-68/-60) sichtbar.

Weitere Protektionen erscheinen an den Guaninen -132 und -133, wobei der Guaninrest bei -135 leicht hypersensitiv wird. In diesem Bereich könnte der kürzlich identifizierte Transkriptionsfaktor NF-Jun binden (Brach et al., 1992). Allerdings ist dessen beschriebene Binderegion nicht exakt identisch mit der hier beobachteten. Deshalb ist die Bindung eines anderen Faktors, der ähnliche Bindungseigenschaften wie NF-Jun hat, nicht auszuschließen.

Zusätzlich sind die Guanine im Bereich -197 bis -167 stark protektiert. Innerhalb dieser Region sind zwei Bindungsstellen abzugrenzen: die eine liegt zwischen den Nukleotiden -191 und -182 und hat Ähnlichkeit mit einer AP-1 Bindestelle (Jun 2, beschrieben in Stein et al., 1992). Sowohl Jun 1, als auch Jun 2 besitzen, im Vergleich zur klassischen AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors (TGAG^G/CTCA), ein zusätzliches Nukleotid in der Mitte der Bindestelle (Jun 1: TGACATCA; Jun 2: TTACCTCA).

Stromabwärts und direkt benachbart zu Jun 2 ist der Bereich -181 bis -167 protektiert. Die DNA-Sequenz weist keine signifikante Homologie mit der Kernsequenz eines bekannten Transkriptionsfaktors auf und wird deshalb im folgenden als "Footprint" (FP) bezeichnet.

Zusammenfassend läßt sich folgendes Schema des *c-jun* Promotors und seiner Bindesequenzen erstellen (Abb. 7):

Abb. 6 *In vitro* Bindung an den *c-jun* Promotor. Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen wurde mit einem Fragment des *c-jun* Promotors inkubiert und anschließend durch LMPCR analysiert, wie in Material und Methoden und Abb. 5 beschrieben. Gezeigt ist die Guanin-Sequenz des nicht-kodierenden Stranges (N); hier wurde die DNA nicht mit Proteinextrakt inkubiert. (0), die DNA wurde mit Kernextrakt inkubiert. Protektionen sind mit abwärts und Hypersensitivitäten mit aufwärts zeigenden Pfeilen gekennzeichnet. Die markierten Regionen geben die Proteinbindungsstellen des *c-jun* Promotors an: CTF (-86/-92), Sp1 (-105/-23), NF-Jun (-132/-140). Die Region einer bis jetzt völlig unbekanntes Bindungsstelle (FP) liegt zwischen -165 und -181. Die Sequenzen von Jun 1 (-75/-60) und Jun 2 (-192/-181) sind angezeigt.

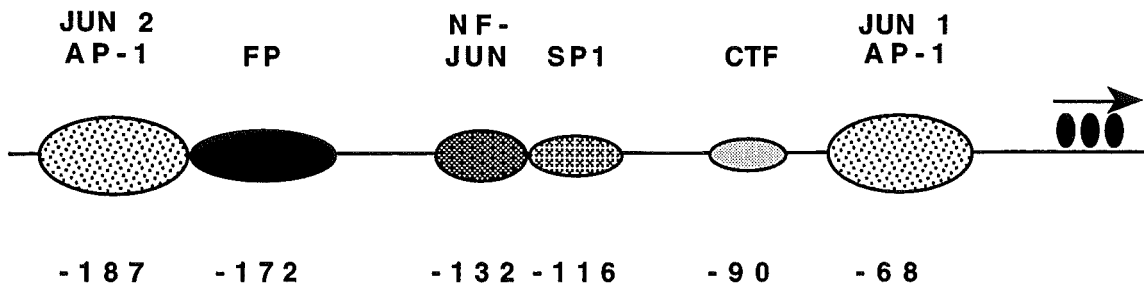
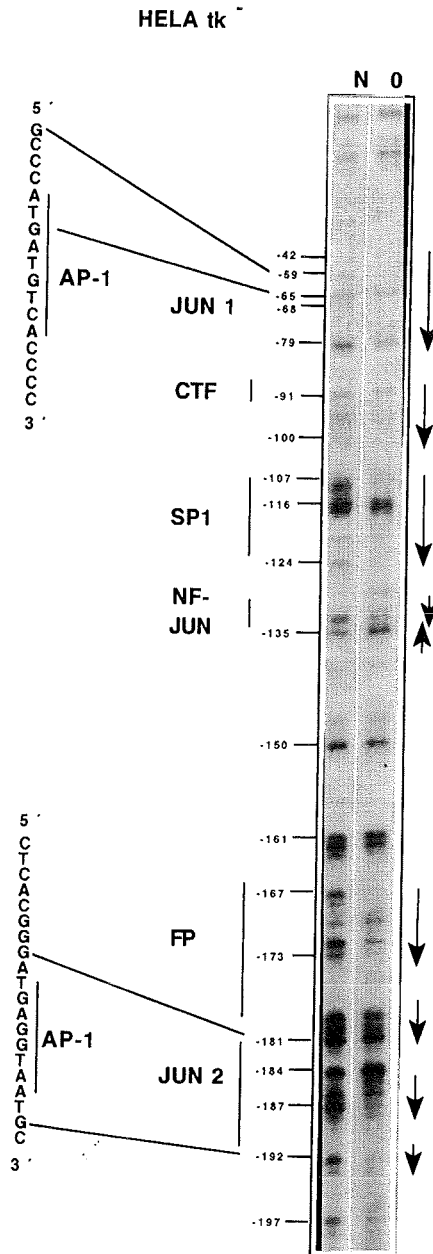


Abb. 7 Schema des *c-jun* Promotors und seiner Bindestellen. Die Zahlen beziehen sich auf die Mitte der jeweiligen Bindestelle. Der Pfeil und die schwarzen Ovale stehen für den basalen Transkriptionskomplex.

Die Funktionen von Jun 1, Jun 2, CTF, NF-Jun, Sp1 und FP bei der frühen Induktion des *c-jun* Promotors

Um die Rolle der identifizierten cis-Elemente für die basale und induzierte, frühe Transkription des *c-jun* Promotors aufzuklären, wurden chimäre Genkonstrukte hergestellt, die in den betreffenden

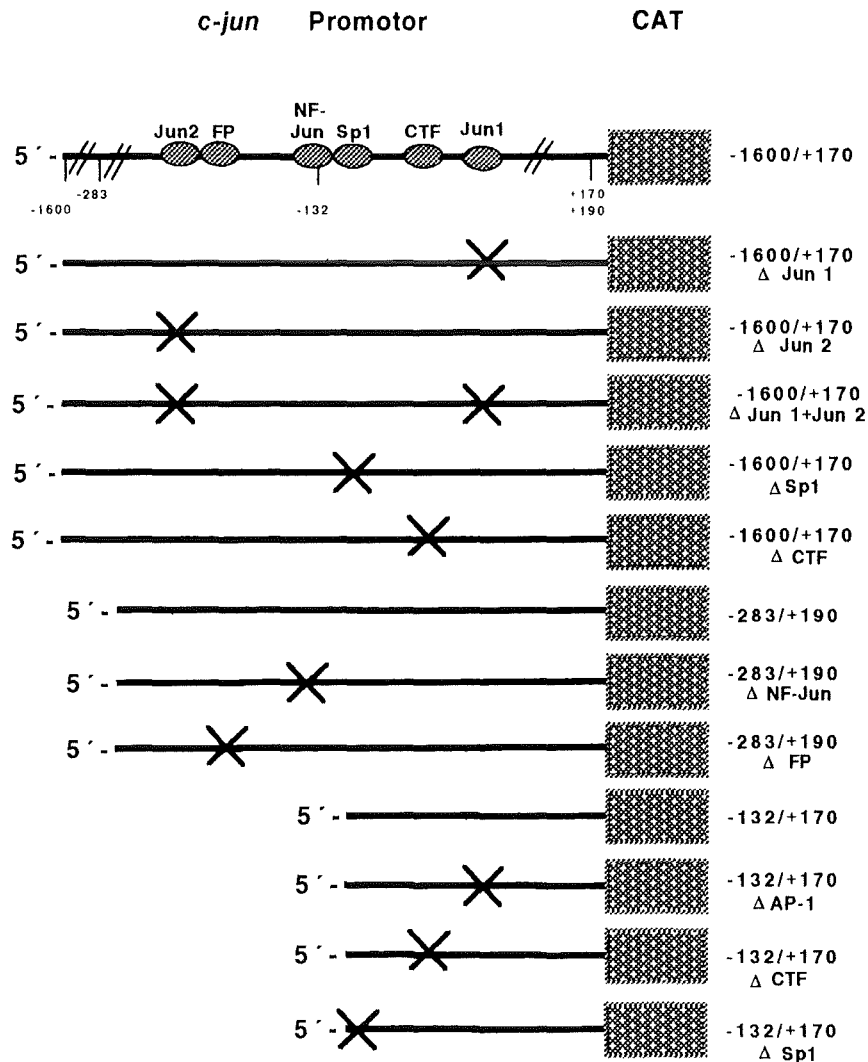


Abb. 8 Schema der *c-jun* Promotormutanten, die mit dem CAT-Gen fusioniert sind. Punktmutationen sind mit einem Kreuz unterhalb der jeweiligen Sequenz gekennzeichnet.

Bindesequenzen Punkt-Mutationen tragen. Diese Gen-Konstrukte enthalten 1600, 283, oder 132bp 5'-flankierende Sequenzen inklusive des authentischen *c-jun* Promotors, fusioniert mit dem bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reporter gen (Abb. 8).

Die Gen-Konstrukte wurden durch transiente Transfektion in die menschliche Haut-Fibroblasten Zell-Linie GM637 eingebracht. Die RNA wurde eine oder drei Stunden nach Behandlung der Zellen mit TPA oder UV-Licht (bzw. aus unbehandelten Zellen) präpariert und die Menge der CAT-Transkripte durch eine RNase-Protektions-Analyse gemessen. Als interner Standard für die Effizienz der Transfektion und als Kontrolle der TPA- und UV-Behandlung wurden geringe Mengen eines 5xTRE-tk-CAT-Konstruktes ko-transfiziert. Dieses Kontroll-Konstrukt enthält mehrere AP-1-Bindungsstellen des menschlichen Kollagenase-Promotors und reagiert stark auf eine Induktion durch TPA und UV-Licht (Angel et al., 1987a+b; Stein et al., 1989). Teilweise wurden als Maß für die Transfektionseffizienz auch das Plasmid pBLCAT4 oder ein RSV-Luziferase-Konstrukt ko-transfiziert.

Im Kontext des vollständigen *c-jun* Promotors sind die beiden AP-1 Bindestellen Jun 1 und Jun 2 für die sehr frühe Induktion durch TPA und UV-Licht unbedingt notwendig (Abb. 9a): Der komplette Promotor (-1600/+170) zeigt eine deutliche basale Transkription, die durch TPA- oder UV-Behandlung zwei- bis dreifach gesteigert wird. Mutation von Jun 1 und Jun 2 reduziert die basale Transkription sehr stark und führt zu einem fast vollständigen Verlust der Induktion durch TPA und UV. Der *c-jun* Minimalpromotor -132/+170 Δ AP-1 (Abb. 9c), dem ebenfalls Jun 1 und Jun 2 fehlen, ist nicht mehr induzierbar. Individuelle Inaktivierung von entweder Jun 1 oder Jun 2 reduziert den basalen und den induzierten Wert. Die Induktionsfaktoren bleiben jedoch bestehen und ähneln dem Wildtyp-Promotor. Daraus läßt sich schließen, daß beide Elemente (Jun 1 und Jun 2), im Kontext des vollständigen Promotors, für die schnelle Induktion des *c-jun* Promotors absolut notwendig sind. Identische Ergebnisse wurden in An- oder Abwesenheit der ko-transfizierten 5xTRE-tk-CAT oder pBLCAT4 Konstrukte erhalten.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Induktion des *c-jun* Promotors durch TPA und UV-Licht scheint die CTF-Bindungsstelle zu spielen. Nach Mutation von CTF kommt es im Vergleich zu den Wildtyp-Konstrukten zu einer erheblichen Reduktion des basalen und des induzierten Wertes. Der Induktionsfaktor bleibt jedoch bestehen (Abb. 9b). Dieses Ergebnis ergibt sich sowohl beim Minimalpromotor Konstrukt -132/+170 Δ CTF (Abb. 9c), als auch im vollständigen Promotor Konstrukt -1600/+170 Δ CTF (Abb. 9b). CTF scheint somit ein Faktor zu sein, der die Jun 1/Jun 2-abhängige Induzierbarkeit durch TPA und UV unterstützt. CTF selbst vermittelt jedoch keine Induzierbarkeit, da die beiden Konstrukte -1600/+170 Δ Jun1+Jun2 und -132/+170 Δ AP-1, die eine intakte CTF-Bindestelle enthalten, nicht mehr induzierbar sind.

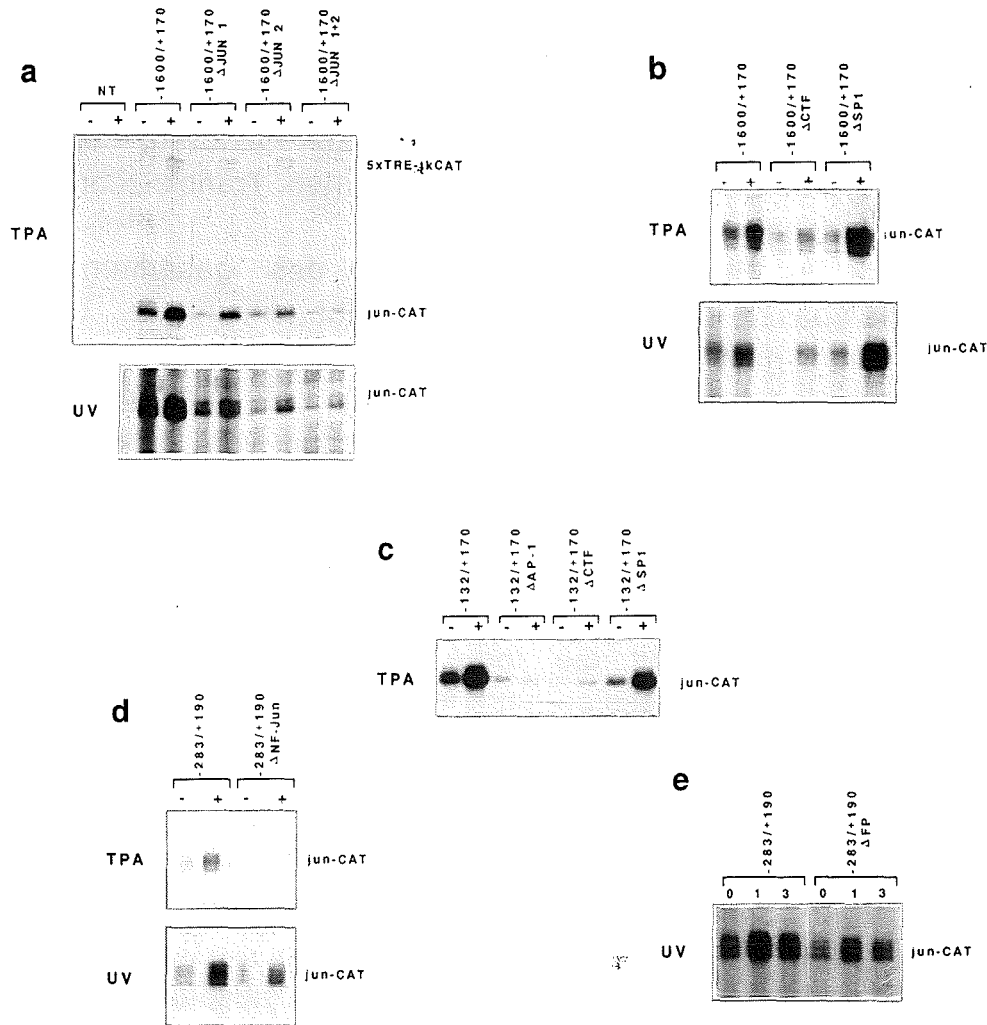


Abb. 9 Induzierbarkeit von *c-jun*-CAT chimären Genen durch TPA und UV-Licht. Menschliche GM637 Fibroblasten wurden mit je 20µg verschiedener *c-jun*-Promotor-CAT Reporter Plasmide, wie oben an der Abbildung angegeben, transient transfiziert. 24h nach Entfernen der DNA-Präzipitate wurden die Zellen entweder unbehandelt (-) oder für 1h mit TPA (100ng/ml) oder 30J/m² UV-Licht (254nm) (+) behandelt. Wie angezeigt, wurde in (e) sowohl 1h, als auch 3h mit UV-Licht behandelt. Die gesamte zelluläre RNA wurde präpariert und die Menge der CAT-Transkripte wurde durch eine RNase-Protektions-Analyse gemessen. 5µg eines 5xTRE-tkCAT wurden in einem Experiment als interne Kontrolle für die TPA-Induktion und die Transfektionseffizienz parallel transfiziert. NT; RNA von Zellen, die kein zusätzliches Plasmid enthalten. Korrekt initiierte tk-CAT und Jun-CAT Transkripte ergeben Fragmente von 210 und 150 Nukleotiden, wie auf der rechten Seite angezeigt wird. (a - e). Untersuchung der Konstrukte -1600/+170 WT, -1600/+170 ΔJun 1, -1600/+170ΔJun 2, -1600/+170ΔJun 1+2, -1600/+170ΔCTF, -1600/+170ΔSp1, -132/+170ΔAP-1, -132/+170ΔCTF, -132/+170ΔSp1, -293/+190WT, -293/+190ΔNF, und -293/+190ΔFP.

Mutation der FP- oder der NF-Jun-Region (Abb.9d, e) im Konstrukt -283/+190ΔFP oder -283/+190ΔNF-Jun hat eine Verringerung sowohl des basalen, als auch des induzierten Wertes zur Folge. Drei Stunden nach UV-Behandlung ist die Induktion der FP-Mutante im Vergleich zur

Induktion nach einer Stunde schon wieder deutlich vermindert, aber immer noch höher als der basale Transkriptionswert. FP und NF-Jun wirken daher, ähnlich wie CTF, als aktivierende Faktoren, die zusammen mit Jun 1 und Jun 2 zur basalen und induzierten Transkription des *c-jun* Promotors beitragen.

Mutation der Sp1-Bindestelle im Kontext des gesamten Promotors verändert die basale Transkriptionsrate nicht signifikant. Dagegen ist die Transkription nach UV-Licht und TPA deutlich höher induziert als beim Wildtyp-Konstrukt (Abb. 9b). Im Minimalpromotorkonstrukt -132/+170 Δ Sp1 (Abb. 9c) bewirkt die Mutation von Sp1, im Vergleich zum Wildtyp, eine leicht verringerte Transkription sowohl des basalen, als auch des induzierten Konstruktes. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß Sp1, im Kontext des gesamten *c-jun* Promotors, für die frühe Induktion nicht notwendig ist - vielmehr könnte Sp1 einen reprimierenden Einfluß auf die Induktion haben. Im Minimalpromotorkonstrukt trägt Sp1 zur basalen und induzierten Transkription bei. Diese Unterschiede zwischen dem kurzen und langen Promotorkonstrukt könnten auf Wechselwirkungen zwischen Sp1 und Faktoren, die stromaufwärts von -132 liegen, schließen lassen.

Zusammengefaßt bedeuten diese Ergebnisse, daß die beiden AP-1 Bindestellen, Jun 1 und Jun 2 für eine vollständige basale und stimulierte Expression des *c-jun* Promotors absolut notwendig sind. Die Faktoren, die an die CTF-, NF-Jun- und FP-Sequenzen binden, tragen zur basalen und induzierten Expression bei, können aber ohne Jun 1 und Jun 2 keine Aktivität vermitteln. Sp1 trägt nicht zur Aktivierung des *c-jun* Promotors bei, sondern beeinflusst diesen vielmehr negativ. Die Reaktionen der verschiedenen Konstrukte auf die Behandlung durch UV-Licht oder TPA sind jeweils identisch.

Diese Ergebnisse werden durch frühere Untersuchungen von *c-jun* Promotorkonstrukten bestätigt. Hierzu wurden Mutanten der Jun 1-, Jun 2-, CTF- oder Sp1-Bindestelle in Zellen transfiziert und deren Transkription indirekt über die Expression des CAT Proteins 24 oder 42 Stunden nach Behandlung von Zellen mit TPA oder UV-Licht bestimmt (Stein et al., 1992; Unlap et al., 1992).

Auch unter diesen Bedingungen konnte hier die unterstützende Funktion der FP und NF-Jun Bindestellen bestätigt werden. Nach Transfektion der Konstrukte in GM637-Zellen wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt und 24 oder 48 Stunden später Proteinextrakte hergestellt. Die Bestimmung der Menge an CAT-Enzym im Proteinextrakt (CAT-Assay) resultiert nach Mutation von entweder FP oder NF-Jun in einer stark erniedrigten basalen, sowie induzierten Expression der CAT sowohl 24, als auch 48 Stunden nach UV-Bestrahlung (Abb. 10). Als Kontrolle für

die Transfektionseffizienz wurden geringe Mengen eines RSV-Luciferase-Konstruktes ko-transfiziert und die Menge der exprimierten Luciferase, die nicht durch UV-Licht induzierbar ist, in einem "Luciferase-Assay" gemessen, was eine gleichmäßige Transfektionseffizienz ergab.

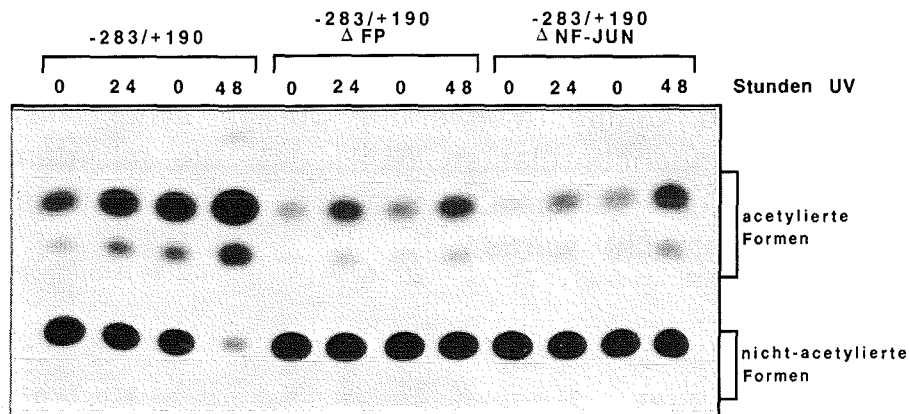


Abb. 10 Induzierbarkeit der *c-jun*-CAT chimären Gene -293/+190ΔNF, und -293/+190ΔFP durch UV-Licht. Menschliche GM637 Fibroblasten wurden wie in Abb. 9 angegeben, transient transfiziert. Nach Entfernen der DNA-Präzipitate wurden die Zellen entweder unbehandelt (-) oder mit 30J/m² UV-Licht (254nm) (+) behandelt. 24 oder 48h später wurden die Kernproteine präpariert und die Expression der CAT in einem "CAT-Assay" gemessen. 2μg eines RSV-Luciferase-Konstruktes wurden als interne Kontrolle für eine gleichmäßige Transfektionseffizienz ko-transfiziert.

III. *In vivo* DNA-Protein-Interaktionen an Promotoren von frühen und späten Genen

Durch die Analyse der Promotor-Mutanten mittels transients Transfektion ist ersichtlich, daß der *c-jun* Promotor durch die Zusammenarbeit verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Welche Veränderungen sich nach Stimulierung am Promotor abspielen, die für diesen Typ der Regulation verantwortlich sind, ist noch völlig unbekannt. Während der Aktivierung und Repression könnten jeweils unterschiedliche Proteine an den Promotor binden. Daneben könnten Veränderungen der Protein-Protein-Interaktionen auftreten. Möglich wäre auch eine Modifizierung von Proteinen, die schon am Promotor gebunden sind.

Um die *in vivo* Proteinbindung an den *c-jun* Promotor in nicht-stimulierten Zellen und während der Aktivierung und Repression zu untersuchen, wurden genomische "Footprint"-Analysen durchgeführt. Dazu wurden primäre, menschliche Fibroblasten (GM1604), sowie die etablierten Zelllinien HeLa, GM637 und NIH3T3 verwendet, in denen eine

schnelle und transiente *c-jun* Aktivierung nach TPA und UV-Licht zu beobachten ist. Um eine effiziente und synchrone Induktion des *c-jun* Promotors zu gewährleisten, wurden die Zellen für 48 Stunden in Medium ohne Serum kultiviert, wodurch sie in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert wurden.

Durch Immunfluoreszenz wurde überprüft, ob die Zellen zu 100% induziert worden waren. Diese Kontrolle ist notwendig, da im Falle einer ungleichmäßig induzierten Zellpopulation eine Proteinbindung verschleiert sein könnte. Verwendet wurden synchronisierte, primäre, menschliche Lungenfibroblasten (GM1604), die mit dem polyklonalen Jun-Antikörper Pep1 auf die Expression des cJun Proteins vor und nach Stimulation untersucht wurden.

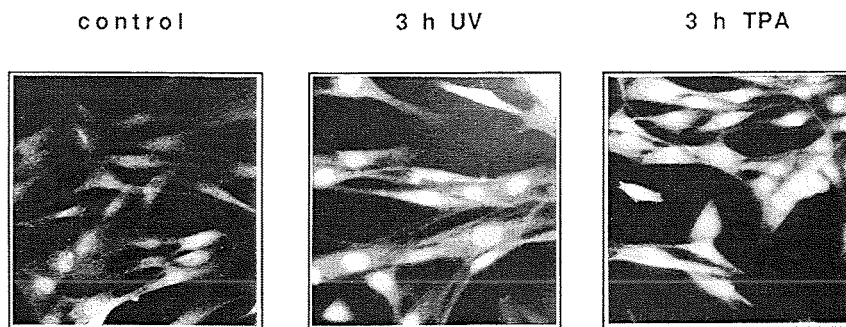


Abb. 11 Synchrone Induktion der cJun Expression durch TPA oder UV-Licht. Menschliche, primäre Fibroblasten (GM1604) wurden entweder mit TPA (100ng/ml) oder UV-Licht (30J/m²) behandelt und die Menge des cJun Proteins wurde 3h nach der Stimulation durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines cJun-spezifischen Antikörpers (Pep1) nachgewiesen.

Die Immunfluoreszenz-Analyse mit einem spezifischen cJun-Antikörper bestätigt, daß im Vergleich zur Kontrolle, nach Behandlung von Zellen mit TPA oder UV-Licht, alle Zellkerne aufleuchten (Abb. 11). Es kann daher von einer synchronen Antwort der Zellen, in Bezug auf eine Steigerung der Menge an *c-jun* Transkripten bzw. cJun Protein, ausgegangen werden.

Die *in vivo* "Footprint"-Analyse der 5'-flankierenden Region des *c-jun* Gens macht deutlich, daß schon in nicht-stimulierten Zellen eine Reihe von Proteinen mit dem Promotor assoziiert sind (Abb. 12a). Vergleicht man das Guanin-Muster von proteinfreier (N) DNA, die *in vitro* methyliert wurde, mit dem von *in vivo* methylierter DNA aus

unbehandelten Zellen, sind klare Unterschiede von DMS-geschützten und hypermethylierten Guanin-Resten zu erkennen. Die beiden Proteinbindungsstellen Jun 1 und Jun 2 sind bereits in unbehandelten Zellen (0) voll besetzt: Bindung an Jun 1 ist sichtbar durch vollständige Protektion der Guanine -72, -70 und Hyperreaktivität der Guanine -74, -60 des kodierenden Stranges. Auf dem nicht-kodierenden Strang sind

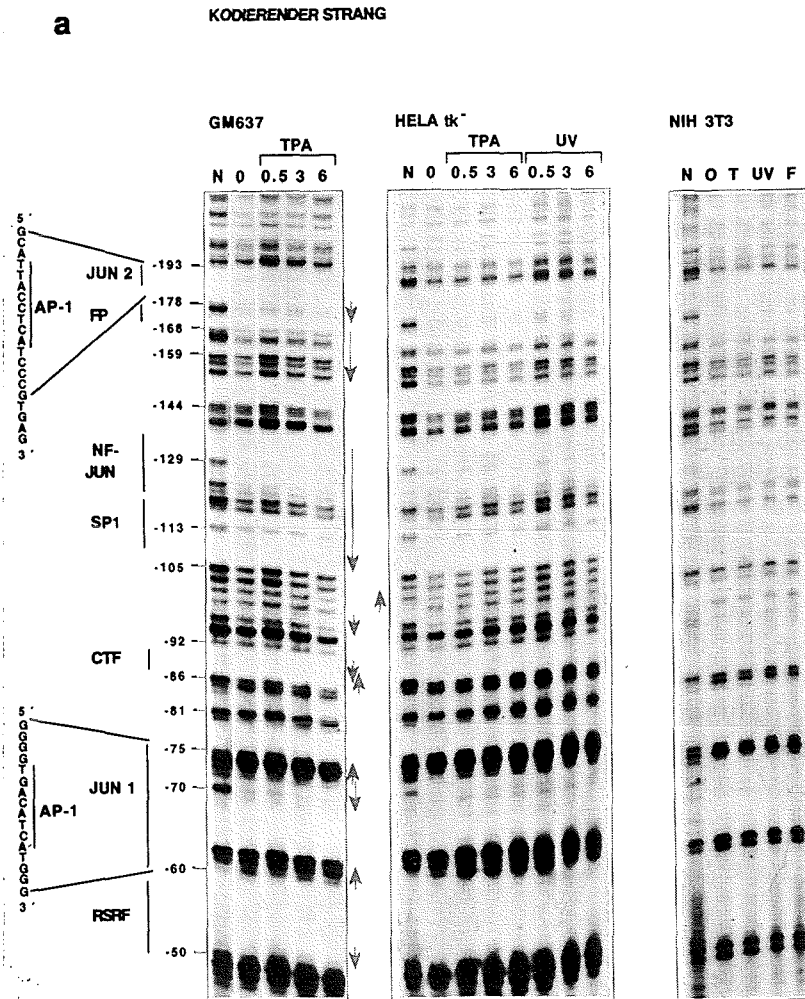
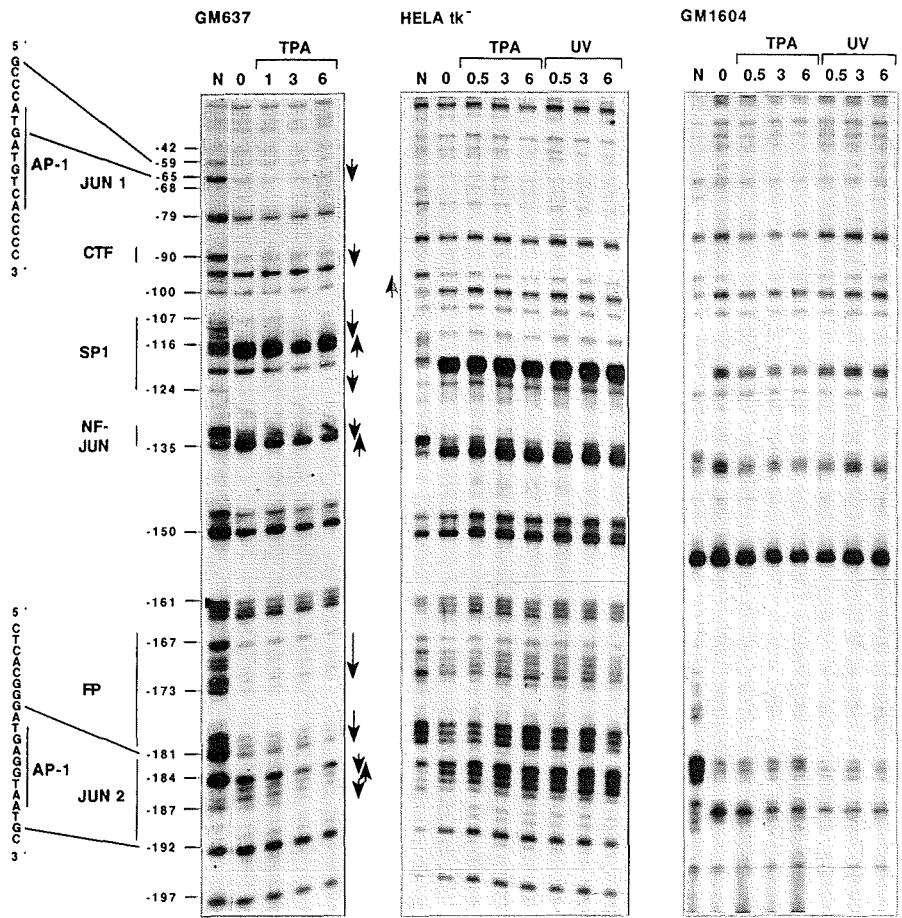


Abb. 12 *In vivo* Proteinbindung an den *c-jun* Promotor im basalen Zustand und während der transkriptionellen Aktivierung und Repression.

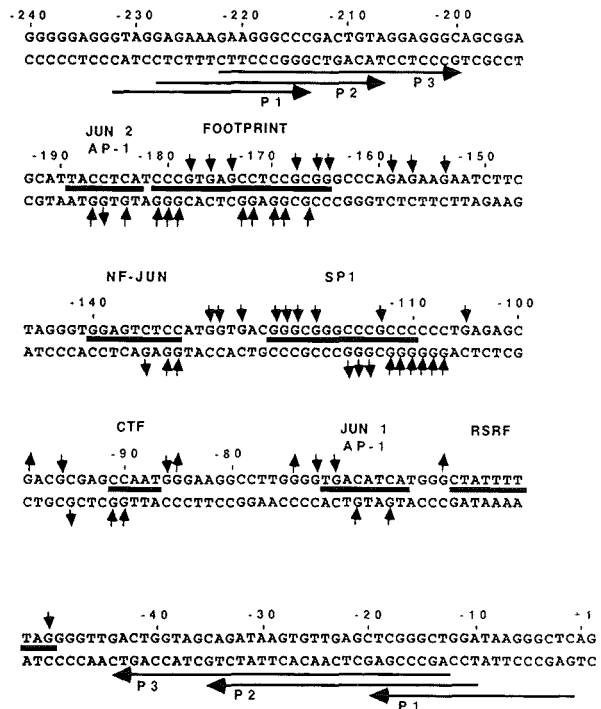
(a) Genomische DMS-"Footprint"-Analysen des *c-jun* Promotors. Transformierte und primäre menschliche Fibroblasten (GM637, GM1604), HeLa-Zellen und Maus-NIH3T3-Zellen wurden mit TPA (100ng/ml) oder 30J/m² UV-Licht (254nm) behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 0,5, 3, 6h) wurde die *in vivo* Proteinbindung durch genomische "Footprint"-Analysen bestimmt. Die Guaninleitern der kodierenden Stränge (proximaler Promotorbereich unten, beginnend bei -50) sind links und die der nicht-kodierenden Stränge (distaler Promotorbereich unten, beginnend bei -197) sind rechts gezeigt. N, *in vitro* methylierte, Protein-freie ("nackte") DNA; die markierten Regionen repräsentieren Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren RSRF (-50/-60); CTF

(-86/-92); Sp1
 (-105/-123); NF-Jun
 (-132/-140); FP
 (-165/-181). Die
 Sequenzen der beiden
 AP-1 Bindestellen Jun 1
 (-75/-60) und Jun 2
 (-192/-181) sind
 angeschrieben. Abwärts
 zeigende Pfeile geben
 Protektionen und
 aufwärts zeigende Pfeile
 Hypersensitivitäten an.
 (b) Zusammenfassung
 der genomischen Foot-
 print"-Daten. Protekt-
 tierte Guanine des kod-
 ierenden Stranges sind
 mit abwärts und hyper-
 sensitive Guanine sind
 mit aufwärts zeigenden
 Pfeilen gekennzeichnet
 und umgekehrt für den
 nicht kodierenden Strang.
 Die Erkennungssequen-
 zen für bindende Trans-
 kriptionsfaktoren sind
 unterstrichen. Die Posi-
 tionen der Primer 1
 bis 3 (P1, P2, P3), die
 für die *in vivo*
 "Footprint" Analysen
 benutzt wurden, sind
 eingezeichnet.

NICHT-KODIERENDER STRANG



b



die Guanine -68 und -65 geschützt.

Bindung an Jun 2 ist charakterisiert durch Protektionen an den Guaninen -184 und -187 des nicht-kodierenden Stranges. Guanin -186 des gleichen Stranges wird hyperreaktiv. Allerdings treten Zell-spezifische Unterschiede auf: Guanin -184 des nicht-kodierenden Stranges ist in HeLa-Zellen nicht deutlich geschützt.

Im Bereich der CTF-Bindungsstelle sind auf dem kodierenden Strang die Guanine -86, -96 und auf dem nicht-kodierenden Strang die Guanine -90 und -91 protektiert. Hyperreaktiv werden auf dem kodierenden Strang die Guanine -85 und -99 und auf dem nicht kodierenden Strang Guanin -95.

Im Bereich der Sp1-Bindungsstelle werden auf dem nicht-kodierenden Strang die Guanine -116, -115, -114 hyperreaktiv und die Guanine -107 bis -112 sind protektiert. Auf dem kodierenden Strang sind die Guanine -105 und -113, sowie die Guanine und im Bereich von -119 bis -129 geschützt.

Die Bindung eines NF-Jun ähnlichen Faktors ist durch Protektion der Guanine -133 und -132 und Hyperreaktivität von Guanin -135 des nicht-kodierenden Stranges sichtbar.

FP zeichnet sich durch vollständig geschützte Guanine im Bereich -181 bis -165 auf dem kodierenden und nicht-kodierenden Strang aus. Außerdem sind die Guanine -159, -157 und -154 des kodierenden Stranges protektiert.

Klar ersichtlich ist eine Bindung an die kürzlich beschriebene Sequenz RSRF ("Related SRF"), die sich durch Protektion von Guanin -50 des kodierenden Stranges bemerkbar macht. RSRF scheint eine wichtige Rolle für die Induzierbarkeit des *c-jun* Promotors durch EGF und Serum zu spielen und soll zur maximalen Induzierbarkeit des *c-jun* Promotors durch TPA beitragen (Han et al., 1992).

Die beschriebenen Protektionen und Hypersensitivitäten sind in Abb. 12b schematisch zusammengefaßt.

Die durch diese *in vivo* "Footprint"-Analysen gefundenen Proteinbindungsstellen stimmen völlig mit den *in vitro* Bindungsstudien überein (Abb. 6). Auffallend ist, daß die NF-Jun Sequenz in allen untersuchten Zelllinien besetzt ist, obwohl die Bindung des Faktors NF-Jun als spezifisch für myeloide Leukämie-Zellen beschrieben wurde (Brach et al., 1992). Allerdings stimmen die hier beobachteten Protektion und Hypersensitivitäten nicht exakt mit der beschriebenen DNA Erkennungssequenz von NF-Jun überein. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß ein anderer Faktor als NF-Jun im Bereich der NF-Jun Sequenz bindet.

Während der Phase der transkriptionellen Aktivierung durch TPA oder UV-Licht (30 Minuten bis eine Stunde nach Stimulierung) ändert sich das *in vivo* "Footprint"-Muster bei keiner der angezeigten Bindungsstellen. Daher ist es unwahrscheinlich, daß die Induktion des *c-jun* Promotors durch die zusätzliche Bindung eines aktivierenden Faktors, oder durch die Dissoziation eines Repressors hervorgerufen wird.

Drei und sechs Stunden nach Stimulation mit UV-Licht oder TPA, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Transkriptionsrate des *c-jun* Promotors schon wieder den Basalwert erreicht hat, sind ebenfalls keine Veränderungen in der Proteinbesetzung sichtbar.

Diese Ergebnisse schließen die Möglichkeit aus, daß das Abschalten der Promotor-Aktivität durch die Dissoziation eines Proteins oder durch das zusätzliche Binden eines Repressors an den *c-jun* Promotor zustande kommt. Dieser Zustand eines permanent und während aller Aktivitätszustände besetzten Promotors tritt auch bei *c-fos*, einem anderen "immediate early" Gen, auf (Herrera et al., 1989; König et al., 1991) und könnte daher essentiell für die schnelle Regulation sein. Die konstitutive Bindung von Proteinen an den *c-jun* Promotor weist auf eine Induktion der *c-jun* Transkription durch einen Austausch von Faktoren mit identischen DNA-Bindeeigenschaften, aber unterschiedlichen transaktivierenden Fähigkeiten hin. Eine andere Möglichkeit wäre eine Steuerung der Promotoraktivität über Protein-Protein-Interaktionen zwischen Promotor-gebundenen Proteinen und Faktoren, die die DNA nicht direkt kontaktieren. Denkbar ist auch eine post-translationale Modifikation, die die transaktivierenden Funktionen von ständig mit dem Promotor assoziierten Transkriptionsfaktoren verändert.

Das Konzept eines "latenten" Promotors, an dem schon in nicht-stimulierten Zellen alle zur Induktion notwendigen Faktoren gebunden sind, steht im Gegensatz zu den "späten" Genen wie z.B. Kollagenase I und t-Pa. Nach Induktion wurde für Kollagenase eine zeitlich verzögerte, verstärkte Bindung von Faktoren an den Promotor beobachtet (König et al., 1992; Daten nicht gezeigt und Abb. 18, 24).

Die *in vivo* "Footprint"-Analyse des kodierenden und nicht-kodierenden Stranges des Kollagenase I Promotors aus GM637, HeLa und CRL 1497-Zellen (Daten nicht gezeigt und Abb. 13, 18, 24) zeigt eine Protektion des Guanin -71 in der AP-1 Bindestelle von Box 2 des kodierenden Stranges. Diese Protektion ändert sich nach Stimulation durch UV-Licht und TPA nicht. Guanin -65 des kodierenden Stranges ist in GM637 Zellen ebenfalls schon in unbehandelten Zellen geschützt, wird jedoch

nach Induktion durch TPA oder UV-Licht im Vergleich zu unbehandelter DNA hyperreaktiv. In HeLa-Zellen ist Guanin -65 in unbehandelten Zellen nicht geschützt, wird aber nach Stimulation durch TPA hypersensitiv. In CRL 1497-Zellen ist Guanin -67 des nicht-kodierenden Stranges schon in unbehandelten Zellen vollständig protektiert (König et al., 1992; Daten nicht gezeigt und Abb. 13, 18, 24).

Die induzierte Besetzung der AP-1 Bindungsstelle und distal davon liegender Sequenzen des Kollagenase Promotors (zusammenfassend in Abb. 13 dargestellt) stimmt dabei mit der Kinetik der transkriptionellen Aktivierung des Kollagenase-Gens nach Induktion durch TPA überein. Zur Regulation des Kollagenase-Promotors scheint, im Gegensatz zum permanent besetzten Promotor des *c-jun* Gens, ein Austausch von DNA-bindenden, regulatorischen Proteinen stattzufinden.

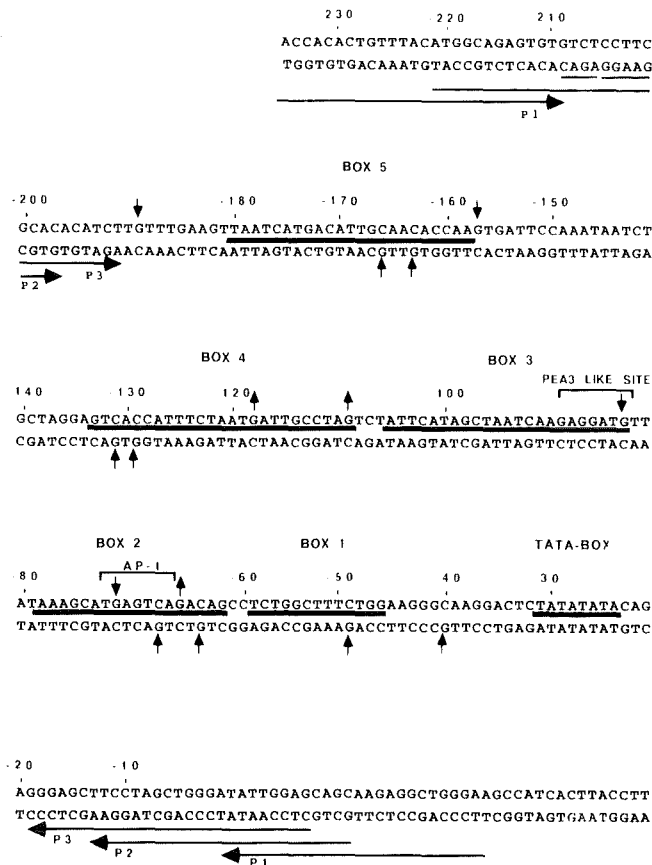


Abb. 13 Zusammenfassung der *in vivo* DMS-Reaktivität am kodierenden und nicht kodierenden Strang des menschlichen Kollagenase Promotors. Erklärung wie in Abb. 12 beschrieben.

Ähnlich wie beim Kollagenase Promotor wird die Transkription von t-Pa über eine AP-1 Bindungsstelle reguliert, die für die TPA Induktion des Promotors verantwortlich ist (Medcalf et al., 1990). Während TPA innerhalb der hier verwendeten Kinetik von sechs Stunden induziert (Daten nicht gezeigt), bewirkt UV-Bestrahlung keine transkriptionelle Aktivierung des t-Pa Promotors innerhalb dieses Zeitraums - möglicherweise reagiert der Promotor auf UV-Licht später.

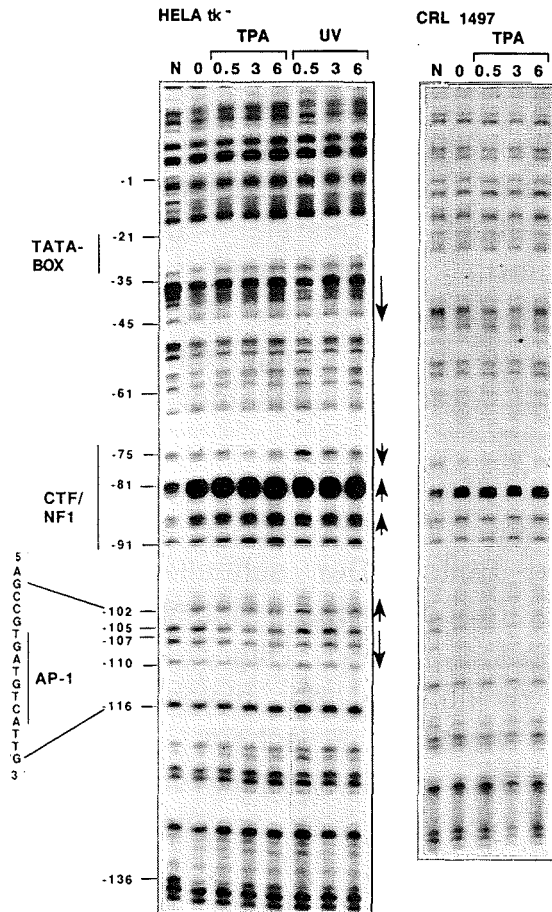
Genomische "Footprint"-Analysen am nicht-kodierenden Strang des t-Pa Promotors aus CRL 1497 und HeLa-Zellen weisen mehrere Protektionen und Hypersensitivitäten von Guaninen der AP-1 und der CTF/NF1 Bindungsstelle, sowie in der Nähe der TATA-Box auf (Abb. 14).

Innerhalb der AP-1 Bindestelle ist das Guanin -102 aus HeLa-Zellen, im Vergleich zu nackter DNA, schon in der Kontrolle hypersensitiv. Nach Stimulation der Zellen bleibt diese Hypersensitivität bestehen und verändert sich nicht. Die benachbarten Guanine -105 bis -110 sind jedoch noch nicht geschützt. Erst nach TPA-Behandlung (nicht jedoch nach UV-Bestrahlung) tritt eine leichte Protektion auf. Das Maximum ist drei Stunden nach Induktion durch TPA sichtbar. Diese Protein/DNA Interaktion an den Guaninen -105 bis -110 sind sowohl bei HeLa-, als auch bei CRL 1497-Zellen vorhanden (Abb. 14a). Die beschriebenen Protektionen und Hypersensitivitäten sind dem Schema in Abb. 14b zu entnehmen.

Am t-Pa Promotor kommen demnach Protektionen und Hypersensitivitäten schon in Kontrollzellen vor, die nach Stimulation nicht verändert werden. Gleichzeitig kann nach Behandlung von Zellen mit TPA, nicht jedoch nach Bestrahlung mit UV-Licht, eine Zunahme von Protektionen und Hypersensitivitäten an der AP-1 Bindestelle beobachtet werden. Interessanterweise sind die Kernsequenz der proximalen AP-1 Bindestelle des *c-jun* Promotors (Jun 1) und der AP-1 Bindestelle des t-Pa Promotors identisch. Trotzdem ergeben sich deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten. Während Jun 1 ständig besetzt ist, wird die Bindung an die AP-1 Sequenz von t-Pa induziert. Dies kann durch unterschiedliche flankierende Sequenzen beeinflusst werden. Außerdem könnten die unterschiedlichen Proteine, die mit dem t-Pa oder *c-jun* Promotor assoziiert sind, die Bindung an die AP-1 Sequenz beeinflussen.

a

NICHT-KODIERENDER STRANG



b

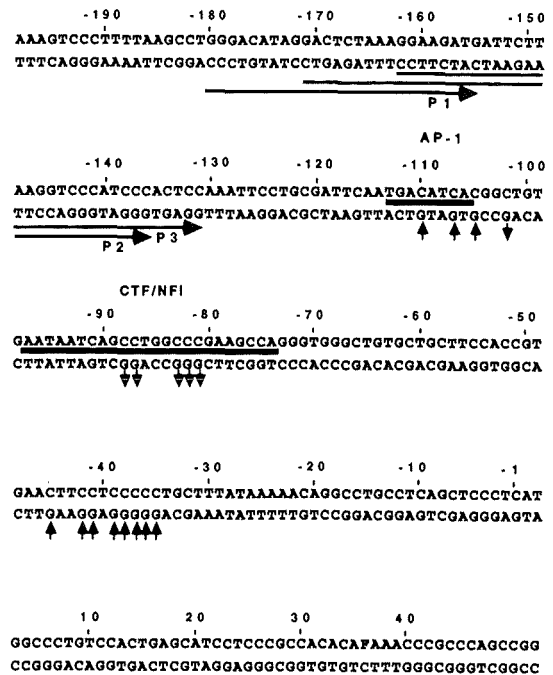


Abb. 14: *In vivo* Proteinbindung an den nicht-kodierenden Strang des menschlichen t-Pa Gens aus HeLa- und CRL 1497-Zellen. (a) und (b) wie in Abb. 12 beschrieben.

IV. *In vitro* DNA-Protein-Interaktionen an Jun 1, Jun 2 und FP

Unterschiede in der DNA Bindung an die AP-1 Sequenzen im *c-jun*, Kollagenase und t-Pa Promotor lassen vermuten, daß die bindenden Faktoren nicht identisch sind. Um die spezifischen Untereinheiten der Dimere zu identifizieren, die die AP-1 Bindungsstellen dieser Promotoren erkennen, wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Durch Verwendung spezifischer Antikörper, die Mitglieder der Jun, Fos, oder ATF Familie erkennen, kann auf die Zusammensetzung des DNA/Protein Komplexes geschlossen werden. Gleichzeitig soll die Frage beantwortet werden, ob Faktoren, die in direkter Nachbarschaft der AP-1 Bindungsstelle an die DNA binden, für die Interaktion von AP-1 mit dem Promotor essentiell sind. Dies gilt vor allem für den Faktor FP, der direkt stromabwärts von Jun 2 an die DNA bindet und, zusammen mit dem Faktor, der an Jun 2 bindet, einen zusammenhängenden, protektierten Bereich hinterläßt.

Die *in vitro* Proteinbindung an Oligonukleotide der AP-1 Sequenz von Kollagenase, t-Pa, Jun 1 und Jun 2

Um die *in vitro* Bindung an die verschiedenen AP-1 Sequenzen darzustellen, wurde Proteinextrakt aus Kernen unbehandelter HeLa-Zellen mit den entsprechenden synthetisch hergestellten und radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert. Anschließend wurde das DNA/Protein Gemisch auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. DNA, die mit Kernproteinen Komplexe bildet, zeigt ein verändertes elektrophoretisches Laufverhalten und wandert langsamer im Gel als ungebundene DNA.

An der proximalen AP-1 Bindestelle des *c-jun* Promotors (Jun 1) bilden sich zwei Komplexe (Abb. 15, linke Seite). Der schneller wandernde Komplex (2) hat die gleiche elektrophoretische Mobilität wie der Protein-Komplex, der sich am Kollagenase AP-1 Oligonukleotid bildet. Der langsamer wandernde Komplex (1) läuft auf der gleichen Höhe wie der Komplex, der an Jun 2 bindet. Komplex 2 scheint nur mit sehr geringer Affinität an Jun 2 zu binden. Die AP-1 Sequenz von t-Pa zeigt, ähnlich wie Kollagenase, die Bindung von Komplex 2. Die Bindung ist aber wesentlich schwächer.

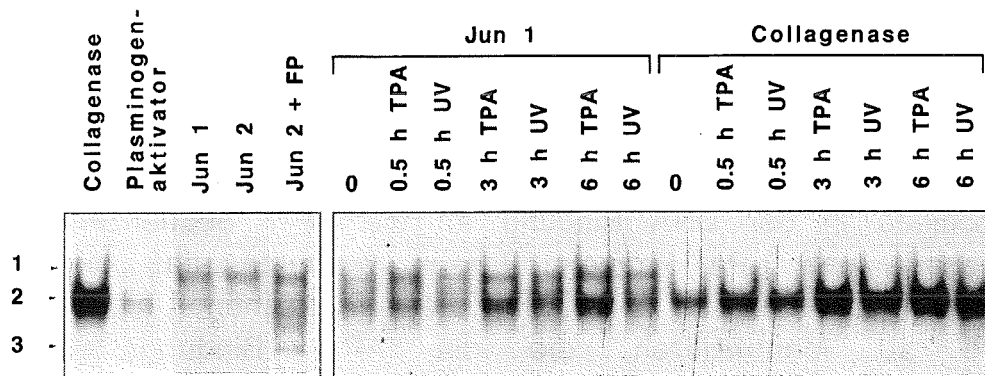


Abb. 15 Die *in vitro* Proteinbindung an Oligonukleotide der AP-1 Sequenz von Kollagenase, t-Pa, Jun 1, Jun 2 und Jun 2 + FP zeigt unterschiedliche Faktorbindung. Die Gelretardations-Analysen wurden mit Proteinextrakten aus Kernen von HeLa-Zellen durchgeführt, die entweder unbehandelt waren (linke Seite der Abbildung und O) oder für 0.5, 3 und 6h mit TPA (100ng/ml) oder mit 30J/m² UV-Licht (254nm) behandelt worden waren. Die benutzten radioaktiven Oligonukleotide sind im oberen Teil der Abbildung angegeben. 1, 2 und 3 markiert die Komplexe, die an die verschiedenen Oligonukleotide binden.

Komplex 1 bildet sich mit der AP-1 Sequenz von Jun 1 und Jun 2 aus, während Komplex 2 nur an den AP-1 Sequenzen von Jun 1, t-Pa und Kollagenase bindet.

Um zu überprüfen, ob sich die *in vitro* Komplexbildung an Jun 1 während des Verlaufs der transkriptionellen Aktivierung und nachgeschalteter Repression des *c-jun* Promotors ändert, wurden Gelretardations-Experimente mit Proteinextrakt aus Kernen von TPA oder UV-behandelten HeLa-Zellen durchgeführt. Als Probe wurde DNA von Jun 1 und, zum Vergleich, der AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors verwendet.

Nach der Behandlung mit UV-Licht oder TPA für 30 Minuten, drei und sechs Stunden wird die Menge von Komplex 1, der sich an Jun 1 bildet, nicht signifikant verändert (Abb. 15, rechte Seite). Die Bildung von Komplex 1 auf der Jun 2 Sequenz wird ebenfalls nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend bestätigen die *in vitro* Bindungsstudien die *in vivo* "Footprint"-Daten: Während der transkriptionellen Aktivierung von *c-jun* (innerhalb von 30 Minuten) tritt weder eine Verstärkung der DNA-Bindungs-Aktivität von Faktoren, die an Jun 1 und Jun 2 binden, auf, noch erscheinen zusätzliche Komplexe. Zu späteren Zeitpunkten, wenn die Transkriptionsrate schon wieder reprimiert ist und Basalwerte erreicht hat (nach drei und sechs Stunden), steigert sich die Menge des *in vitro* gebundenen Komplex 2, sowohl an Jun 1, als auch an Kollagenase.

Komplex 1 ist spezifisch für Jun 1 und Jun 2; Komplex 2 bindet sowohl an Jun 1, als auch an die AP-1 Sequenz von Kollagenase und t-Pa

Das sehr ähnliche Laufverhalten der Protein/DNA Komplexe läßt vermuten, daß verwandte Proteine mit den synthetischen Bindungsstellen interagieren. Diese Möglichkeit kann durch Kreuz-Kompetitions-Experimente untersucht werden. Deshalb wurde Proteinextrakt aus Kernen nicht-induzierter HeLa-Zellen mit radioaktiv markierter DNA von Jun 1, Jun 2 oder der AP-1 Sequenz von Kollagenase inkubiert. Zu diesen Reaktionen wurde jeweils ein molarer Überschuß nicht-radioaktiv markierter DNA-Probe gegeben (Abb. 16).

Kompetition mit einem 10- oder 25-fach molaren Überschuß an Jun 2 bewirkt eine starke Verringerung von Komplex 1, der an Jun 1 und Jun 2 bindet - die Bildung von Komplex 2 wird kaum beeinflusst. Umgekehrt kompetiert Jun 1 effizient die Bindung von Komplex 1 an Jun 2. Im Gegensatz dazu beeinflusst nicht-markierte DNA der AP-1 Sequenz des

Kollagenase Promotors die Bildung von Komplex 1 mit Jun 1 und Jun 2 nur schwach, führt aber zum völligen Verlust des Komplex 2. Auch die Bildung von Komplex 2 an der AP-1 Bindesequenz von t-Pa wird dadurch völlig aufgehoben (Daten nicht gezeigt).

Dies bedeutet, daß Komplex 1, der an die Jun 1 und Jun 2 Sequenzen bindet, eine starke Ähnlichkeit in der DNA Bindung aufweist, aber nur eine minimale Affinität zur AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors hat. Umgekehrt sind die Faktoren von Komplex 2, der an Kollagenase, t-Pa und Jun 1 bindet, stark verwandt.

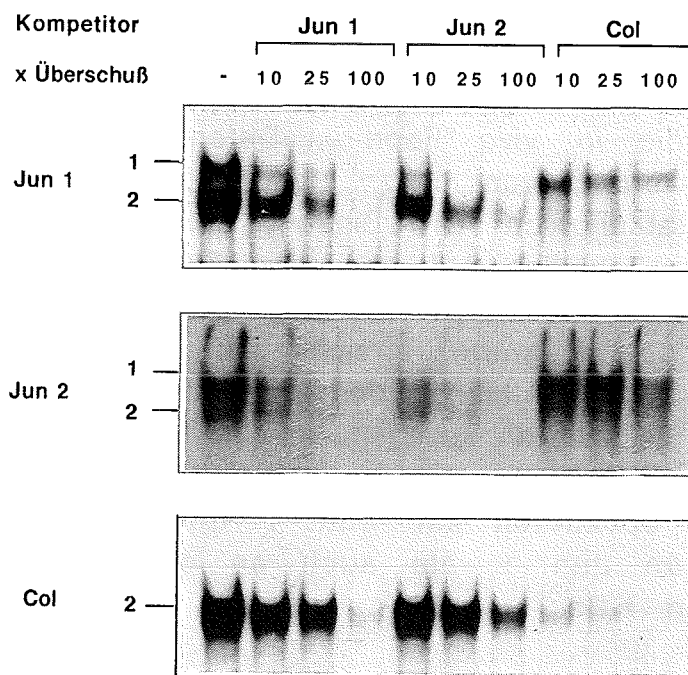


Abb. 16 Kreuz-Kompetitions-Experimente zeigen die Spezifität der *in vitro* Bindung von Komplex 1 und 2 an Oligonukleotide von Jun 1 und Jun 2, sowie an die AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors. Proteinextrakt aus Kernen unbehandelten HeLa-Zellen wurde mit den links an der Abbildung angezeigten radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert. Ein molarer Überschuß der nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotide, die im oberen Teil der Abbildung zu sehen sind, wurde zugegeben und die Proteinkomplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt. Komplex 1 und 2 sind auf der linken Seite der Abbildung markiert.

Die Protein-DNA Kontakte an Jun 1 und an der AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors sind *in vivo* und *in vitro* identisch

Die Anwesenheit eines bestimmten Transkriptionsfaktors in Proteinextrakten aus Zellkernen und seine *in vitro* Bindung an eine DNA-Sequenz lassen keine Rückschlüsse darauf zu, ob dieser Faktor *in vivo* an die gleiche Erkennungssequenz bindet. Da sowohl Proteine, als auch DNA *in vitro* im Überschuß vorhanden sind, könnten auch Proteinfaktoren an DNA-Sequenzen binden, für die sie nur eine geringe Affinität besitzen. Es stellt sich daher die Frage, welcher der beiden Faktoren (Komplex 1 oder 2) für die *in vivo* Funktion von Jun 1 (und Jun 2) verantwortlich ist, oder ob beide Protein Komplexe für die *in vivo* Regulation relevant sind. Eine Möglichkeit diese Frage zu beantworten ist, zu überprüfen, welcher der beiden Komplexe einen *in vitro* "Footprint" bildet, der ein identisches Muster der DMS Hyperreaktivität und Protektion *in vivo* (Abb. 12) aufweist. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* Methylation-Interference-Experiment durchgeführt.

Ein partiell methyliertes Jun 1 oder Kollagenase AP-1 Oligonukleotid, bei dem jeweils nur ein Strang, entweder der kodierende, oder der nicht-kodierende, radioaktiv markiert war, wurde mit Proteinextrakt aus Kernen unbehandelter oder für 30 Minuten mit TPA stimulierter HeLa-Zellen inkubiert. Proteine können dabei nur an nicht-methylierte Sequenzen dieses einseitig markierten Oligonukleotids binden. Damit alle Oligonukleotide, deren Methylierung eine Proteinbindung erlaubt, gebunden werden, wurde eine größere Menge an Proteinextrakt aus Kernen (im Vergleich zu den Bedingungen in Abb. 15 und 16) eingesetzt. Die gebildeten Komplexe wurden entsprechend auf einem nicht-denaturierenden Gel analysiert und die aufgetrennten Protein/DNA Komplexe 1 und 2 aus dem Gel ausgeschnitten. Ebenso wurden die restlichen, ungebundenen Oligonukleotide isoliert und analysiert, die in Folge der zu starken Methylierung nicht mehr als Bindestelle fungieren konnten. Nach Abtrennen des Proteins von der DNA (im Falle des ungebundenen Oligonukleotids war dieser Schritt nicht nötig) wurden die Oligonukleotide mit Piperidin an allen methylierten Guaninresten gespalten und auf einem 15%igen Sequenziergel analysiert.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis am kodierenden und nicht kodierenden Strang von Jun 1. In Abb. 18 ist die Analyse des kodierenden Stranges der Kollagenase AP-1 Bindungsstelle dargestellt. Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Bereiche der *in vivo* "Footprint"-Analyse und die *in vitro* geformten Komplexe montiert.

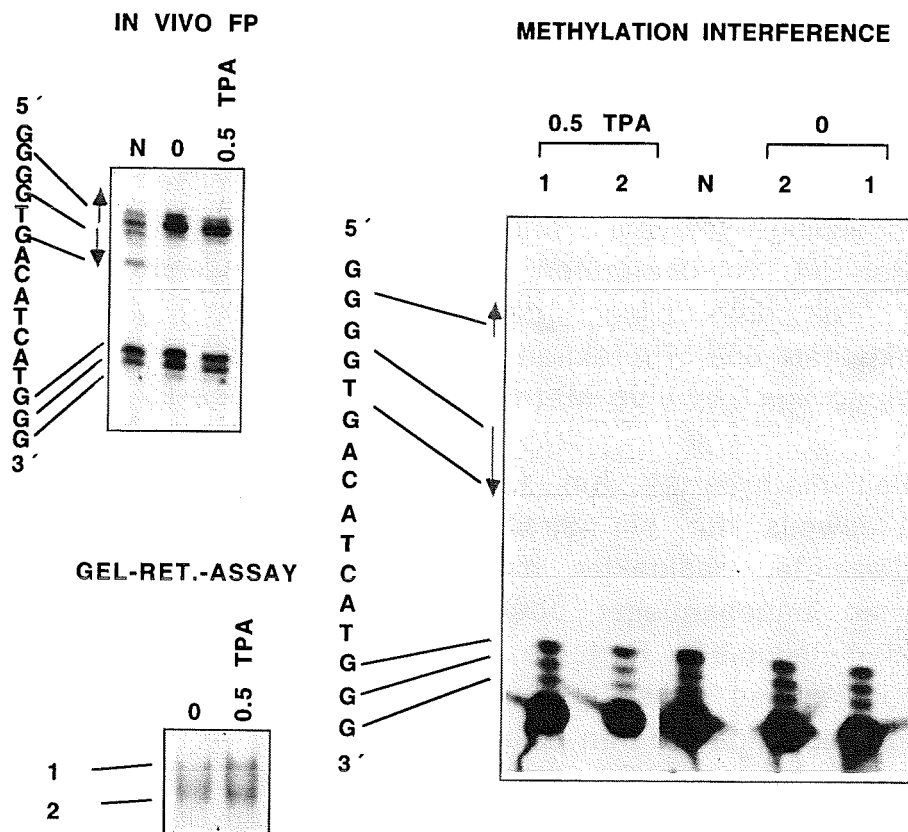
a**KODIERENDER STRANG**

Abb. 17 Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Proteinbindung an DNA des kodierenden und des nicht-kodierenden Stranges von Jun 1 mit Hilfe eines Methylation-Interference-Experimentes. Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen, die entweder unbehandelt (0) oder für 0.5h mit TPA (100ng/ml) stimuliert worden waren, wurde mit einem partiell methylierten Oligonukleotid (siehe Material und Methoden) inkubiert. Nach Auftrennung wurden die resultierenden Komplexe, die durch 1 und 2 markiert sind, sowie das ungebundene Oligonukleotid aus dem Gel geschnitten, gereinigt, mit Piperidin gespalten und gleiche Mengen an Radioaktivität auf einem 15%igen Sequenziergel aufgetrennt. Die Guaninleiter des kodierenden Stranges (proximaler Promotorbereich unten) sind in (a) und die der nicht-kodierenden Stränge (distaler Promotorbereich unten) sind in (b) gezeigt. N, ungebundene, ("nackte") DNA. Die Sequenzen der beiden AP-1 Bindestellen Jun 1 (-75/-60) und Jun 2 (-192/-181) sind angeschrieben. Abwärts zeigende Pfeile geben Protektionen und aufwärts zeigende Pfeile Hypersensitivitäten an.

Methylation Interference

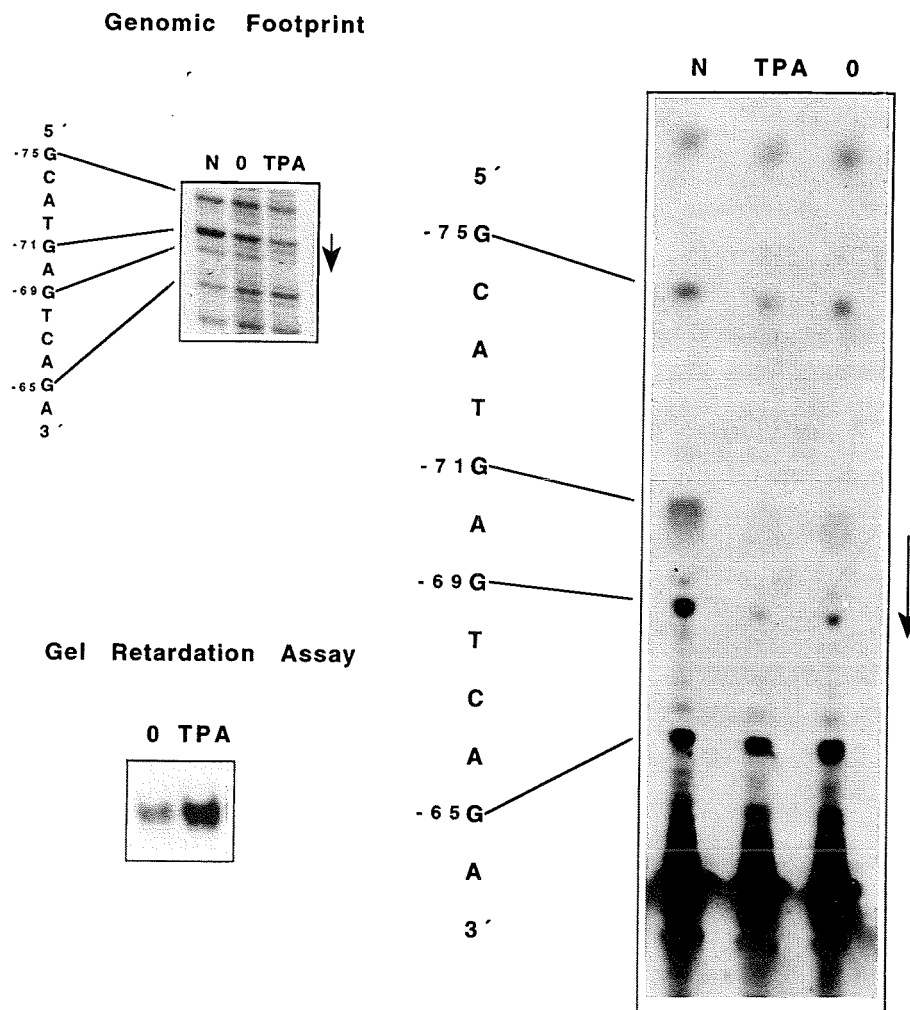


Abb. 18 Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Bindung an ein Oligonukleotid des kodierenden Stranges der AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors (Methylation Interference). Die weitere Beschreibung ist entsprechend der Abb. 17.

Auf dem kodierenden Strang von Jun 1 (linke Hälfte von Abb. 17) wird Guanin -74 hypersensitiv, während Guanin -72 und -70 protektiert ist. Dies stimmt völlig überein mit dem Ergebnis des genomischen "Footprint", d.h., Methylierung von Guanin -72 und -70 interferiert mit der Bindung an Jun 1. Sowohl die Bindung von Komplex 1 und 2 hinterläßt jeweils das gleiche Muster.

Analyse des nicht-kodierenden Stranges von Jun 1 bringt das gleiche Resultat: Die Guaninreste -65 und -68 werden protektiert und dies entspricht der *in vivo* Bindung. Die Interaktionen von Komplex 1 und 2 sind auch hier identisch. Ein Unterschied zwischen Kontrolle und TPA-induzierten Werten ist nicht feststellbar.

Wird der kodierende Strang der AP-1 Bindestelle des Kollagenase Promotors bei einem solchen Methylation-Interference-Experiment eingesetzt (Abb. 18), sind ebenfalls die gleichen Guaninreste wie im *in vivo* "Footprint"-Experiment protektiert. Guanin -71 und -69 sind schon in unbehandelten Zellen geschützt und diese Protektion verstärkt sich sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, nach Behandlung der Zellen mit TPA.

Mit diesen Ergebnissen konnte die Übereinstimmung der *in vivo* und *in vitro* Bindung an die Jun 1 und an die AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors nachgewiesen werden. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß die folgenden *in vitro* Bindungsstudien ein realistisches Bild der *in vivo* Bindung widerspiegeln.

Komplex 1 ist stabiler als Komplex 2

Komplex 1 (gebildet auf Jun 1 und Jun 2) und Komplex 2 (gebildet auf Jun 1 und der AP-1 Bindungsstelle des Kollagenase und t-Pa Promotors) sind die wahrscheinlichsten Kandidaten für Faktoren, die die frühe *c-jun* Expression *in vivo* regulieren. Jedoch können bei dem verwendeten Standard-Protokoll für *in vitro* Bindungsstudien, das eine relativ hohe Konzentration an radioaktiver Probe vorschreibt, auch Komplexe binden, die eine eher niedrige Affinität für die spezifische Bindungsstelle haben. Um die DNA Bindungs-Affinität daher direkter zu messen, wurde die "On-" und "Off-Rate" der Faktoren bestimmt, die Komplex 1 und Komplex 2 auf Jun 1 bilden.

Beim "On-Rate"-Experiment wurde schrittweise die Inkubationszeit des Proteinextraktes mit radioaktiv markierter DNA von Jun 1 verkürzt, um Unterschiede in der zeitlichen Ausbildung von Komplex 1 und 2 festzustellen. Jedoch waren bereits eine Minute nach Zugabe der radioaktiven Probe beide Komplexe schon vollständig ausgebildet (Daten nicht gezeigt). Beide Komplexe scheinen daher eine sehr ähnliche "On-Rate" zu haben.

Beim "Off-Rate"-Experiment (Abb. 19a) wird die Dissoziation der Komplexe von der Bindungsstelle bestimmt. Dazu wurde die radioaktiv markierte Probe von Jun 1 für 30 Minuten mit Proteinextrakt inkubiert, damit sich die Komplexe vollständig ausbilden können. Dann wurde ein 100-fach molarer Überschuß Probe, die nicht-radioaktiv markiert war, zugegeben und die Komplexbildung eine, zweieinhalb, fünf und zehn Minuten nach Zugabe des Kompetitors analysiert. Als Kontrolle wurden der Kompetitor und die radioaktive Probe gleichzeitig zum Proteinextrakt gegeben und 30 Minuten inkubiert. Verwendet wurde

Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen, die für drei Stunden mit TPA behandelt worden waren, damit maximale Mengen an Faktoren für die Bildung von Komplex 2 vorhanden sind (vergleiche Abb. 15).

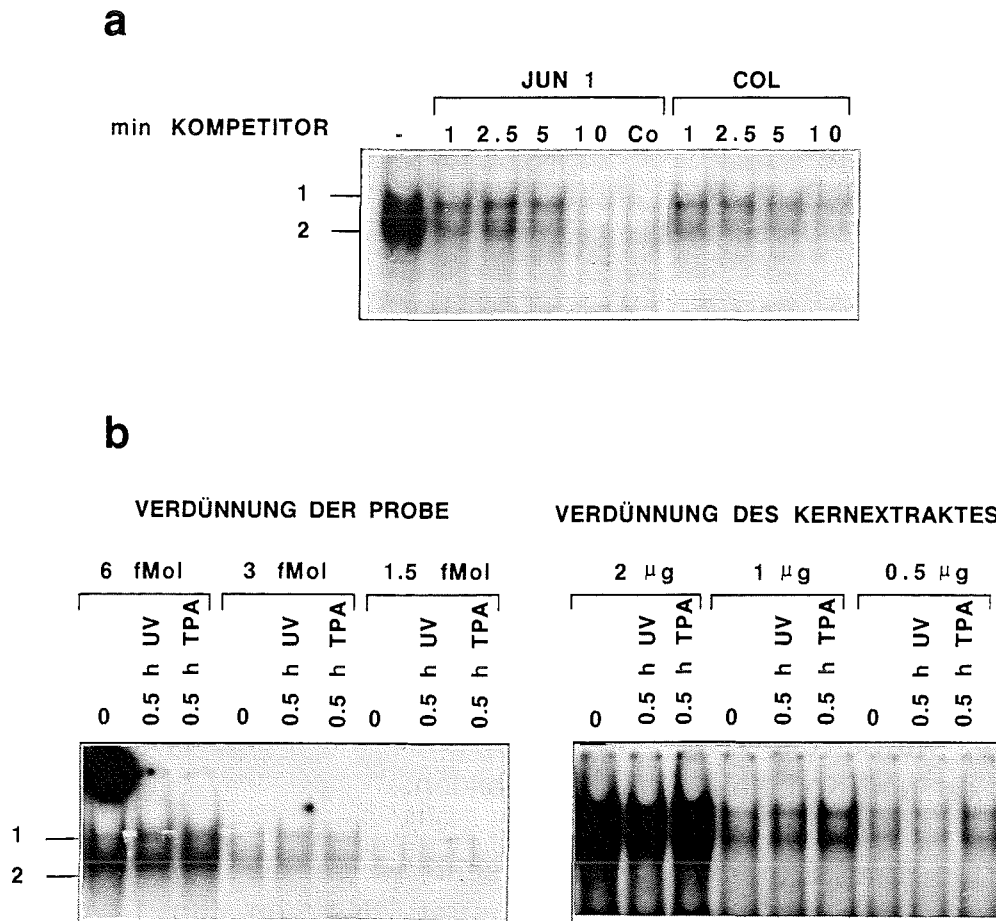


Abb. 19 Stabilität von Komplex 1 und 2. (a) Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen, die für 3h mit TPA (100ng/ml) behandelt worden waren, wurde für 30min mit radioaktiv markierter DNA der Jun 1 Bindungsstelle inkubiert. Dann wurde ein 100-fach molarer Überschuß nicht-radioaktiv markierter DNA der Jun 1 oder der Kollagenase AP-1 Sequenz zugegeben, wie oben an der Abbildung angeschrieben ist. Nach verschiedenen Zeitpunkten, die ebenfalls oben markiert sind (1, 1,5, 5 und 10min) wurden die Ansätze auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. In der ersten Bahn (-) ist die Komplexbildung in Abwesenheit eines Kompetitors gezeigt. Co: die radioaktiv markierte Probe und der Kompetitor wurden gleichzeitig zugegeben und für 30min inkubiert. (b) Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen, die entweder unbehandelt (O), oder für 0,5h mit TPA (100ng/ml) oder 30J/m² UV-Licht (254nm) behandelt worden waren, wurde im linken Teil der Abbildung mit der oben angegebenen Menge radioaktiv markierter Probe inkubiert. Im rechten Teil wurde die übliche Menge radioaktiv markierter Probe eingesetzt, aber der Proteinextrakt von der normalerweise verwendeten Menge von 2µg schrittweise verdünnt, wie oben an der Abbildung markiert. Die Auftrennung erfolgte über nicht-denaturierende Gele, Komplex 1 und 2 sind links an der Abbildung angeschrieben.

Eine Minute nach Zugabe des Jun 1 Kompetitors wird die Menge an Komplex 2 stark reduziert und ist nach fünf Minuten fast nicht mehr nachweisbar (vergleiche Spur 4 und 6). Dagegen ist die Menge an Komplex 1 nicht verringert. Erst nach zehn Minuten tritt eine effiziente Konkurrenz auf.

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Kreuz-Konkurrenz-Experimenten, unterdrückt die Probe der AP-1 Sequenz von Kollagenase sehr gut die Ausbildung von Komplex 2, erlaubt aber sogar nach zehn Minuten noch eine Bildung von Komplex 1.

Identische Ergebnisse wurden in "Off-Rate" Experimenten erhalten, in denen Proteinextrakt aus Kernen von nicht-induzierten HeLa-Zellen oder von HeLa-Zellen, die für 30 Minuten mit TPA behandelt worden waren, verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

Folglich dissoziiert der Großteil der Faktoren, die Komplex 2 ausbilden, sehr schnell, innerhalb von einer Minute von der DNA-Probe. Im Vergleich dazu dissoziieren die Faktoren, die Komplex 1 formen, langsamer, innerhalb von zehn Minuten, was eine deutlich höhere Affinität zur Bindungsstelle widerspiegelt.

Diese Interpretation ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vitro* Bindungsstudien, in denen Proteinextrakt aus Kernen nicht-induzierter HeLa-Zellen mit limitierten Mengen radioaktiv markierter Oligonukleotide inkubiert wurde (Abb. 19b, unten links, "Verdünnung der Probe"). Die üblicherweise verwendete Konzentration der radioaktiv markierten Probe war 25 fmol. Bei schrittweiser Verringerung dieser Konzentration ist die Ausbildung von Komplex 2 stärker reduziert als die von Komplex 1. Dies ist ein weiteres Argument für die höhere Affinität von Komplex 1 zu Jun 1.

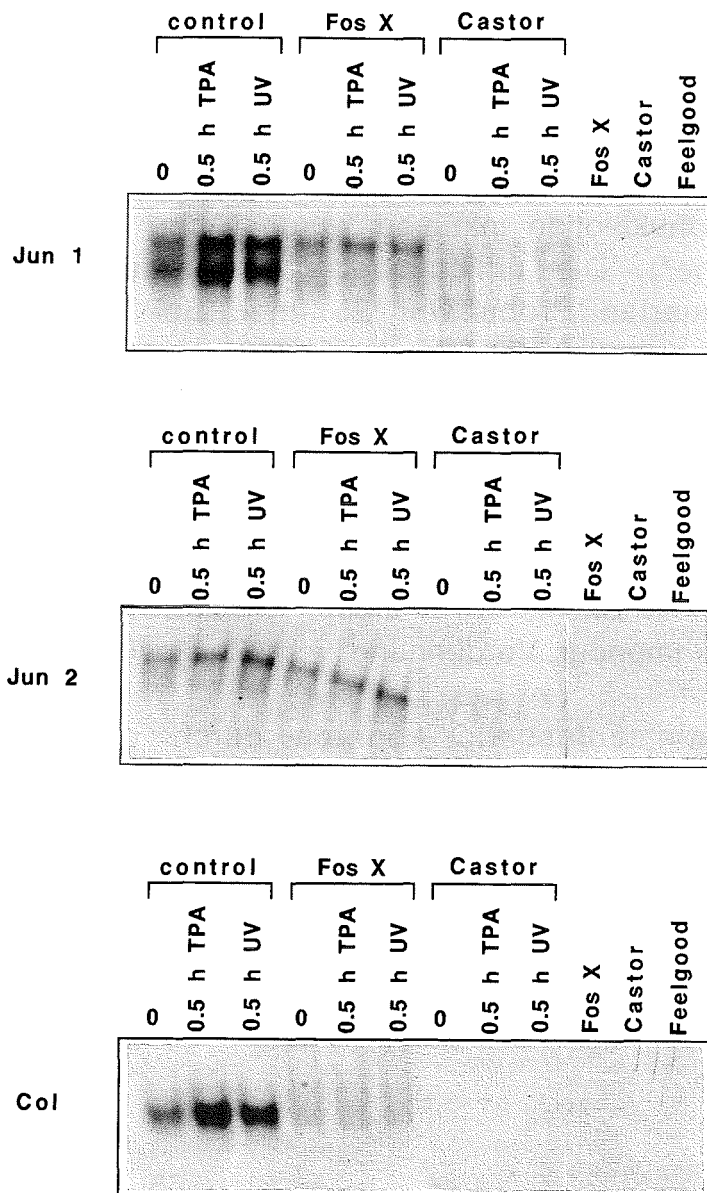
Bei Verdünnung des Proteinextrakts, aber gleichbleibender Konzentration der Probe (Abb. 19b, rechte Seite, "Verdünnung des Kernextrakts"), wird dieser Befund bestätigt: Komplex 2 nimmt bei zunehmender Verdünnung verhältnismäßig stärker ab als Komplex 1.

Zusammenfassend konnten durch diese *in vitro* Bindungsstudien mehrere Kernfaktoren identifiziert werden, die spezifisch mit Jun 1 (und Jun 2) in Wechselwirkung treten. Obwohl Proteine existieren, die *in vitro* zwei Komplexe auf Jun 1 bilden, macht es die Bestimmung der relativen Affinität der beiden Komplexe jedoch sehr wahrscheinlich, daß die Faktoren, die Komplex 1 an der Jun 1 und Jun 2 Sequenz ausbilden, für die Aktivität des *c-jun* Promotors *in vivo* verantwortlich sind.

Komplex 2 besteht vor allem aus Jun- und Fos-Proteinen, während Komplex 1 Jun- und ATF-2-Proteine enthält

Um die enge Verwandtschaft von Komplex 1, der an Jun 1 und Jun 2 bindet, direkt nachzuweisen und um zu sehen, welche Proteine an dieser Komplexbildung beteiligt sind, wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt, in denen Proteinextrakt mit spezifischen Antikörpern gegen Jun und Fos vorinkubiert wurde. Die Proteinextrakte stammten aus Kernen von HeLa-Zellen, die entweder unbehandelt, oder für 30 Minuten mit TPA oder UV-Licht stimuliert worden waren. In der Kontrolle wurde anstelle von Antikörper Prä-Immunsrum eingesetzt. Um sicherzustellen, daß die Antikörper nicht schon bereits ohne Proteinextrakt mit der radioaktiv markierten DNA zusammen Komplexe bilden, wurden Reaktionen angesetzt, in denen die Antikörper ohne Proteinextrakt mit der radioaktiven Probe inkubiert wurden.

Abb. 20 Jun und Fos nehmen an der Bildung von Komplex 1 und 2 teil. Proteinextrakt aus Kernen von unbehandelten (0) oder für 0,5h mit TPA (100ng/ml) oder 30J/m² UV-Licht (254nm) stimulierten HeLa-Zellen wurde mit Antikörpern gegen Fos (Fos X) und Jun (Castor) für 1h auf Eis vorinkubiert. Als Kontrolle wurde Prä-Immunsrum (control) verwendet. Danach wurde radioaktiv markierte DNA der Jun 1, Jun 2 oder Kollagenase AP-1 Sequenz zugegeben, wie links an der Abbildung angezeigt ist. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen auf nicht-denaturierenden Gelen aufgetrennt. Die Antikörper selbst verursachen in der Abwesenheit von Proteinextrakt keine Komplexe, wie in den jeweils drei letzten Bahnen gezeigt ist.



Die Bildung von Komplex 2 an Jun 1 und an der Kollagenase Sequenz wird durch einen polyklonalen Antikörper, der Mitglieder der Fos Protein-Familie erkennt (Fos X), vollständig gehemmt. Im Gegensatz dazu stört dieser Antikörper weder die Bildung von Komplex 1 an Jun 1, noch an Jun 2. Ein Jun-spezifischer Antikörper, der gegen die gesamte DNA-Bindedomäne von Jun gerichtet ist, (Castor), hemmt die Bindung von Jun/Jun oder Jun/Fos Dimeren an die Kollagenase Probe vollständig. Auch die Bildung von Komplex 2 an Jun 1 ist komplett aufgehoben. Die Menge an Komplex 1 ist sowohl an Jun 1, als auch an Jun 2 reduziert. In Abwesenheit von Proteinextrakt ist keine Komplexbildung sichtbar, was die Möglichkeit einer unspezifischen Interaktion zwischen Antikörper und radioaktiver DNA ausschließt.

Der t-Pa spezifische Komplex setzt sich wie der Kollagenase Komplex aus Fos und Jun Proteinen zusammen (Daten nicht gezeigt).

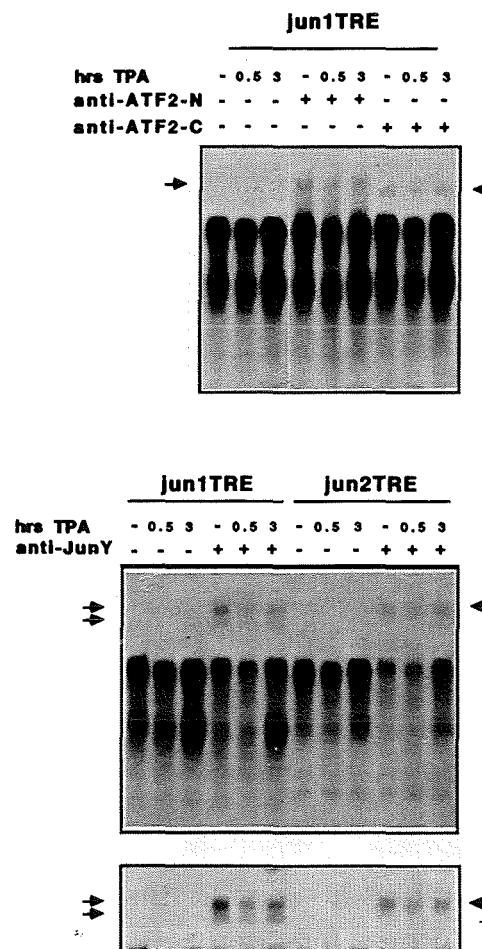
Komplex 1, der an Jun 1 und Jun 2 bindet, enthält demnach Jun, aber keine Fos Proteine. Komplex 2, der an Jun 1 und die AP-1 Bindungsstelle von Kollagenase und t-Pa bindet, setzt sich aus Jun und Fos Heterodimeren zusammen.

Vor kurzem wurde gezeigt, daß der *c-jun* Promotor durch das E1A Protein des Adenovirus induziert wird. Dabei spielt vor allem die Jun 2 Bindungsstelle eine große Rolle, die in E1A exprimierenden Zellen von Heterodimeren, die sich aus cJun und ATF-2 (oder einem ATF-2 verwandten Faktor) zusammensetzen, erkannt wird (van Dam et al., 1993). ATF-2 ist ein Mitglied der ATF/CREB Protein Familie. Um zu bestimmen, ob ATF-2 auch an Jun 1 bindet und ob diese Bindung ebenfalls in Zellen, die kein E1A exprimieren, zustande kommt, wurde eine *in vitro* Bindungsstudie durchgeführt, bei der zwei spezifische Antikörper, die entweder das N-terminale, oder das C-terminale Ende von ATF-2, erkennen, und ein Antikörper, der präferentiell cJun erkennt, eingesetzt wurden. Diese Antikörper wurden mit Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen, die entweder unbehandelt, oder für 30 Minuten und drei Stunden mit TPA behandelt worden waren, eine Stunde auf Eis vorinkubiert. Danach wurde radioaktiv markiertes Oligonukleotid der Jun 1 oder Jun 2 Bindungsstelle zugegeben und die Protein/DNA/Antikörper Mischung für 30 Minuten bei Raumtemperatur weiterinkubiert. Um die Protein/DNA- und eventuell vorhandene Protein/DNA/Antikörper-Komplexe ("Supershift"-Komplexe) sichtbar zu machen, erfolgte die Auftrennung hier in nativen 4%igen Gelen, die Tris-Glycin enthielten.

Die Anwesenheit von Jun Protein in Komplex 1 und 2 wird bestätigt

durch Verwendung des anti-Jun Y/Feelgood-Antikörpers (Abb. 21 unten). Vorinkubation der Extrakte mit diesem Antikörper ruft die Bildung zweier "Supershift"-Komplexe an Jun 1 hervor, die eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität haben. Einer von ihnen zeigt ein identisches Laufverhalten wie der "Supershift"-Komplex an Jun 2. Dies weist darauf hin, daß die Faktoren, die Komplex 1 an Jun 1 und Jun 2 formen, immunologisch verwandt sind. Da sich der schneller wandernde, "Supershift"-Komplex nicht an Jun 2 bildet (auch nicht nach langer Exposition des Röntgen-Films, am unteren Ende von Abb. 21), ist es sehr wahrscheinlich, daß er sich aus Antikörper/Fos/Jun/DNA zusammensetzt. Die Bildung eines einzelnen "Supershift"-Komplexes an Jun 2 wurde auch bei Verwendung eines weiteren cJun-spezifischen Antikörpers (Pep-2) beobachtet, der nur eine sehr geringe Affinität für

Abb. 21 cJun und ATF-2 sind in den Proteinkomplexen enthalten, die an Jun 1 und Jun 2 binden. Proteinextrakt aus Kernen von unbehandelten (0) oder für 0.5 und 3h mit TPA (100ng/ml) stimulierten HeLa-Zellen wurde mit Antikörpern gegen ATF-2 (anti-ATF2-N und anti-ATF2-C) und cJun (anti-JunY/Feelgood) für 1h auf Eis vorinkubiert. Als Kontrolle wurde Prä-Immunsersum verwendet. Danach wurde radioaktiv markierte DNA der Jun 1 oder Jun 2 AP-1 Sequenz zugegeben, wie oben an der Abbildung angezeigt ist. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen auf nicht-denaturierenden Gelen aufgetrennt. Die Antikörper selbst verursachen in der Abwesenheit von Proteinextrakt keine Komplexe (Daten nicht gezeigt). Die Pfeile markieren "Supershifts". Komplex 1 ist der langsamer, Komplex 2 der schneller wandernde Komplex.



andere Mitglieder der Jun-Familie (JunB und JunD) hat (Daten nicht gezeigt).

Ohne Proteinextrakt ist kein Komplex sichtbar, was die Möglichkeit ausschließt, daß das Erscheinen von "Supershift"-Komplexen auf die nicht-spezifische Interaktion zwischen Antikörper und DNA zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

Vorinkubation von Proteinextrakt mit Antikörpern gegen ATF-2, die entweder das N-terminale (anti-ATF2-N), oder das C-terminale (anti-ATF2-C) Ende erkennen, resultiert in der Bildung von "Supershift" Komplexen. Dies bedeutet, daß zumindest ein Teil der Faktoren, die Komplex 1 formen, cJun/ATF-2 Heterodimere sind (Abb. 21, oben). Die effiziente Bildung von "Supershift-Komplexen", die ATF-2 enthalten, wurde auch bei Verwendung des Jun 2 Oligonukleotids nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Bei der Verwendung von Extrakten aus nicht-induzierten oder TPA-behandelter Zellen treten keine signifikanten Unterschiede in der Menge der "Supershift"-Komplexe auf. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, daß während des Verlaufs der transkriptionellen Aktivierung und nachfolgender Repression des *c-jun* Promotors sich die Zusammensetzung der Faktoren, die an Jun 1 oder Jun 2 binden, nicht ändert.

Der Faktor FP bindet spezifisch und unabhängig von Jun 2 während der Induktion und nachgeschalteter Repression des *c-jun* Promotors

Die genauere Untersuchung des Faktors FP, der an den *c-jun* Promotor *in vivo* und *in vitro* bindet (Abb. 6, 12), ist aus verschiedenen Gründen von besonderem Interesse. Zum einen liegt seine Bindesequenz stromabwärts und direkt benachbart zu Jun 2, was auf eine gemeinsame Bindesequenz hinweisen könnte. Zum anderen unterstützt er die basale und stimulierte Transkription des *c-jun* Promotors (vergleiche Abb. 9e, 10). Deshalb soll hier die Frage nach der Spezifität der Bindung, der unabhängigen Bindung des Faktors FP von cJun/ATF-2, der Bindung während der Induktion und nachgeschalteter Repression des *c-jun* Promotors, sowie die Zusammensetzung des Komplexes FP geklärt werden.

In Abb. 22a ist zur Verdeutlichung die FP-Region zusammen mit der direkt benachbart liegenden Jun 2 Sequenz dargestellt. Markiert sind die *in vivo* und *in vitro* protektierten Guaninreste, sowie eine palindromische Struktur innerhalb der FP-Bindungsstelle.

Zur Klärung der spezifischen Bindung wurde ein Kreuz-Kompetitions-Experiment durchgeführt, zu dem Proteinextrakt aus unbehandelten HeLa-Zellen benutzt wurde. Dieser Extrakt wurde mit radioaktiv markierter DNA der Jun 2 oder FP Sequenz oder mit DNA, die beide Sequenzen zusammen enthält (Jun 2 + FP), inkubiert, wobei ein 100-fach molarer Überschuß nicht-radioaktiv markierter Probe von

wurde. Ein molarer Überschuß nicht-radioaktiv markierten Kompetitors, der im oberen Teil der Abbildung zu sehen ist, wurde gleichzeitig zugegeben und die Proteinkomplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt. Die für Jun 2 oder FP spezifischen Komplexe sind auf der linken Seite der Abbildung markiert. (c) FP bindet spezifisch und unabhängig von Jun 2 und die Bindung verändert sich während der Induktion und nachgeschalteter Repression des *c-jun* Promotors nicht. Proteinextrakt aus HeLa-Zellen, die entweder unbehandelt (O), oder für 1, 3, 6 und 24h mit 30J/m² UV-Licht (254nm) oder TPA (100ng/ml) stimuliert worden waren, wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die die Jun 2 und FP Sequenz zusammen enthalten, aber bei denen entweder die FP-Sequenz (Jun 2 + mFP) oder die Jun 2-Sequenz (FP + mJun 2) mutiert ist, inkubiert und die Reaktionen auf nativen Gelen aufgetrennt. Die resultierenden Komplexe sind rechts und links, die verwendeten radioaktiv-markierten Oligonukleotide oben an der Abbildung angegeben.

entweder der Jun 2, FP oder der Jun 2 + FP Sequenz zugegeben wurde (Abb. 22b). In der Kontrolle wurde kein Kompetitor verwendet. Mit radioaktiv markierter DNA, die sowohl die Jun 2, als auch die FP Sequenz enthält (Jun 2 + FP) bilden sich zwei Komplexe. Der obere Komplex zeigt das gleiche Laufverhalten wie die Bande, die für Jun 2 spezifisch ist. Der schneller wandernde Komplex ist identisch mit der Bande, die sich auf der FP Sequenz bildet. Competition mit Jun 2 bewirkt eine starke Verringerung des langsamer wandernden Komplexes, der sowohl an Jun 2, als auch an Jun 2 + FP bindet. Der untere Komplex wird nicht beeinflusst, weder an der FP, noch an der Jun 2 + FP DNA. Umgekehrt kompetiert FP effizient den unteren Komplex, sowohl auf der FP-, als auch auf der Jun 2 + FP-DNA, wobei der obere, Jun 2-spezifische Komplex vollständig intakt bleibt. Im Gegensatz dazu wird die Bildung aller Komplexe durch nicht-markierte DNA, die die Jun 2 + FP Sequenz enthält, aufgehoben. Dies bedeutet, daß der schneller wandernde Komplex spezifisch und unabhängig von Jun 2 mit der FP-Sequenz interagiert.

Da sich an der DNA, die sowohl die FP, als auch die Jun 2 Sequenz enthält (Jun 2 + FP) nur zwei und nicht drei Komplexe ausbilden, weist dies darauf hin, daß jeweils nur einer der beiden Faktoren binden kann. Der Grund könnte eine Überlappung der Bindestellen sein. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Konzentration des Proteinextraktes zu gering ist und deshalb Fragmente, die von beiden Komplexen gebunden sind, unter der Nachweisgrenze liegen.

Diese spezifische und unabhängige Bindung an der Jun 2 und FP Sequenz wurde noch durch einen anderen, experimentellen Ansatz bestätigt (Abb. 22c). Proteinextrakt aus Kernen von HeLa-Zellen, die eine, drei, sechs und 24 Stunden mit TPA oder UV-Licht induziert worden waren, wurde mit radioaktiv-markierter DNA, die sowohl die Jun 2, als auch die FP-Sequenz enthielt, inkubiert. Allerdings war bei dieser DNA entweder die

FP-Bindestelle (Jun 2 + mFP), oder die Jun 2-Bindestelle (FP + mJun 2), mutiert. Die Mutationen waren dabei an denjenigen Nukleotiden gesetzt, die durch *in vivo* "Footprint"-Analysen als Kontaktstellen identifiziert wurden.

Wie erwartet, bildet sich bei Mutation der FP-Sequenz (Jun 2 + FP) nur die obere, Jun 2-spezifische Bande und bei Mutation der Jun 2-Sequenz nur die untere, FP-spezifische Bande. Innerhalb der Kinetik ergibt sich weder eine Änderung des Laufverhaltens, noch eine signifikante Schwankung in der Menge der beiden Komplexe. Hiermit wird bestätigt, daß FP ein spezifisch und unabhängig von der Jun 2 Sequenz bindender Faktor ist, der vor, und während der Induktion, als auch im Verlauf der nachgeschalteten Repression von *c-jun* am Promotor gebunden bleibt. Die Menge des gebundenen Faktors FP zeigt nach UV-Licht oder TPA keine signifikanten Schwankungen und ist nicht induzierbar.

Frühere Daten weisen darauf hin, daß die Expression eines *c-jun* Promotor CAT Konstruktes durch Fos Proteine reprimiert wird - allerdings nur, solange die Jun 2 und FP-Bindungsstelle im Minimalpromotorkonstrukt enthalten ist. Bei der Deletionsmutante -167/+170, die diese Sequenzen nicht mehr enthält, hat Fos keinen reprimierenden Einfluß (Park und Schönthal, unveröffentlichte Daten). Deshalb erscheint es möglich, daß Fos Proteine mit der Bindestelle des Faktors FP interagieren.

Um die Frage der Zusammensetzung des FP-Komplexes anzugehen, wurde getestet, ob Jun und Fos Proteine mögliche Kandidaten sind. Dazu wurde in einem Gelretardations-Experiment Proteinextrakt aus HeLa-Zellen, die entweder unbehandelt, oder für eine, drei, sechs und 24 Stunden mit UV-Licht oder TPA stimuliert worden waren, mit polyklonalen Antikörpern gegen Fos (Fos X) oder Jun (Castor) eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde radioaktiv-markierte DNA zugegeben, die die Sequenz von Jun 2 und FP (Jun 2 + FP) enthielt und, nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die resultierenden Komplexe auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Bei der Kontrolle wurden die Extrakte statt mit Antikörpern mit Prä-Immunsereum vorinkubiert.

Weder ein spezifischer Antikörper gegen Fos (FosX), noch ein spezifischer Antikörper gegen Jun (Castor) stört die Bildung des FP-Komplexes (Abb. 23). FP kann daher keine Fos und Jun Proteine enthalten.

Im Gegensatz dazu verhindert der Jun-Antikörper die Bildung des Jun 2-Komplexes, weil dieser, im Vergleich zur Kontrolle, fast vollständig

aufgehoben ist. Bei der noch vorhandenen Bindung an Jun 2 handelt es sich wahrscheinlich um ATF-2 Homodimere oder ATF-2-ähnliche Proteine (van Dam et al., 1993; Herr et al., 1994).

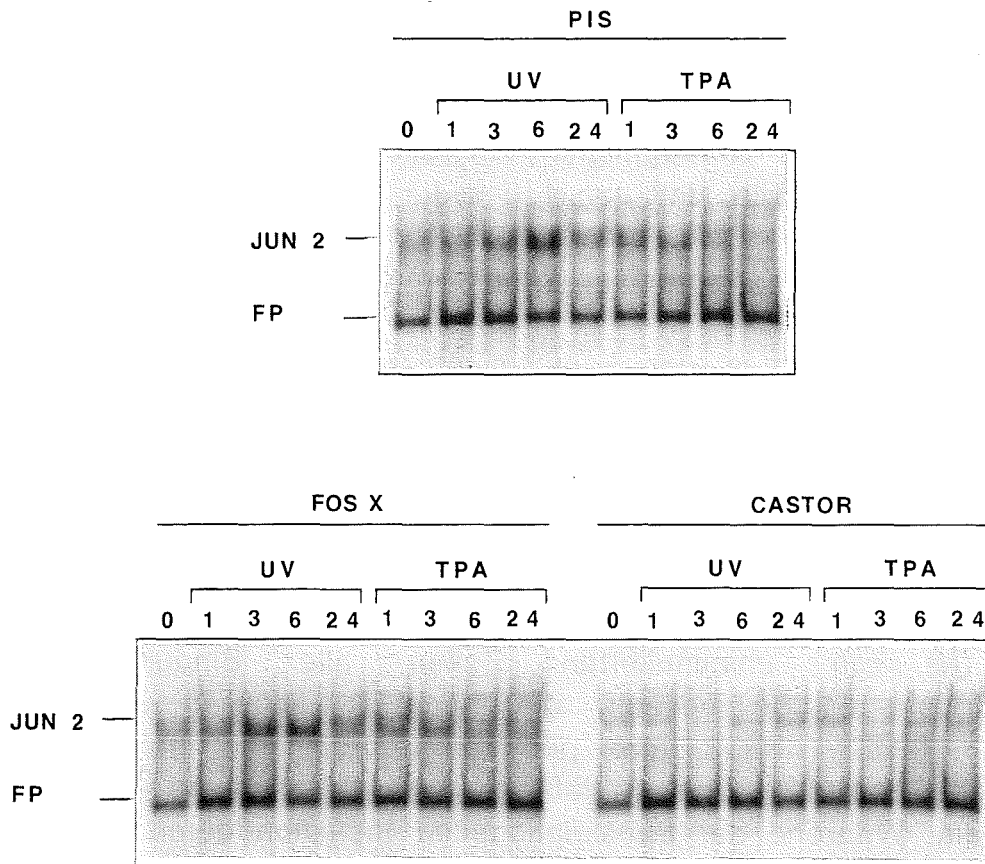


Abb. 23 Jun und Fos nehmen an der Bildung des FP-Komplexes nicht teil. Proteinextrakt aus Kernen von unbehandelten (0) oder für 1, 3, 6 und 24h mit TPA (100ng/ml) oder 30J/m² UV-Licht (254nm) stimulierten HeLa-Zellen wurde mit Antikörpern gegen Fos (FOS X) und Jun (CASTOR) für 1h auf Eis vorinkubiert. Als Kontrolle wurde Prä-Immunsrum (PIS) verwendet. Danach wurde radioaktiv markierte DNA der Jun 2 + FP Sequenz zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen auf nicht-denaturierenden Gelen aufgetrennt. Die Antikörper selbst verursachen in der Abwesenheit von Proteinextrakt keine Komplexe (Daten nicht gezeigt).

V. Die *in vivo* Proteinbesetzung des *c-jun* Promotors ändert sich nicht nach Transformation von Zellen mit Adenovirus

Zellen, die mit Adenovirus transformiert wurden, zeigen eine hohe basale *c-jun* Transkriptionsrate, während der Kollagenase Promotor vollständig reprimiert ist (van Dam et al., 1990; Hagemeyer et al., 1993). Dieser Zustand wird von dem E1A Protein des Adenovirus bewirkt, das auch die Transformation auslöst. Dabei ist nicht klar, ob E1A direkt oder indirekt in die Genregulation eingreift. Die Analyse von Promotor-CAT Konstrukten zeigte, daß Jun 1 und Jun 2 für die Induktion des *c-jun* Promotors durch E1A verantwortlich ist, während die AP-1 Bindungsstelle im Kollagenase Promotor dessen Repression vermittelt (Hagemeyer et al., 1993).

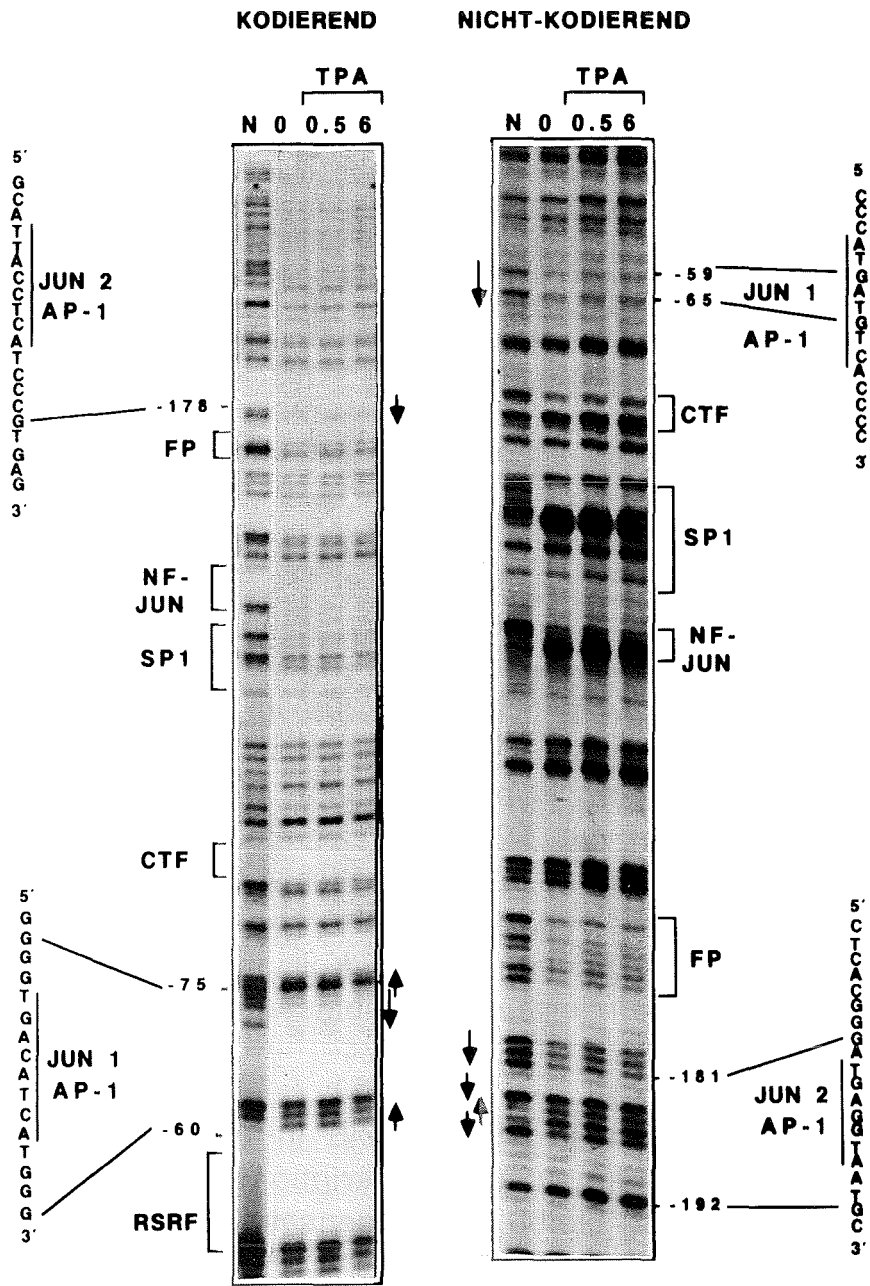
Um den Mechanismus der konstitutiven *c-jun* Expression, bzw. die Repression des Kollagenase Promotors aufzuklären, wurde die DNA Bindung an beiden Promotoren unter physiologischen Bedingungen in Anwesenheit von E1A durch *in vivo* "Footprint"-Analysen untersucht.

Am kodierenden und nicht-kodierenden Strang des *c-jun* Promotors aus 293-Zellen, die E1A exprimieren, sind im Vergleich zur proteinfreien DNA (N), in unstimulierten Zellen alle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besetzt, die auch in anderen Zell-Linien wie GM637, HeLa, NIH3T3 und primären Fibroblasten gefunden wurden (vergleiche Abb. 12). Dies schließt die völlige Besetzung von Jun 1 und Jun 2 ein. Während der transkriptionellen Induktion durch TPA innerhalb von 30 Minuten und dem transkriptionellen Abschalten nach sechs Stunden, verändert sich dieses Muster in keiner der untersuchten Zell-Linien. Ein identisches Bild ergibt sich beim Vergleich von primären embryonalen Retinoblasten (HER) und davon abgeleiteter Adenovirus-transformierter Zelllinien (HER-Ad) (Hagemeyer et al., 1993).

Für die *in vivo* "Footprint"-Analysen der AP-1 Bindungsstelle des kodierenden und des nicht-kodierenden Stranges des Kollagenase-Promotors wurden 293-Zellen und als Vergleich GM637 und CRL1497, zwei menschliche Fibroblasten Zelllinien, die kein E1A Protein exprimieren, verwendet (Abb. 24b). Guanin -71 des kodierenden Stranges ist in unbehandelten und für drei Stunden mit TPA behandelten GM637-Zellen, also zu einem Zeitpunkt, zu der die Transkriptionsrate des Kollagenase-Gens maximal ist (König et al., 1992), stark protektiert. Guanin -65 desselben Stranges ist in der Kontrolle protektiert, allerdings verschwindet diese Protektion nach TPA-Stimulation, d.h., im Vergleich zur Kontrolle, wird dieses Guanin hypersensitiv. Guanin -67 des nicht-kodierenden Stranges aus CRL CRL1497-

a

293



b

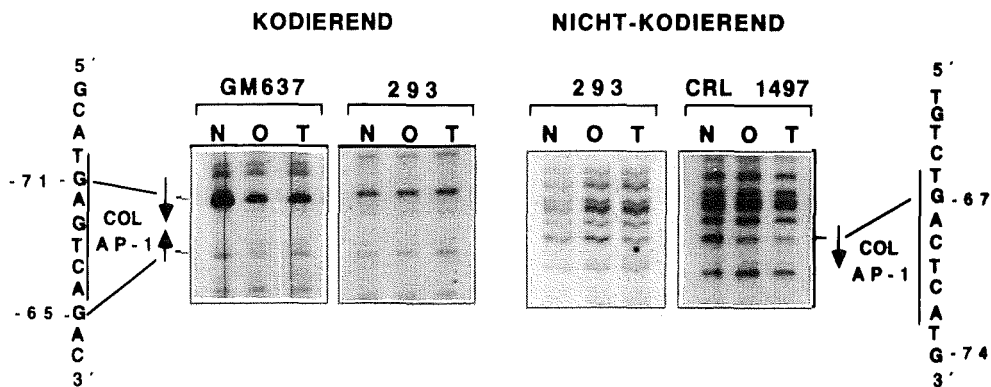


Abb. 24 *In vivo* Proteinbindung an den *c-jun* Promotor, sowie an die AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors aus 293-Zellen, die E1A exprimieren. (a) Genomische DMS-"Footprint"-Analysen des *c-jun* Promotors. 293-Zellen wurden mit TPA (100ng/ml) behandelt und nach 0, 0.5 und 6h wurde die *in vivo* Proteinbindung bestimmt. Die Guaninleitern des kodierenden und nicht-kodierenden Stranges sind gezeigt. N, *in vitro* methylierte, Protein-freie ("nackte") DNA; die markierten Regionen repräsentieren Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren RSRF; CTF; Sp1; NF-Jun; FP. Die Sequenzen der beiden AP-1 Bindestellen Jun 1 (-75/-60) und Jun 2 (-192/-181) sind angeschrieben. Abwärts zeigende Pfeile geben Protektionen und aufwärts zeigende Pfeile Hypersensitivitäten an. (b) Genomische DMS-"Footprint"-Analysen der AP-1 Sequenz des kodierenden und nicht kodierenden Stranges des Kollagenase Promotors. Die Proteinbindung an den Kollagenase Promotor aus 293, GM637 und CRL 1497 Zellen wurde im uninduzierten Zustand oder nach 3-stündiger Induktion mit TPA (100ng/ml) gemessen. Die weiteren Bezeichnungen wurden schon in a. beschrieben.

Zellen ist in der Kontrolle schon geschützt und nach TPA verstärkt sich diese Protektion.

An die AP-1 Bindungsstelle des Kollagenase Promotors aus Zellen, die E1A nicht exprimieren, binden Proteine, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Heterodimere handelt, die sich aus Fos und Jun zusammensetzen (vergleiche Abb. 20). Im Gegensatz dazu läßt sich an der AP-1 Bindungsstelle des Kollagenase Promotors in 293 Zellen weder Protektion, noch Hypersensitivität beobachten. Auch durch Behandlung der Zellen mit TPA läßt sich keine Bindung an der AP-1 Sequenz des kodierenden und des nicht-kodierenden Stranges des Kollagenase Promotors in Gegenwart von E1A induzieren. Diese Hemmung der Fos/Jun Bindung an den Kollagenase Promotor ist auch in den Adenovirus-tranformierten Retinoblasten-Zelllinien zu beobachten (Hagmeyer et al., 1993).

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß in Adenovirus transformierten 293-Zellen die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den *c-jun* Promotor unbeeinflusst bleibt. In Gegensatz dazu verhindert E1A in diesen Zellen die Bindung von Jun/Jun und Jun/Fos Dimeren an die AP-1 Sequenz des Kollagenase Promotors, obwohl solche Dimere in der Zelle vorliegen (Offringa et al., 1990) und verursacht dadurch die Repression. Dagegen werden AP-1 Heterodimere, die an den *c-jun* Promotor binden, nicht inhibiert. Der Grund dafür könnte die Zusammensetzung des *c-jun* spezifischen AP-1 Komplexes aus Jun und ATF-2 Heterodimeren sein. Da E1A die Transaktivierungsaktivität von cJun und ATF-2 verstärkt (Hagmeyer et al., 1993; Livingstone et al., 1994), und die *c-jun* Transkriptionsrate durch E1A stark erhöht wird (van Dam et al., 1990), erscheint die Regulation des *c-jun* Promotors durch eine Kombination des AP-1 Faktors aus cJun/ATF-2 Heterodimeren sehr wahrscheinlich.

VI. Die Besetzung von Jun 1 und Jun 2 unter zellulären Bedingungen, in denen cJun Protein fehlt

Zur Aktivierung des *c-jun* Promotors nach Behandlung von Zellen mit UV-Licht, TPA, oder unter dem Einfluß des E1A Proteins von Adenovirus sind Jun/ATF-2 Heterodimere notwendig, die ständig an Jun 1 und Jun 2 gebunden sind. Undifferenzierte F9-Zellen exprimieren kein Jun Protein (siehe Abb. 26b und Yang Yeng et al., 1990). Trotzdem kann der *c-jun* Promotor in diesen Zellen durch UV-Licht, nicht jedoch durch TPA, über Jun 1 und Jun 2 aktiviert werden (van Dam et al., 1994). Da diese Aktivierung nach UV-Licht nicht wie in anderen Zelllinien über cJun/ATF-2 Heterodimere erfolgen kann, wurde die Bindungssituation am kodierenden und nicht-kodierenden Strang des *c-jun* Promotors aus undifferenzierten F9-Zellen, die kein Jun Protein exprimieren, analysiert. Dazu wurden entweder unbehandelte, oder für 30 Minuten, drei und sechs Stunden mit TPA oder UV-Licht stimulierte F9-Zellen verwendet.

Das Ergebnis resultiert in einer vollständigen Besetzung aller Bindungsstellen des nicht exprimierten *c-jun* Promotors (unbehandelte und TPA-behandelte Zellen) in undifferenzierten F9-Zellen (Abb. 25). Das Muster der DNA-Protein Kontakte ändert sich weder während der transkriptionellen Aktivierung (30 Minuten nach UV), noch bei der nachfolgenden Repression (drei und sechs Stunden nach UV).

Im Gegensatz zu Jun, sind ATF-2 Proteine in undifferenzierten F9-Zellen vorhanden. Da ATF-2 außerdem als Homodimer *in vitro* an Jun 2 binden kann, erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die Protektionen an Jun 1 und Jun 2 von Komplexen verursacht werden, die ATF-2 Homodimere, oder ATF-2 und andere, bis jetzt unbekannte Faktoren enthalten und die die Induktion des *c-jun* Promotors nach UV-Licht, nicht jedoch nach TPA vermitteln (van Dam et al., 1994).

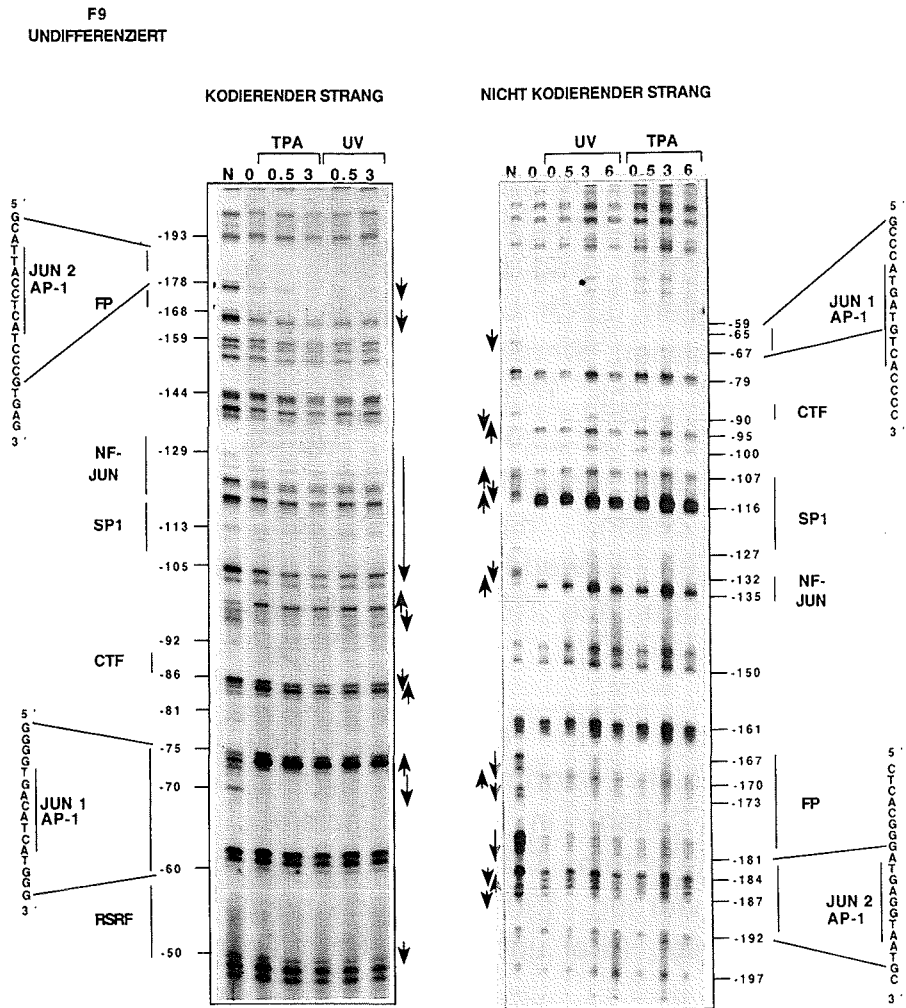


Abb. 25 *In vivo* Proteinbindung an den kodierenden und nicht-kodierenden Strang des *c-jun* Promotors aus undifferenzierten F9-Zellen. F9-Zellen wurden mit TPA (100ng/ml) oder 30J/m² UV-Licht (254nm) behandelt und nach 0, 0.5, 3 und 6h wurde die *in vivo* Proteinbindung bestimmt. Vergleiche weiter Abb. 12.

VII. Vor und nach der Differenzierung von F9- und HL60-Zellen ändert sich die *in vivo* Proteinbesetzung des *c-jun* Promotors nicht

cJun spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und seine Transkription wird bei diesem Vorgang induziert (Abb. 26b; Yang-Yen et al., 1990; Auer et al., 1994). Ein System, um Differenzierung zu studieren, sind wiederum F9-Zellen. F9-Zellen können durch Behandlung mit Retinsäure differenziert werden, was unter anderem eine Induktion und konstitutive Expression des *c-jun* Promotors zur Folge hat

(Abb. 26b und Yang-Yen et al., 1990).

Um zu überprüfen, ob sich während der Differenzierung von F9-Zellen an der *in vivo* Bindungssituation von Jun 1 und Jun 2 Änderungen ergeben, wurden genomische "Footprint"-Analysen am *c-jun* Promotor aus F9-Zellen vor, im Verlauf und zum Zeitpunkt der vollständigen Differenzierung durchgeführt.

Zur terminalen Differenzierung wurden F9 Zellen fünf Tage lang mit Retinsäure im Medium kultiviert.

Während die undifferenzierten Zellen rosettenartig aneinanderhängen und schnell wachsen, zeigt der differenzierte Phänotyp mehr vereinzelte und Endoderm-ähnliche Zellen, die sich wesentlich langsamer teilen (Abb. 26a).

Ein Northern-Blot-Experiment belegt die fehlende Transkription von *c-jun* in undifferenzierten Zellen und die einsetzende, konstitutive Transkription im Verlauf und zum Zeitpunkt der vollständigen Differenzierung.

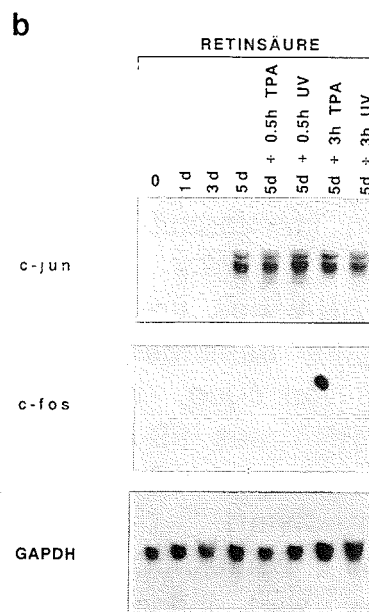
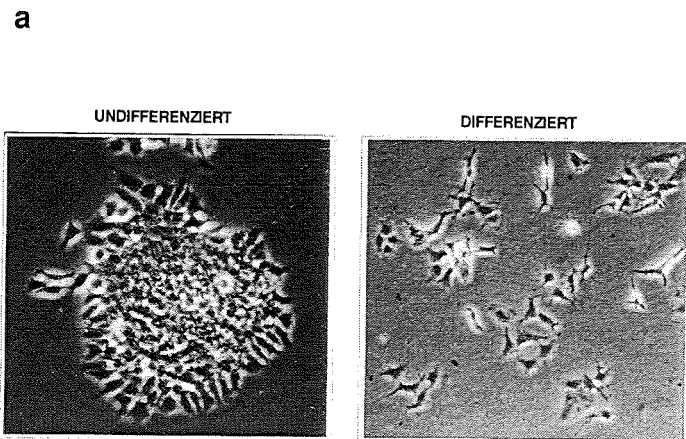
Gesamtzell-RNA aus undifferenzierten und für ein, drei und fünf Tage mit Retinsäure behandelten F9-Zellen wurde mit radioaktiv markierten DNA-Proben von *c-jun*, *c-fos* und GAPDH hybridisiert. Außerdem wurde Gesamtzell-RNA aus F9-Zellen, die an Tag fünf der Differenzierung für 30 Minuten oder drei Stunden mit TPA oder UV-Licht stimuliert worden waren, hybridisiert.

Eine *c-jun* Transkription ist in undifferenzierten Zellen nicht nachweisbar, wird jedoch schon ein Tag nach Retinsäurebehandlung sichtbar (Abb. 26b). Maximale Werte werden nach fünf Tagen erreicht, die sich nicht weiter durch UV-Licht oder TPA steigern lassen.

c-fos Transkripte sind weder in undifferenzierten F9-Zellen, noch fünf Tage nach Retinsäurebehandlung nachzuweisen. Allerdings kann die *c-fos* Expression in differenzierten F9-Zellen (Tag fünf) 30 Minuten nach UV-Licht und TPA stimuliert werden. Insgesamt ist die Expression des *c-fos* Gens während der Differenzierung aber viel schwächer als die des *c-jun* Gens, da der Film viermal solange exponiert wurde und trotzdem schwächere Banden zeigt. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von Yang-Yen et al., 1990 überein, die vor und nach der Differenzierung von F9-Zellen keine *c-fos* Transkripte nachweisen konnten. Die GAPDH mRNA-Mengen bleiben unter diesen Bedingungen konstant.

Da sich am Tag fünf nach der Zugabe von Retinsäure ins Medium sowohl der Phänotyp verändert, als auch die *c-jun* mRNA-Menge stark angewachsen war, kann auf eine Differenzierung der F9-Zellen zu

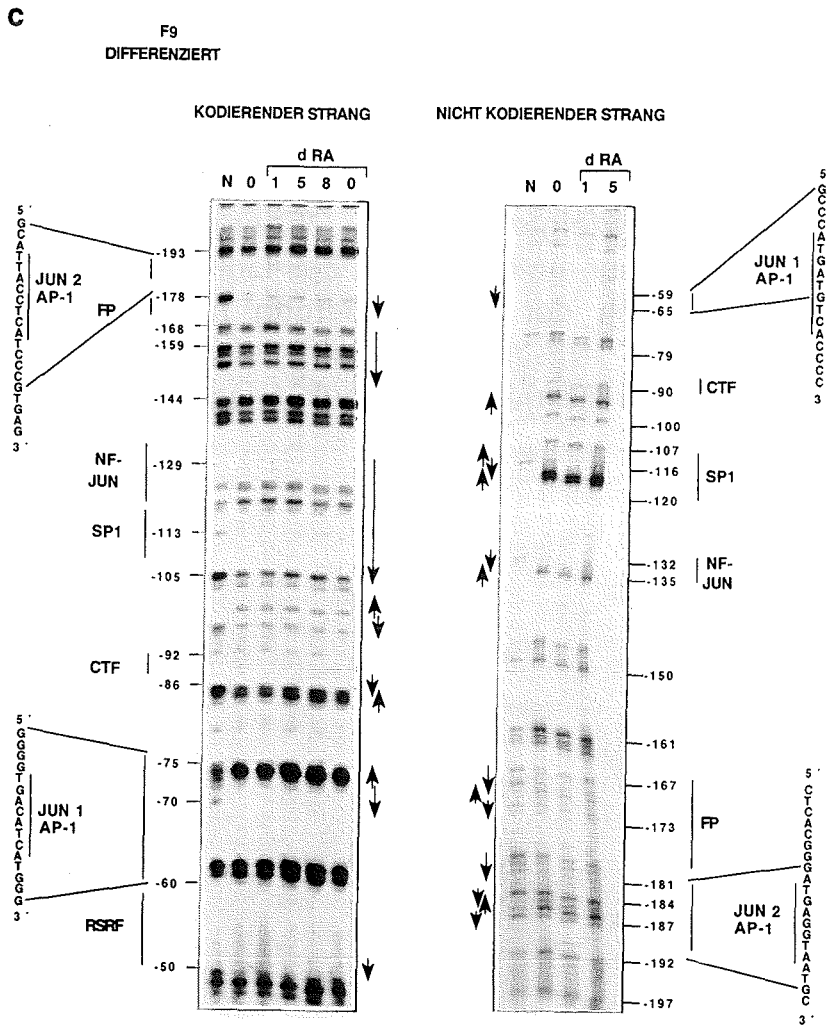
Abb. 26 F9-Zellen vor und nach der Differenzierung. (a) $5 \times 10^{-7}M$ Retinsäure wurde für 5d ins Medium gegeben, was zu einer vollständigen Veränderung des Phänotyps führt. (b) Zeitlicher Verlauf der *c-jun* Induktion durch Retinsäure in F9-Zellen. Gesamtzell-RNA aus F9-Zellen, die 1, 3 und 5d mit Retinsäure ($5 \times 10^{-7}M$) behandelt worden waren und an Tag 5 der Differenzierung zusätzlich 0.5 und 3h mit TPA (100ng/ml) und $30J/m^2$ UV-Licht (254nm) stimuliert worden waren, wurde durch ein Northern Blot Experiment überprüft. Dazu wurden spezifische und radioaktiv markierte Proben der Maus *c-jun*, *c-fos* und GAPDH Gene (beschrieben in Auer et al., 1994) mit der Gesamtzell-RNA hybridisiert. (c) *In vivo* Proteinbindung an den kodierenden und nicht-kodierenden Strang des *c-jun* Promotors aus undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen. F9-Zellen wurden für 1, 5 und 8d mit Retinsäure ($5 \times 10^{-7}M$) im Medium differenziert und die Proteinbindung *in vivo* am *c-jun* Promotor bestimmt. 0 steht für undifferenzierte F9-Zellen, die keine Retinsäure im Medium hatten. Weitere Beschreibung wie in Abb. 12.



diesem Zeitpunkt geschlossen werden.

Deshalb wurden für die folgenden genomischen "Footprint"-Experimente am *c-jun* Promotor F9-Zellen verwendet, die entweder undifferenziert waren, oder für einen, fünf und acht Tage mit Retinsäure behandelt worden waren. Untersucht wurde sowohl der kodierende, als auch der nicht-kodierende Strang.

Es zeigt sich während aller Zeitpunkte die schon beschriebene Proteinarchitektur, die sich auch während der Differenzierung, die mit der transkriptionellen Aktivierung des *c-jun* Promotors einhergeht, nicht ändert (Abb. 26c).



Ein ähnliches System, bei dem Differenzierung und damit die Expression von *c-jun* induzierbar ist, stellen menschliche, myeloide Leukämie-Zellen (HL60) dar. TPA-Behandlung führt zu deren Differenzierung und während dieses Vorganges kommt es zur Induktion vieler Gene, was die gesteigerte Expression von *c-fos* und *c-jun* einschließt (Müller et al., 1985; Sherman et al., 1990). Durch welchen Mechanismus diese gesteigerte *c-jun* Expression bewirkt wird, ist noch vollständig unbekannt. Um mögliche Veränderungen am Promotor von *c-jun* vor, während und nach der Differenzierung zu erkennen, die dessen Aktivierung bewirken könnten, wurden HL60-Zellen durch Zugabe von TPA ins Medium für 48 Stunden differenziert.

Nach der Differenzierung ist der Phänotyp von promyeloiden HL60-Zellen verändert (Abb. 27a). Während undifferenzierte Zellen klein und rund sind und in Suspension wachsen, setzen sich die Zellen nach Differenzierung am Boden der Petrischale ab, strecken sich aus und nehmen das morphologische Aussehen von Makrophagen an.

Das *in vivo* "Footprint"-Experiment in Abb. 27b stellt die Proteinbesetzung des kodierenden Stranges des *c-jun* Promotors in undifferenzierten und differenzierten HL60-Zellen dar. Im Vergleich zur proteinfreien DNA treten viele Protektionen und Hypersensitivitäten auf, die dem schon gezeigten *in vivo* "Footprint"-Muster am *c-jun* Promotor aus allen bisher untersuchten Zell-Linien entsprechen. Dieses Muster ändert sich nach der Differenzierung nicht. Dies schließt die Bindung des Faktors NF-Jun mit ein, dessen Expression auf undifferenzierte und proliferierende Leukämiezellen beschränkt sein soll (Brach et al., 1992).

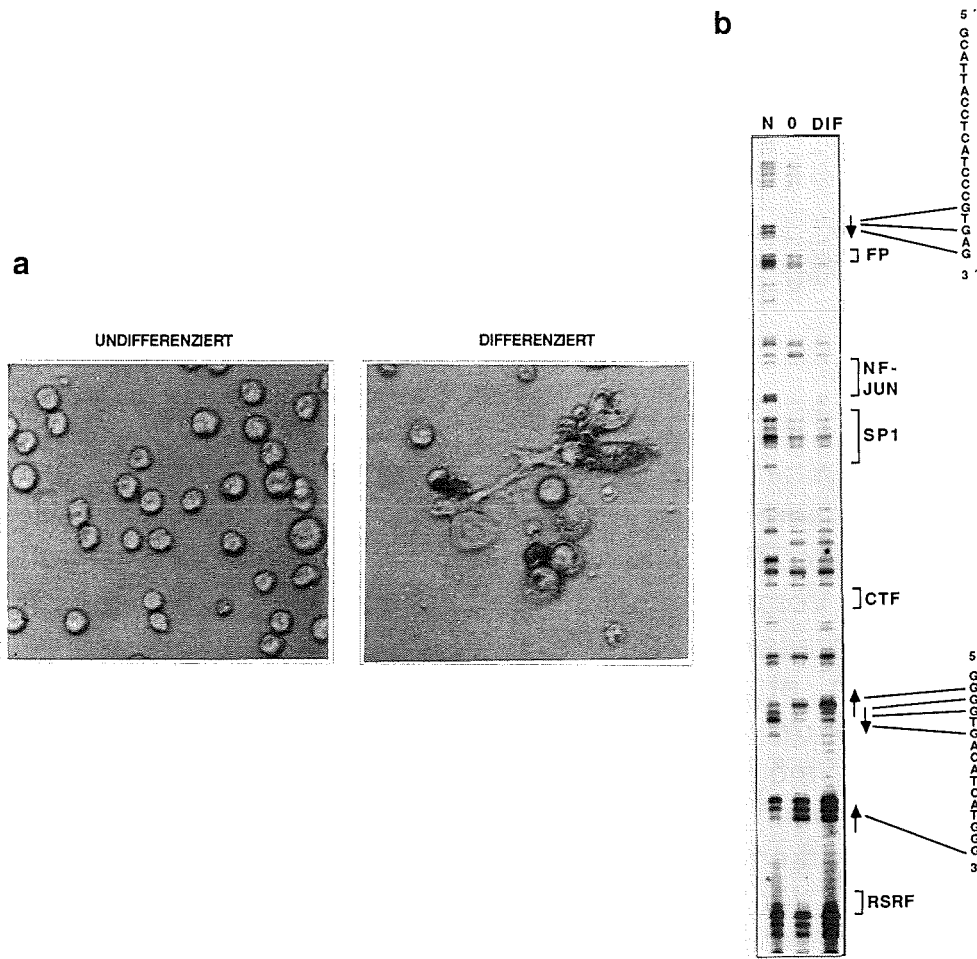


Abb. 27 HL60-Zellen vor und nach der Differenzierung. (a) TPA (100ng/ml) wurde für 3d ins Medium gegeben, was zu einer vollständigen Veränderung des Phänotyps führt. (b) *In vivo* Proteinbindung an den kodierenden Strang des *c-jun* Promotors aus undifferenzierten (0) und differenzierten (DIF) HL60-Zellen. HL60-Zellen wurden für 3d mit TPA (100ng/ml) im Medium differenziert und die Proteinbindung *in vivo* am kodierenden Strang des *c-jun* Promotors bestimmt. Weitere Beschreibung wie in Abb. 12.

Zusammengefaßt sind die UV- und TPA-induzierbaren Elemente Jun 1 und Jun 2, ebenso wie alle anderen Bindungsstellen des *c-jun* Promotors, sowohl vor, als auch nach der Differenzierung von F9- und HL60-Zellen vollständig besetzt. Vor der Differenzierung müssen sich die an Jun 1 und Jun 2 bindenden Faktoren von cJun/ATF-2 oder Jun/Fos Heterodimeren unterscheiden, da Jun und Fos nicht exprimiert werden. Sehr wahrscheinlich binden ATF-2 Homo- oder Heterodimere, die ATF-2 und einen bis jetzt nicht charakterisierten Faktor enthalten (van Dam et al., 1994). Nach der Differenzierung, wenn Jun exprimiert wird, ändert sich das Bindungsmuster an Jun 1 und Jun 2 nicht. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß nun cJun/ATF-2 Heterodimere binden, wie dies schon für andere Zellen, die *c-jun* exprimieren, gezeigt wurde (van Dam et al., 1993; Herr et al., 1994). Da im genomischen "Footprint"-Experiment keine Unterschiede in der Bindung vor und nach der Differenzierung nachzuweisen sind, ist anzunehmen, daß ATF-2-Homo- und cJun/ATF-2-Heterodimere die gleiche Sequenzspezifität haben.

Diskussion

Der Transkriptionsfaktor cJun spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von extrazellulären Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zytokinen, UV-Licht und Phorbolestern und trägt, je nach Situation und Zelltyp, entscheidend zur Proliferation, Differenzierung und Transformation der Zelle bei (Angel und Karin, 1991; Angel, 1994). Angesichts dieser wichtigen Funktion muß die Regulation der *c-jun* Expression und die Aktivität des cJun Proteins streng kontrolliert werden. Dies ist auf mindestens drei verschiedenen Ebenen möglich: zum einen durch Kontrolle der Transkriptionsrate des *c-jun* Gens, zum anderen durch Interaktionen des cJun Proteins mit verschiedenen Dimerpartnern, oder anderen zellulären Proteinen, und letztendlich durch post-translationale Modifikationen des cJun Proteins.

Die vorliegende Arbeit klärt Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *c-jun* Promotors nach Behandlung von Zellen mit TPA, UV-Bestrahlung, sowie während der Differenzierung und Transformation von Zellen auf.

1. Zwei AP-1 Bindungsstellen spielen die entscheidende Rolle in der Regulation des c-jun Promotors und werden von cJun/ATF-2 Heterodimeren erkannt

Der *c-jun* Promotor wird innerhalb von Minuten von einem inaktiven in einen Zustand voller Aktivität angehoben und nach kürzester Zeit wieder auf die basale Transkriptionsrate zurückgebracht. Zu dieser Aktivierbarkeit ist keine Proteinneusynthese notwendig, was bedeutet, daß die Aktivität des *c-jun* Promotors durch Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, die schon vor Stimulation in der Zelle vorliegen. Durch *in vitro* und *in vivo* "Footprint"-Experimente am *c-jun* Promotor konnten multiple Bindungsstellen für diejenigen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Funktion durch transiente Transfektionen von *c-jun* Promotor-Mutanten und Analyse der Transkriptionsrate ermittelt wurde.

Zwei AP-1 ähnliche Bindestellen (Jun 1 und Jun 2) spielen bei der maximalen und unmittelbar frühen Antwort des Promotors nach Behandlung von Zellen mit TPA und UV-Licht die entscheidende Rolle. Die beiden Bindungsstellen arbeiten additiv, da nach Mutation von entweder Jun 1 oder Jun 2 sowohl die basale, als auch die induzierte Transkriptionsrate um etwa 50% reduziert wird. Durch Mutation beider

Bindungsstellen zusammen geht die basale Transkription dramatisch zurück und eine Induktion ist nicht mehr möglich. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Daten von Stein et al., 1992, wobei die Aktivität des *c-jun* Promotors über die Expression des CAT-Enzyms, 48 Stunden nach UV-Bestrahlung von Zellen, gemessen wurde. Kürzlich wurde gefunden, daß beide Bindungsstellen (Jun 1 und Jun 2) auch die konstitutiv verstärkte Transkription des *c-jun* Gens in Adenovirus transformierten Zellen vermitteln (van Dam et al., 1993). Das für die Transformation notwendige E1A Protein scheint demzufolge für die Aufrechterhaltung einer konstitutiv erhöhten Transkriptionsrate des *c-jun* Promotors zelluläre Signalwege zu benutzen, die auch von UV-Licht und TPA angesteuert werden.

In diesen E1A exprimierenden Zellen bindet ein spezifischer heterodimerer Komplex an Jun 2, der cJun und ATF-2 (und/oder einen immunologisch verwandten Faktor) enthält (van Dam et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die gleichen Dimere auch an Jun 1 und Jun 2 aus Zellen binden, die kein E1A enthalten, wie z.B. menschliche Fibroblasten und HeLa-Zellen. Somit scheint die Funktion dieser Komplexe nicht auf die E1A abhängige *c-jun* Regulation beschränkt zu sein, sondern ist höchstwahrscheinlich ein allgemeiner Mechanismus, um die *c-jun* Promotoraktivität zu modulieren. Zusätzlich zu cJun/ATF-2 Dimeren bindet an Jun 1 *in vitro* ein Komplex, der Fos und Jun Proteine enthält. Wahrscheinlich spielt dieser Jun/Fos Komplex keine herausragende Rolle bei der Regulation des *c-jun* Promotors. Die Bestimmung der relativen Affinität beider Komplexe ("On-, Off-Rate") macht deutlich, daß Fos/Jun viel schneller von der Bindungsstelle dissoziiert, als der cJun/ATF-2 enthaltende Komplex. Während mehr als 80% der gebundenen Jun/Fos Dimere von der DNA innerhalb einer Minute dissoziiert, bleiben Jun/ATF-2 Komplexe mindestens fünf Minuten mit der DNA assoziiert. Außerdem exprimieren fast alle Zellen im nicht-stimulierten Zustand sehr geringe Mengen an Fos- oder Fos-verwandten Proteinen. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß die Menge an Fos/Jun Heterodimeren die Menge an cJun/ATF-2 Komplexen ausreichend übersteigt, um *in vivo* an der Bindestelle zu kompetieren. Man kann somit davon ausgehen, daß in nicht-stimulierten Zellen eher cJun/ATF-2 Komplexe als Jun/Fos Dimere an Jun 1 und Jun 2 binden und für die basale Transkription von *c-jun* mitverantwortlich sind.

Mehrere Argumente sprechen dafür, daß cJun/ATF-2 Heterodimere auch für die schnelle Aktivierung des *c-jun* Promotors durch TPA und UV-Licht verantwortlich sind: Zum einen die schnelle Induktion der

Transkription, im Gegensatz zu AP-1 abhängigen Genen, die zu späteren Zeitpunkten durch TPA induziert werden (z.B. Kollagenase und Gewebeplyasminogen-Aktivator), und die von Fos/Jun erkannt werden (Abb. 20). Zum anderen korrelieren die Ergebnisse der *in vivo* "Footprint"-Analysen, die eine voll ausgebildete Proteinarchitektur am Promotor zeigen, die sich zu keinem Aktivitätszustand ändert, exakt mit einem Fehlen von Veränderungen in der Proteinbindung an Jun 1 und Jun 2 *in vitro*. Dies läßt darauf schließen, daß die durch UV-Licht und TPA ausgelösten Signale schon gebundene cJun/ATF-2 Dimere erreichen. Die wichtige Rolle von cJun selbst bei der Regulation des *c-jun* Promotors wurde schon früh erkannt: viele Daten weisen darauf hin, daß cJun autoregulativ stimulierend auf seine eigene Transkription wirkt und daß die anderen Mitglieder der Jun-Familie, JunB und JunD, nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Annahme beruht zum einen auf transienten Transfektions-Experimenten, durch die gezeigt wurde, daß ein *c-jun* Promotorfragment, das die Jun 1 Bindestelle enthält, durch Überexpression von cJun aktiviert werden kann (Angel et al., 1988) und zum anderen auf den sehr schwachen Transaktivierungsaktivitäten, die JunB oder JunD besitzen (Chiu et al., 1989; Hirai et al., 1989). Zusätzlich wurden zelluläre Bedingungen beschrieben (z.B. nach Stimulation von Zellen mit cAMP, bei denen die *c-jun* Transkription trotz stark aktivierter Expression von JunB und JunD nicht gesteigert, sondern sogar gehemmt wird (Mechta et al., 1989; Chiu et al., 1989). Die entscheidende Funktion von cJun wird weiter durch *in vitro* Bindungsstudien (Gelretardations-Analysen) gestützt. Ein Jun-spezifischer Antikörper, der sehr effizient cJun erkennt, aber nur schwach mit JunB oder JunD interagiert, wandelt einen Teil der cJun-ATF-2/DNA Komplexe in eine "Supershift"-Form um, deren Menge in stimulierten und nicht-stimulierten Zellen gleich ist (Herr et al., 1994). Darüberhinaus kann nur cJun effiziente Heterodimere mit ATF-2 bilden, während weder JunB, noch Fos, oder Fos-verwandte Proteine mit ATF-2 heterodimerisieren können (Benbrook und Jones, 1990; Hai et al., 1991).

II. E1A wirkt reprimierend auf die Bindung von Jun/Jun oder Jun/Fos Dimeren, während es die Transaktivierungsaktivität von cJun/ATF-2 Heterodimeren verstärkt

Einen weiteren Hinweis auf die Steuerung der *c-jun* Regulation durch cJun/ATF-2 und nicht durch Jun/Fos geben Experimente, die mit Adenovirus-transformierten Zellen durchgeführt wurden. In diesen Zellen findet man einen totalen Verlust der Kollagenase-Expression, sogar nach Stimulierung der Zellen mit TPA. *In vivo* Bindungsstudien

haben gezeigt, daß die Bindung von Jun/Jun Homodimeren und Jun/Fos Heterodimeren an den Kollagenase-Promotor in Gegenwart von E1A vollständig reprimiert wird (Hagmeyer et al., 1993). Auch die artifizielle Aktivierung eines *c-jun* Minimalpromotors (-79/+170), ist durch Überexpression von Fos und Jun in Gegenwart von E1A komplett gehemmt (van Dam et al., 1990). Trotzdem wird die Bindung von cJun/ATF-2 an sowohl Jun 1, als auch an Jun 2 nicht gestört und die basale Expression von *c-jun* ist im Vergleich zu nicht-transformierten, parental Zellen verstärkt (van Dam et al., 1990; van Dam et al., 1993; Hagmeyer et al., 1993). Diese Befunde zeigen, daß E1A verschiedene Mitglieder der AP-1 Familie offensichtlich selektiv regulieren kann. cJun Homodimere und cJun/cFos Heterodimere, die physiologischen Regulatoren der Expression des Kollagenase Promotors (Schönthal et al., 1988a+b; Chiu et al., 1989; van Dam et al., 1993), können in Gegenwart von E1A nicht an DNA binden, während die Bindung eines anderen Jun Heterodimers, cJun/ATF-2 (van Dam et al., 1993) an den *c-jun* Promotor nicht reprimiert wird.

Dieses Ergebnis definiert E1A als den ersten multifunktionellen Regulator, der zwischen verschiedenen Komponenten der AP-1 Familie unterscheiden kann. Der Mechanismus der Repression von Jun/Jun Dimeren und Jun/Fos Heterodimeren wurde bis jetzt noch nicht identifiziert. Welche Dimere reprimiert oder nicht reprimiert werden, wird wahrscheinlich durch die Sekundärstruktur der spezifischen DNA Bindedomäne bestimmt. In der Tat wurden Unterschiede in der Struktur der DNA Bindedomänen von cJun Homodimeren und cJun/cFos Heterodimeren beobachtet (Kerppola und Curran, 1991). Deshalb unterscheiden sich wohl auch cJun/ATF-2 Heterodimere strukturell von anderen AP-1 Faktoren. Alternativ könnten post-translationale Modifikationen von cJun oder seines jeweiligen Partners (JunB, JunD, ATF-2 oder Fos-Proteine) zur spezifischen Repression oder Aktivierung durch E1A beitragen. So wurde gezeigt, daß die Bindungsaktivität von cJun durch Phosphorylierung in der DNA-Bindedomäne reprimiert und umgekehrt durch Dephosphorylierung erhöht wird (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Jedoch soll eine veränderte Phosphorylierung von cJun nicht in die Hemmung der Bindung von cJun/cJun und cJun/cFos Proteine involviert sein (Hagmeyer et al., 1993). Die Wirkung von E1A auf das Phosphorylierungsmuster von Fos und ATF-2 wurde bis jetzt nicht untersucht. Ein offensichtlich entscheidender Unterschied zwischen Jun/Fos und cJun/ATF-2 könnte deren Zugänglichkeit für inhibierende Modifikationen bewirken: cJun/ATF-2 ist die ganze Zeit über an DNA gebunden, während die Bindung von Jun/Fos induziert wird. E1A könnte auch durch direkte Assoziation mit Jun/Fos die DNA Bindung verhindern.

Bisher konnten jedoch keine solchen Assoziationen durch Ko-Imunpräzipitation nachgewiesen werden.

III. FP, NF-Jun, Sp1, CTF und RSRF kooperieren mit Jun 1 und Jun 2, können jedoch selbst keine Induzierbarkeit vermitteln

Die cJun/ATF-2 Komplexe, die die Hauptfunktion bei der basalen und induzierten Aktivität des *c-jun* Promotors haben, werden in ihrer Wirkung von Faktoren, die an andere Sequenzen binden, moduliert. Die an die anderen Sequenzen bindenden Faktoren können jedoch selbst keine Induzierbarkeit vermitteln, da ein *c-jun* Promotorkonstrukt, bei dem beide AP-1 Bindungsstellen mutiert sind, das jedoch in allen anderen Sequenzen intakt ist, eine stark erniedrigte Basalaktivität zeigt und nicht mehr induzierbar ist. Zur maximalen Aktivität sind also beide cJun/ATF-2 Bindungsstellen, zusammen mit zusätzlichen, synergistisch wirkenden Faktoren, notwendig.

Einer dieser Faktoren bindet im Bereich von -91 bis -87 und wird *in vitro* von dem Transkriptionsfaktor CTF erkannt (Angel et al., 1988). Ein weiterer, bis jetzt nicht-identifizierter Faktor "Footprint" (FP) bindet an eine Sequenz, die stromabwärts und direkt benachbart zu Jun 2 im Bereich der Nukleotide -181 bis -165 liegt. Trotz der sich scheinbar überlappenden Bindungsstellen von Jun 2 und FP besteht keine Kooperativität der Bindung. FP bindet unabhängig von einer intakten Jun 2 Sequenz und setzt sich weder aus Jun-, noch aus Fos-Proteinen zusammen. Bisher wurde noch kein Transkriptionsfaktor isoliert, dessen Erkennungssequenz der FP-Region entspricht.

Der protektierte Bereich -140 bis -132 wurde kürzlich durch *in vitro* Bindungsstudien als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF-Jun identifiziert. Dieser Faktor wurde aus Extrakten von menschlichen, myeloiden und proliferierenden Leukämiezellen isoliert (Brach et al., 1992). Er hat Ähnlichkeit mit NF κ B, da er durch dissoziierende Agenzien aktiviert und nach Induktion vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert wird. Aus den hier vorliegenden *in vivo* Bindungsstudien wird jedoch ersichtlich, daß in nicht-myeloiden Zellen ein anderer Faktor an die NF-Jun Sequenz bindet und schon vor Induktion der *c-jun* Expression am Promotor gebunden ist. Der in Fibroblasten und HeLa-Zellen gefundene Faktor hinterläßt nicht exakt die gleichen Protektionen, wie sie für den Leukämie-spezifischen Faktor NF-Jun beschrieben wurden. Deshalb handelt es sich hier wahrscheinlich um ein anderes Protein mit ähnlichen Bindeeigenschaften. Denkbar wäre, daß dieser Faktor, bzw. NF-Jun, Zelltyp-spezifisch exprimiert wird. Dagegen

spricht, daß das *in vivo* "Footprint"-Muster an der NF-Jun Bindungsstelle in HeLa-Zellen und in der Zelllinie HL60 identisch ist (vergleiche Abb. 12 und 27). Alternativ könnten beide Faktoren ko-exprimiert werden, wobei NF-Jun nur nach TNF α Behandlung von lymphoiden Zellen an den *c-jun* Promotor bindet (Brach et al., 1992). Dabei stellt sich die Frage, ob in lymphoiden Zellen Jun 1 und Jun 2 zur Aktivierung des *c-jun* Promotors ebenfalls notwendig sind, oder ob unter diesen Bedingungen die Aktivierung von NF-Jun durch hematopoietische, differenzierend wirkende Agentien ausreicht, um die *c-jun* Transkription zu vermitteln.

Die RSRF ("related SRF") Sequenz (-58/52), die wichtig für die Induzierbarkeit des *c-jun* Promotors durch EGF und Serum zu sein scheint und zur maximalen Induzierbarkeit durch TPA beitragen soll (Hahn et al., 1992), kann ebenfalls nicht selbständig Aktivität vermitteln, sondern muß mit Jun 1 und Jun 2 kooperieren und ist dabei unbedingt von deren intakter Sequenz abhängig.

Ein Protein, das nicht zur Aktivierung des *c-jun* Promotors beiträgt, sondern vielmehr einer Induktion entgegenwirkt, bindet an die Sequenz -110 bis -123. In diesem Bereich sind zwei GC-Boxen enthalten, die homolog zur Konsensus Sequenz 5'-GGGCGG-3' des Transkriptionsfaktors Sp1 sind. Wie hier gezeigt wird, hat die Mutation dieser Sequenz geringen Einfluß auf die basale Transkriptionsrate, erhöht jedoch die frühe, induzierte Transkription nach Behandlung von Zellen mit TPA oder UV-Licht stark. Untersuchungen von Unlap et al., 1992, bestätigen dieses Ergebnis: Transiente Transfektion eines *c-jun* Minimalpromotor-konstruktes und Analyse der Transkriptionsrate durch ein CAT-Experiment zeigen, daß Mutation von Sp1 die durch TPA stimulierte CAT-Aktivität um das Vierfache steigert. Kürzlich wurde die Interaktion von Sp1 mit dem Transkriptionsfaktor YY1 beschrieben (Lee et al., 1993; Seto et al., 1993). YY1 agiert sowohl als Repressor, als auch als Aktivator der Genexpression, je nachdem, mit welchem anderen Transkriptionsfaktor er interagiert (Bauknecht et al., 1994). YY1 könnte hier als Repressor wirken und bei Induktion des *c-jun* Promotors über Protein-Protein-Interaktionen an Sp1 binden. Da YY1 zusätzlich mit TBP in Wechselwirkung treten kann (Pugh and Tjian, 1990) würde YY1 als reprimierender Vermittler zwischen Sp1 und TBP wirken. (Abb. 30).

IV. Der *c-jun* Promotor wird über einen hypothetischen Multiproteinkomplex gesteuert, dessen Aktivität durch post-translationale Modifikationen verändert wird

Durch den engen räumlichen Zusammenhang der regulatorischen Sequenzen des *c-jun* Promotors und durch die Kooperation der Transkriptionsfaktoren RSRF, CTF, Sp1, NF-Jun und FP mit Jun 1 und Jun 2 entsteht das Bild eines zusammenhängenden Multiproteinkomplexes, der am Promotor sitzt und dessen Aktivität steuert. Die Transkriptionsfaktoren, deren Bindungsstellen auf dem *c-jun* Promotor gefunden wurden, würden demnach nicht wie einzelne Glieder einer Perlenkette aneinandergereiht am Promotor gebunden sein, sondern ein Proteinknäuel ausbilden, das durch Protein-Protein-Interaktionen stabilisiert und durch einzelne DNA-bindende Proteine am Promotor binden würde (Abb. 30). Verschiedene Möglichkeiten sind vorstellbar, um die Promotoraktivität durch einen solchen hypothetischen Multiproteinkomplex zu steuern:

Zum einen könnte sich die Proteinzusammensetzung nach Aktivierung oder Repression ändern, indem DNA-bindende Proteine mit der DNA neu assoziieren oder von der DNA dissoziieren. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da weder in den genomischen "Footprint"-Analysen, noch in den *in vitro* Bindungsstudien, Veränderungen der Proteinbindung oder ein Austausch von Faktoren am Promotor im basalen und induzierten Zustand zu erkennen sind. Selbst bei Verwendung von DNaseI anstelle von DMS bei den genomischen "Footprint"-Analysen zeigen sich keine Veränderungen der Proteinbindung nach UV-Bestrahlung (Rozek und Pfeifer, 1993). Im Gegensatz zu DMS, das Protein-DNA Kontakte an Sequenzen, die Guanine oder Adenine enthalten und in der "Major Groove" der DNA Doppelhelix liegen, sichtbar macht, ist DNaseI sensitiver für Protein-DNA Kontakte in der "Minor Groove". Jede signifikante Veränderung der Protein-DNA Interaktionen nach Stimulation, eingeschlossen den Austausch eines Repressors gegen einen Aktivator, hätte demnach sichtbar sein müssen.

Ausgeschlossen werden kann auch die Möglichkeit, daß die hier verwendete *in vivo* "Footprint"-Methode zu unsensitiv für den Nachweis von strukturellen Veränderungen an Promotoren ist: zum einen konnte durch Immunfluoreszenz die sehr effiziente und synchrone Induktion der *c-jun* Transkription, bzw. der cJun Synthese nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß alle Zellen und nicht nur ein kleiner Teil reagiert. Deshalb hätten Veränderungen in der Proteinbesetzung des Promotors nachweisbar sein müssen. Zum anderen bestätigen die genomischen

"Footprint"-Analysen am menschlichen Kollagenase und Gewebeplyasminogen-Aktivator Promotor die Verwendbarkeit dieser Methode. Diese beiden erst spät nach Stimulierung aktivierbaren Gene zeigen nach Stimulation zunehmende Protektionen oder Hypersensitivitäten sowohl in der AP-1 Bindungsstelle, als auch an anderen regulatorischen Sequenzen (König et al., 1992; Daten nicht gezeigt und Abb. 14, 18, 24). Die Promotorregulation eines weiteren "immediate early" Gens, *c-fos*, weist ein vergleichbares Bild wie *c-jun* auf: Während der transkriptionellen Aktivierung von *c-fos* nach Behandlung von Zellen mit TPA, UV-Licht oder Wachstumsfaktoren bindet ein ternärer Komplex *in vivo* schon in unbehandelten Zellen und verändert sich nach Induktion nicht (Herrera et al., 1989). Dieser ternäre Komplex wird durch ein Dimer des "Serum Response Faktors" (SRF) gebildet, der über Protein-Protein-Bindungen, den "Ternary Complex Faktor" p62^{TCF} trägt. Dieser Komplex bindet an das "Serum Response Element" (SRE), wobei p62^{TCF} sich nur schwach an der DNA-Bindung beteiligt. (Zinck et al., 1993).

Vorstellbar wären Protein-Protein-Interaktionen von nicht-DNA-bindenden Proteinen mit am Promotor-gebundenen Faktoren. Nach Aktivierung könnte ein Repressor diffundieren, oder ein Aktivator assoziieren. Diese hypothetischen Interaktionen müßten allerdings sehr instabil sein, da in Gelretardations-Experimenten die Bindung eines zusätzlichen Faktors an Jun 1, Jun 2 und FP nach Stimulation durch UV-Licht oder TPA nicht nachzuweisen war.

Sehr plausibel erscheint der Gedanke, daß die Aktivität von Proteinen, die schon im basalen Zustand fest mit dem Promotor assoziiert sind, durch post-translationale Modifikationen reguliert wird. Dadurch könnte die Aktivität schon gebundener Faktoren schnellstmöglich gesteuert werden. Genau in dieses Bild paßt der Befund, daß die beiden wichtigsten regulatorischen Proteine des *c-jun* Promotors, cJun und ATF-2, Phosphoproteine sind. Jun enthält neben Phosphat- (Boyle et al., 1991) auch Glykosyl-Gruppen (Jackson and Tjian, 1988); allerdings ist die Funktion der Glykosylierung bis jetzt unbekannt. Zwei verschiedene Mechanismen führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors cJun in TPA-behandelten Zellen. Erstens wird schon existierendes cJun Protein verstärkt an Serin 63 und 73 innerhalb der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert (Abb 29). Daneben erfolgt eine Dephosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste in der DNA-Bindedomäne (Radler-Pohl et al., 1993; Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991, 1992; Devary et al., 1992). Durch Fusion der Transaktivierungsdomäne von cJun an heterologe DNA Bindedomänen, wie z.B. die der Transkriptionsfaktoren GAL4 oder GHF1, konnte die unbedingte

Notwendigkeit der Phosphorylierung der Serine 63 und 73 für die transkriptionelle Aktivierung von Jun bestätigt werden (Radler-Pohl et al., 1993; Smeal et al., 1991; Devary et al., 1992; Pulverer et al., 1991; Franklin et al., 1992). Die Phosphorylierung soll die Bindung von Ko-Aktivatoren bewirken (Abb. 30). Diesbezüglich ist bekannt, daß der Ko-Aktivator p52/54 mit dem phosphorylierten cJun Protein interagiert und dessen gesteigerte Transaktivierungsaktivität direkt auf ein Protein des basalen Transkriptionskomplexes überträgt (Oehler et al., 1992). Ein weiteres Brückenprotein, das mit der phosphorylierten Form von cJun in Wechselwirkung tritt und dieses mit dem basalen Transkriptionskomplex verbindet, ist CBP (Chrivia et al., 1993, Arias et al., 1994). Die Fähigkeit von E1A, selektiv die Transkription bestimmter Promotoren zu inhibieren oder zu aktivieren, könnte ebenfalls über den Einfluß von E1A auf bestimmte Ko-Aktivatoren vermittelt werden. E1A interagiert mit P300, das wahrscheinlich mit CBP identisch ist (Arias et al., 1994). Darüberhinaus ist E1A in der Lage, direkt mit TBP zu interagieren (Hernandez, 1993) und könnte daher selbst als Ko-Aktivator wirken, der cJun/ATF-2 Komplexe über CBP mit TBP verknüpft (Abb. 30).

Durch Dephosphorylierung der DNA-Bindedomäne soll sich die Bindeaktivität von cJun verstärken (Boyle et al., 1991). Dies könnte, außer einer vermehrten Synthese von Fos und Jun, der Grund für die gesteigerte Bindung von Jun/Jun oder Jun/Fos Dimeren an den Kollagenase und t-Pa Promotor nach Stimulation von Zellen sein. Für die Regulation des "immediate early" Gens *c-jun* scheint dieser Mechanismus jedoch keine Rolle zu spielen, da ATF-2/cJun Dimere ständig am *c-jun* Promotor gebunden sind.

Die Transaktivierungsfunktion von ATF-2 ist durch TPA nicht stimulierbar. Allerdings trägt ATF-2, zusammen mit cJun, zur transkriptionellen Aktivierung des *c-jun* Promotors durch UV-Licht bei (van Dam et al., 1994). Wie cJun, wird ATF-2 ebenfalls durch eine post-translationale Modifikation aktiviert, und zwar durch Hyperphosphorylierung der Threonine 69 und 71, die in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne liegen (van Dam et al., 1994). Dies zeigt, daß nur eines der beiden Proteine, cJun oder ATF-2 aktiviert werden muß, um eine Aktivierung des *c-jun* Promotors zu erreichen.

Außer ATF-2 und cJun könnten auch die anderen, hier identifizierten Proteine, die an den *c-jun* Promotor binden, durch post-translationale Modifikationen gesteuert werden. Diese Frage ist bei den bisher wenig charakterisierten Faktoren NF-Jun und FP noch offen, während CTF kein

Phosphoprotein darstellt. Sp1 kann mit dem Transkriptionsfaktor YY1 interagieren, worauf auf Seite 99 näher eingegangen wird. Darüberhinaus ist zu beachten, daß diese Proteine selbst, in Abwesenheit von cJun/ATF-2 keine Induzierbarkeit vermitteln können. Die Funktion dieser zusätzlichen Faktoren könnte darin bestehen, den Promotor offen zu halten, um Phosphatasen und Kinasen den Weg zu cJun/ATF-2 Heterodimeren zugänglich zu machen.

V. UV-Licht und TPA aktivieren den c-jun Promotor über unterschiedliche Signalketten

Die Antwort auf UV-Bestrahlung wird durch eine Signal-Transduktionskaskade vermittelt, deren früheste meßbare Komponente die Aktivierung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren ist (Abb. 28). Weitere essentielle Komponenten der Signal-Weiterleitung zum Zellkern sind die zyttoplasmatischen Proteine Src, Ras, Raf und Mitglieder der Mitogen-aktivierten-Protein- (MAP) Kinasen (Sachsenmaier et al., 1994), die dann cJun/ATF-2 phosphorylieren (van Dam et al., 1994). Durch Verwendung von trans-dominant negativ wirkenden Mutanten wurde deutlich, daß UV und TPA gemeinsame Komponenten aktivieren, zu denen Raf-Kinase zählt (Radler-Pohl et al., 1993). Es wurde bis vor kurzem angenommen, daß am Ende der Signal-Transduktionskette, die durch TPA oder UV-Licht initiiert wird und die die Phosphorylierung von cJun und möglicherweise ATF-2 vermittelt, die beiden MAP-Kinasen p42 Erk-1 und p44 Erk-2 stehen (Radler-Pohl et al., 1993; Pulverer et al., 1991; van Dam et al., 1994). Neueste Ergebnisse zeigen jedoch, daß neben Erk-1 und Erk-2 andere MAP-ähnliche Kinasen eine Rolle spielen. So wurde ATF-2 als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, dessen transaktivierende Funktion nach Behandlung mit UV-Licht oder alkylierenden Agentien erhöht wird, nicht aber durch Behandlung mit TPA. ATF-2 könnte daher das spezifische Ziel für die Signalkette sein, die von UV-Licht induziert wird (van Dam et al., 1994). Im Gegensatz zu ATF-2 wird das Transaktivierungspotential von cJun sowohl durch TPA, als auch durch UV-Licht verstärkt.

In vitro binden zwei Sub-Klassen von MAP-Kinasen, p54 und p46 sehr stabil an cJun und ATF-2 und phosphorylieren beide Proteine mit hoher Effizienz. p54 (von dem es mehrere Splice-Formen gibt) und p46 werden neben UV-Licht noch durch andere Stimuli aktiviert, die als gemeinsames Charakteristikum Zellstress induzieren (Hibi et al., 1993; Kyriakis et al., 1994). Daher werden p54 und p46 als "Stress-activated" Proteinkinasen (SAPKs) bezeichnet (Kyriakis et al., 1994). Die ATF-2 Kinaseaktivität von p46 und p54 wird nach TPA nicht verstärkt. Das

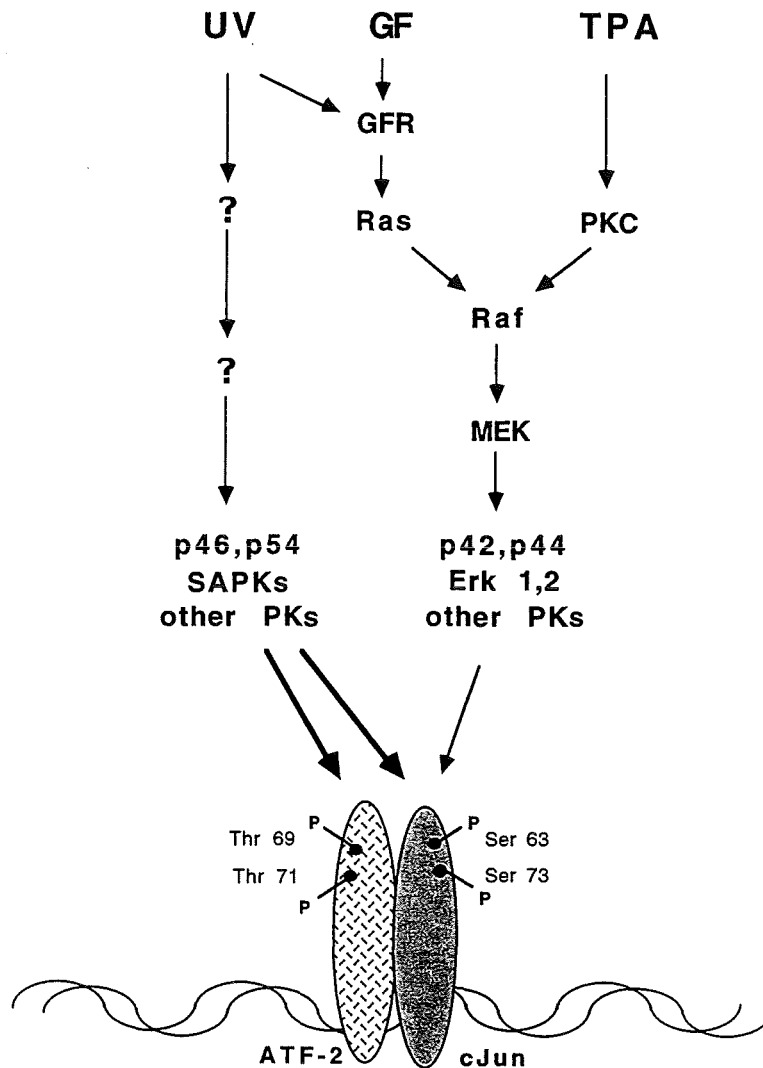


Abb. 28 Modell für die Aktivierung der cJun/ATF-2 abhängigen Transkription durch TPA, Wachstumsfaktoren und UV-Bestrahlung. Die zwei Untereinheiten des Heterodimers werden von verschiedenen Signalketten aktiviert. Die Phosphorylierungsstellen in den Transaktivierungsdomänen von cJun und ATF-2, die für die transaktivierende Funktion notwendig sind, sind dargestellt. GF: Wachstumsfaktoren, GFR: Rezeptor für Wachstumsfaktoren, PKC: Proteinkinase C, MEK: MAP-Kinase Aktivator, ERK 1, 2 (= p42, p44): Mitogen-aktivierte (MAP)-Kinasen, SAPK (= p46, p54): Stress-aktivierte Proteinkinasen.

gleiche gilt für die SAPKs, die cJun phosphorylieren (van Dam et al., 1994; Wilhelm et al., 1994). Dies ist ein deutliches Argument dafür, daß die Proteinkinase, die cJun nach TPA phosphoryliert (Adler et al., 1992), sich von SAPKs unterscheidet. Es ist bisher unbekannt, welche Kinase für die cJun Phosphorylierung nach TPA-Behandlung von Zellen verantwortlich ist.

Diese Daten machen ganz deutlich, daß verschiedene Signal-Transduktionswege an cJun/ATF-2 zusammenlaufen und jede Untereinheit individuell durch spezifische Proteinkinasen phosphoryliert wird. Dadurch ist eine fein abgestimmte Modulation der *c-jun* Expression durch ein breites Spektrum extrazellulärer Signale möglich.

Das Modell der phosphorylierungs-abhängigen Regulation der Transaktivierungsfunktion von DNA-gebundenem cJun und ATF-2 wird im Hinblick auf die transkriptionelle Regulation des *c-fos* Gens bestärkt: Ähnlich wie *c-jun*, ist die Promotorregion dieses "immediate early" Gens während aller Aktivitätszustände voll besetzt. Die transkriptionelle Aktivierung und Repression von *c-fos* korreliert zeitlich mit dem Zustand der Phosphorylierung von p62^{TCF} (Zinck et al., 1993). p62^{TCF} wird *in vitro* durch Erk 1/2 MAP-Kinase modifiziert. Diese *in vitro* Phosphorylierung ähnelt dem Muster der Phosphorylierung *in vivo* (Gille et al., 1992; Zinck et al., 1993; Shaw, 1994).

VI. Die Regulation des *c-jun* Promotors in undifferenzierten F9-Zellen

Ein Sonderfall der *c-jun* Promotor-Regulation liegt in undifferenzierten F9- oder HL60-Zellen vor, da hier keine basale Expression von cJun stattfindet. Im Laufe der Differenzierung dieser Zellen wird der *c-jun* Promotor jedoch aktiviert und das cJun Protein exprimiert. Die Aktivierung des *c-jun* Promotors während der frühen Phase der Differenzierung kann demnach nicht über cJun/ATF-2 Heterodimere erfolgen, sondern muß über Faktoren bewerkstelligt werden, die bereits in undifferenzierten Zellen vorhanden sind und bei denen es sich nicht um cJun Proteine handelt. Diese Faktoren binden in undifferenzierten Zellen an den Promotor und haben identische Bindungseigenschaften wie cJun/ATF-2 Komplexe; während der Differenzierung ändert sich das Muster der Proteinbindung am Promotor nicht. Es gibt deutliche Hinweise darauf, daß der Hauptkomplex, der sich in undifferenzierten F9-Zellen an Jun 1 und Jun 2 ausbildet, ATF-2 enthält. ATF-2 könnte entweder als Heterodimer, zusammen mit einem bis jetzt unbekanntem Faktor, oder als Homodimer binden. Tatsächlich können ATF-2 Homodimere, die durch *in vitro* Translation in einem Retikulozytenlysat hergestellt wurden, sehr effizient an Jun 1 und Jun 2 *in vitro* binden (van Dam et al., 1994). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß die Aktivierung des *c-jun* Promotors während der Differenzierung über die Phosphorylierung von ständig am Promotor gebundenen ATF-2 Homodimeren oder von Heterodimeren, die aus ATF-2 und einem unbekanntem Faktor bestehen, erfolgt.

Diese Vorstellung vorgebundener ATF-2 Proteine ist kompatibel mit dem Ergebnis, daß der *c-jun* Promotor in F9-Zellen nur durch UV-Licht, nicht aber durch TPA induzierbar ist (van Dam et al., 1994). Im Gegensatz dazu kann die Expression von *c-jun* in Zellen, die cJun Protein exprimieren (und in denen cJun/ATF-2 Heterodimere am Promotor binden) sowohl durch UV-Licht, als auch durch TPA hervorgerufen werden. Dies bedeutet, daß die Untereinheiten des AP-1 Komplexes bestimmen, durch welche extrazelluläre Stimuli die *c-jun* Transkription beeinflusst wird. Demnach würden sowohl cJun, als auch ATF-2 effizient durch UV-Licht beeinflusst, während sich die Induktion durch TPA auf die Aktivierung des cJun Partners beschränkt (Abb. 28). Tatsächlich ist in den meisten bisher analysierten Zellen UV-Licht ein wesentlich effizienterer Induktor der *c-jun* Transkription als TPA (Devary et al., 1991; van Dam, persönliche Mitteilung).

VII. Die Regulation des *c-jun* Promotors während der Differenzierung

Die kausale Bedeutung von cJun/ATF-2 (oder ATF-2 Homodimere) für die schnelle Induktion des *c-jun* Promotors durch UV-Licht und TPA, bzw. die unterstützende Funktion anderer Faktoren, die mit der RSRF, CTF, Sp1 und NF-Jun Erkennungssequenz interagieren, wird an der vorliegenden Arbeit deutlich. Dieselben Faktoren scheinen auch die Induktion des *c-jun* Promotors während der Zelldifferenzierung zu vermitteln, da sich die Proteinbindung *in vivo* am *c-jun* Promotor vor, im Verlauf und nach der Differenzierung von F9- und HL60-Zellen nicht ändert. Behandlung von F9-Zellen mit Retinsäure oder Überexpression von E1A führt zur Differenzierung dieser Zellen, die auch die Induktion der *c-jun* Transkription beinhaltet (Kitabayashi et al., 1992). Retinsäure muß die Induktion des *c-jun* Promotors jedoch über einen indirekten Mechanismus vermitteln, da der Retinsäurerezeptor nicht an den *c-jun* Promotor bindet (de Groot et al., 1990, 1991). Kürzlich konnte durch Analyse von *c-jun* Promotor Deletions- oder Punktmutanten ein "Retinsäure und E1A "Response Element" (RERE) im *c-jun* Promotor definiert werden, das für die Induktion durch Retinsäure und E1A notwendig ist. Das RERE umspannt eine Region von 145 Basen zwischen Position -190 und -46. Dies entspricht dem Abschnitt, in dem die Bindungsstellen für Jun 1, Jun 2, FP, NF-Jun, Sp1, CTF und RSRF liegen (Abb. 29). Dieses RERE enthält fünf Varianten eines gemeinsamen Motives (C/G C/G G GTGAC C/G G NT), von denen jedes einzelne wichtig für die Aktivität des gesamten RERE ist (Kitabayashi et al., 1992). Vier dieser Motive überlappen mit den hier gefundenen regulatorischen Sequenzen und zwar mit Jun 2, FP, NF-Jun und Jun 1. Demnach spielen Jun 1 und Jun 2 auch während der Differenzierung eine wichtige Rolle und werden

von FP und NF-Jun unterstützt. Das fünfte, nicht überlappende Motiv, grenzt stromabwärts direkt an die Sp1 Sequenz. Ob diese Region tatsächlich von Proteinen gebunden wird, ist unklar. Im Gegensatz zu den vier anderen Motiven ist in F9- und anderen Zellen nur ein Teil dieses Motives *in vivo* protektiert (Abb. 12), der als flankierende Sequenz der Sp1-Bindungsstelle zugerechnet wurde. Alternativ könnte diese Sequenz auch für das "DNA-Bending" des *c-jun* Promotors Bedeutung haben, um die Ausbildung des Multiproteinkomplexes zu erlauben (Abb. 30). Sp1 und CTF überschneiden sich mit keinem dieser Motive. Die Funktion dieser beiden Sequenzen während der Differenzierung muß noch untersucht werden.

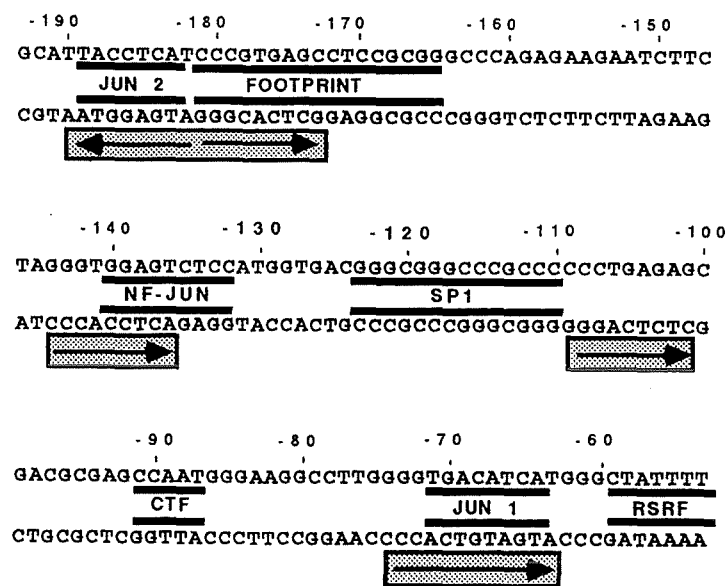


Abb. 29 Das RERE-Motiv umspannt die Nukleotide -46 bis -190 des menschlichen *c-jun* Promotors. Die regulatorischen Elemente Jun 1, Jun 2, FP, NF-Jun, Sp1, CTF und RSRF sind eingezeichnet. Das RERE vermittelt die durch Retinsäure und E1A ausgelöste Induktion des *c-jun* Promotors in embryonalen Stammzellen und besteht aus fünf Varianten des gleichen Motivs (dargestellt durch kurze Pfeile).

VI. Die Repression des *c-jun* Promotors

Während die Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung des *c-jun* Promotors gut untersucht sind, weiß man nur wenig über die Mechanismen, die die Transkriptionsrate wieder auf den Basalwert zurückbringen. Verschiedene Möglichkeiten kommen in Betracht:

Erstens könnte während des Abschaltens des Promotors ein Repressor binden, oder ein Aktivator verschwinden. In den genomischen "Footprint"-Analysen kann aber weder die zusätzliche Bindung eines möglichen Repressors, noch die Dissoziation eines aktivierenden Faktors beobachtet werden. Trotzdem wäre die Assoziation eines Repressors oder die Dissoziation eines Aktivators möglich, wenn solche Faktoren nicht direkt an DNA binden, sondern durch Protein-Protein Interaktionen die Funktion eines hypothetischen Multiprotein-komplexes am *c-jun* Promotor beeinflussen (Abb. 30).

Zweitens könnte die verstärkte Phosphorylierung von cJun und ATF-2, die die transkriptionelle Aktivierung vermittelt, durch eine spezifische Phosphatase revertiert werden. Ein attraktiver Kandidat für eine solche Phosphatase ist Protein-Phosphatase 2A (PP2A). Für die *c-fos* Regulation ist es wahrscheinlich, daß PP2A das aktive p62^{TCF} dephosphoryliert (Zinck et al., 1993). Dieses Enzym entfernt auch Phosphate von cJun, das *in vitro* synthetisiert wurde (Black et al., 1991). Inhibitoren von Phosphatasen, wie Okadainsäure, verstärken die Transkription von sowohl *c-jun*, als auch *c-fos* (Schönthal et al., 1991a+b). Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch die Stabilisierung der Phosphorylierung von p62^{TCF}, cJun und möglicherweise ATF-2.

Drittens könnten neu synthetisierte Jun und Fos Proteine negativ auf den *c-jun* Promotor zurückwirken, ähnlich wie sie zur Autorepression des *c-fos* Promotors beitragen (Schönthal et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988). Tatsächlich ist drei Stunden nach Behandlung von Zellen mit TPA eine verstärkte Bindung von Jun/Fos Heterodimeren an die Jun 1 Sequenz *in vitro* zu beobachten (Abb. 15). Bei transienten Transfektions-Experimenten wird die *c-jun* Promotor Aktivität (gemessen an CAT-Konstrukten, die die 5'-flankierenden Sequenzen -1600/+170; -283/+170; -195/+170 des *c-jun* Promotors enthalten) in der Gegenwart von großen Mengen Fos reprimiert (Park und Schönthal, unveröffentlicht). Überexprimiertes cFos Protein kann die *c-jun* Promotoraktivität jedoch nur solange reprimieren, wie die Promotorkonstrukte die Bindesequenzen für Jun 2 und FP enthalten (Die *c-jun* Promotordeletionsmutanten -167/+170 und -132/+170, denen Jun 2 und FP fehlt, sind nicht mehr reprimierbar). Deshalb könnten Jun/Fos Heterodimere das Abschalten des *c-jun* Promotors bewirken. Jedoch machen die *in vitro* Bindungsstudien deutlich, daß die "Off-Rate" von solchen Dimeren im Vergleich zu cJun/ATF-2 enthaltenden Komplexen viel höher ist. Darüberhinaus aktivieren Fos/Jun Dimere die Transkription, wenn sie an den Kollagenase Promotor gebunden sind (Angel et al., 1989; Schönthal et al., 1988a+b). Es ist also unwahrscheinlich, daß

erhöhte Mengen an Jun/Fos zu einem Abschalten der *c-jun* Transkription durch direkte Bindung an den *c-jun* Promotor führen.

Andere Elemente des *c-jun* Promotors könnten wichtig für die Abschwächung seiner Aktivität sein. Der Faktor, der an die Sp1 Sequenz bindet, hat einen reprimierenden Einfluß auf die durch TPA- und UV-Licht bewirkte Induktion der *c-jun* Expression (Abb. 9b). Möglicherweise spielt hier YY1 eine Rolle, da dieses Protein sowohl mit Sp1, als auch mit TBP interagiert (Pugh and Tjian, 1990). YY1 könnte nach Aktivierung des *c-jun* Promotors als "Ko-Repressor" zwischen Sp1 und TBP vermitteln (Abb. 30).

Schlußfolgerung

Die Transkription des *c-jun* Gens wird durch eine Vielzahl von Stimuli induziert, übereinstimmend mit seiner Rolle als Schlüsselement bei Prozessen der Zell-Proliferation, Transformation und Differenzierung. Eine gleichbleibende DNA-Proteinarchitektur, die schon vor dem Einwirken extrazellulärer Signale am Promotor etabliert ist, könnte wichtig für eine schnellstmögliche Regulation sein und generell von unmittelbar-frühen Genen, eingeschlossen *c-jun* und *c-fos*, benutzt werden. Diese schon gebundenen Faktoren könnten den *c-jun* Promotor unempfindlich gegenüber der negativen Regulation durch Chromatin machen (Croston und Kadonaga, 1993) und den Promotor in einem "semi-aktiven" Stadium halten. Das Konzept der Phosphorylierungs-abhängigen schnellen Änderungen in der Aktivität von Promotor-gebundenen Faktoren unterstreicht weiter die wichtige Funktion von unmittelbar frühen Gen-Produkten wie cJun und cFos als erste Ziele, um kurzzeitige extrazelluläre Signale in längerdauernde genetische Antworten zu verwandeln.

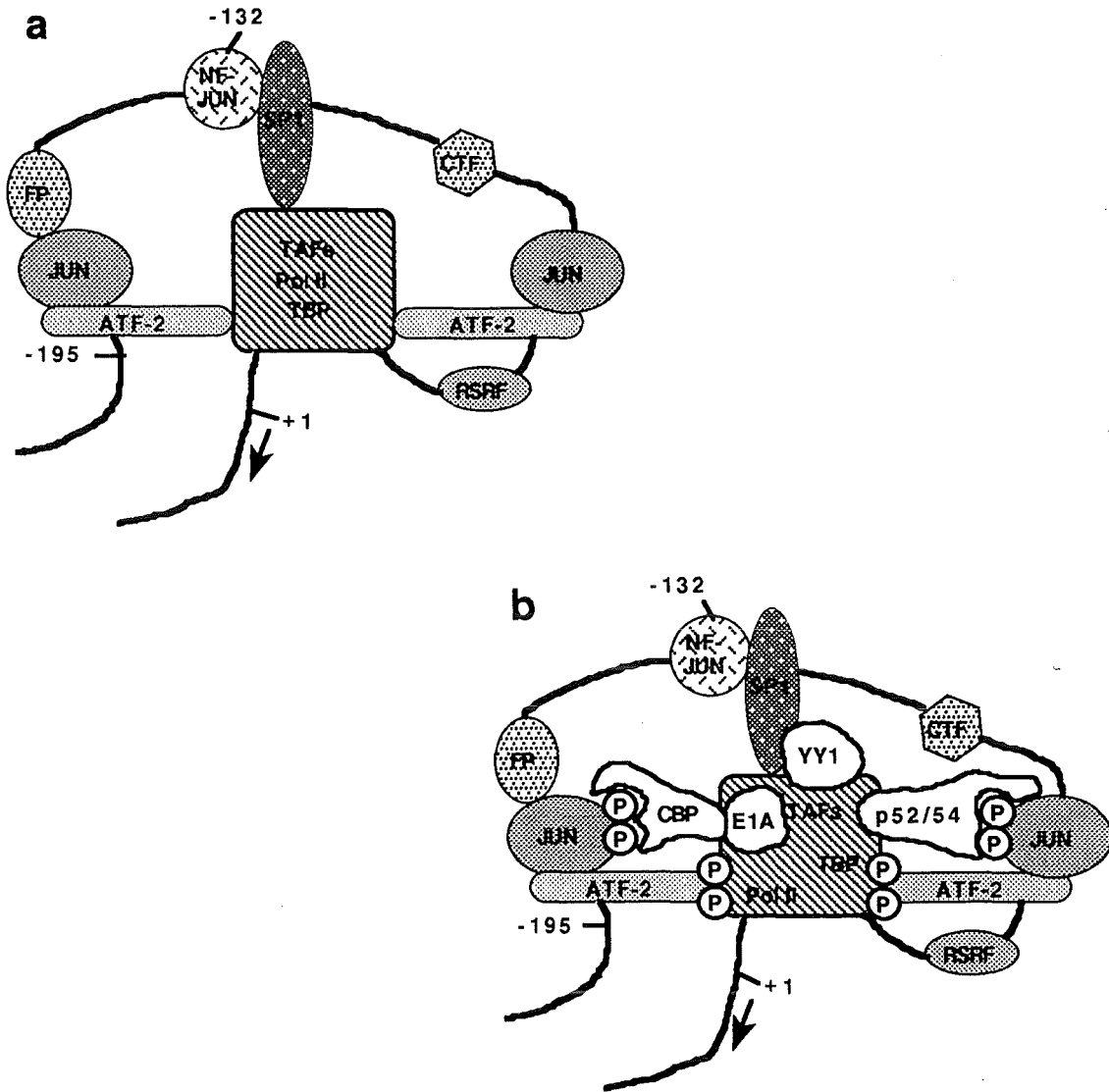


Abb. 30 Schematisches Modell der Regulation des *c-jun* Promotors im basalen und induzierten Zustand. (a) Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren (cJun/ATF-2, CTF, Sp1, NF-Jun, FP, RSRF), sowie die Komponenten des Transkriptionskomplexes (TAFs, Pol II, TBP) interagieren mit dem *c-jun* Promotor und sind für dessen Basalaktivität verantwortlich. Falls keine Basalaktivität vorhanden ist, wie im Falle von undifferenzierten F9- oder HL60-Zellen, fehlt das Jun-Protein und ATF-2 würde als Homodimer oder als Heterodimer mit einem bis jetzt nicht identifizierten Partner binden (van Dam et al., 1994), die ohne aktivierendes Signal die *c-jun* Expression nicht auslösen können. Sp1 ist über TAF-110 direkt an den Transkriptionskomplex gebunden (Hoey et al., 1993). (b) Nach Aktivierung des *c-jun* Promotors wird, abhängig vom jeweiligen Stimulus, entweder cJun oder ATF-2 oder beide in den Transaktivierungsdomänen phosphoryliert. Dies führt zur Bindung der Ko-Aktivatoren p52/54 (Oehler et al., 1992) und CBP (Arias et al., 1994) an das Jun Protein und damit zu einem aktivierenden Einfluß auf den Transkriptionskomplex. YY1 kann sowohl mit Sp1, als auch mit TBP interagieren (Pugh and Tjian, 1990) und wirkt als Ko-Repressor einer Induktion entgegen. E1A ist ein Ko-Aktivator, der direkt mit TBP und höchstwahrscheinlich mit CBP interagieren kann (Hernandez, 1993, Arias et al., 1994).

Literaturverzeichnis

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

Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F. und Kraft, A. S. (1992). Affinity-purified cJun amino-terminal protein kinase requires serine/ threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 17001-17005.

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

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

Angel, P. (1987c). Struktur der menschlichen Kollagenase und ihre Regulation durch Karzinogene und Tumorpromotoren. Doktorarbeit am Kernforschungszentrum Karlsruhe im Institut für Genetik.

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

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

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

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

Angel, P. (1994). General structure of AP-1 subunits and characteristics of the Jun proteins. In: "The Fos and Jun families of transcription factors", *CRC-press*, Boca-Raton, FL, U.S.A. (Eds. Angel, P., Herrlich, P.), 3-14

Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. und Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**: 226 - 229.

Auer, H.-P., König, H., Litfin, M., Stein, B. und Rahmsdorf, H. J. (1994). Ultraviolet irradiation, although it activates the transcription factor AP-1 in F9 teratocarcinoma stem cells, does not induce the full complement of differentiation associated genes. *Exp. Cell Res.* **213**: 131-138.

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

Bauknecht, T., Jundt, F., Herr, I., Oehler, T., Delius, H., Shi Yang, Angel, P., und zur Hausen, H. (1994). A "switch region" determines cell type specific positive or negative action of YY1 on the activity of the HPV-18 promoter. *J. Virol.*, accepted.

Benbrook, D. M. und Jones, N. C. (1990). Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**: 295-302.

Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscot, S. J., Weintraub, H. und Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between cJun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* **68**: 507-519.

Bernstine, E. G., Hooper, M. L., Grandchamp, S. und Ephrussi, B. (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3899-3903.

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

Black, E. J., Street, A. J. und Gillespie, D. A. F. (1991). Protein phosphatase 2A reverses phosphorylation of cJun specified by the delta domain *in vitro*: correlation with oncogenic activation and regulated transactivation activity. *Oncogene* **6**: 1949-1958.

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

Brach, M., Herrmann, F., Yamada, H., Baeuerle, P. und Kufe, D. W. (1992). Identification of NF-jun, a novel inducible transcription factor that regulates *c-jun* gene transcription. *EMBO J.* **11**: 1479-1486.

Cavaliere, F., Ruscio, T., Tinoco, R., Benedict, S., Davis, C. und Vogt, P. K. (1985). Isolation of three new avian-sarcoma viruses: ASV-9, ASV-17 and ASV-25. *Virology* **143**: 680-683.

Chatton, B., Bocco, J. L., Goetz, J., Gaire, M., Lutz, Y. und Kedinger (1994). Jun and Fos heterodimerize with ATF_a, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene* **9**: 375-385.

Chiu, R., Angel, P. und Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, cJun. *Cell* **59**: 979-986.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol/chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Chrivia, J. C., Kwok, R. P. S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. und Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855 - 859.

Croston, G. E. und Kadonaga, J. T. (1993). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Cell Biol* **5**: 417-423.

De Groot, R. P., Kruijter, F. A. E., van der Saag, P. T. und Kruijter, W. (1990). Ectopic expression of *c-jun* leads to differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **9**: 1831.

De Groot, R. P. und Kruijter, W. (1991). Up-regulation of Jun/AP-1 during differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ.* **2**: 631.

Del Sal, G. und Schneider, C. (1987). A simple and fast method for preparing single stranded DNA template suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **15**: 10047.

Denhardt, D. T. (1966). A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641-646.

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

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

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

Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Saboutry, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1431-1442.

Franklin, C. C., Sanchez, V., Wagner, F., Woodgett, J. R. und Kraft, A. S. (1992). Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human Jun but not JunB regulates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 7247-7251.

Gilbert, W., Maxam, A. und 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 und O. Maaloe), 139-148.

Gille, H., Sharrocks, A. D. und Shaw, P. E. (1992). Phosphorylation of p62^{TCF} by MAP kinase stimulates ternary complex formation at *c-fos* promoter. *Nature* **358**: 414-417.

Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.

Greenberg, M. E. und Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* **311**: 433-438.

Grigoriadis, A. E., Wang, Z.-Q., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Felix, R. Fleisch, H. A. und Wagner, E. F. (1994). cFos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**: 433-448.

Groudine, M., Peretz, M. und Weintraub, H. (1981). Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 281-288.

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

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

Han, R.-H., Lamph, W. W. und Prywes, R. (1992). Mapping of epidermal growth factor-, serum-, and phorbol ester-responsive sequence elements in the *c-jun* promoter. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4472-4477.

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

Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes & Dev.* **7**: 1291 - 1308.

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

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

Herrlich, P. und Ponta, H. (1989). "Nuclear" Oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic programm. *Trends in Genetics* **5**: 112-116.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the cJun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135-2148.

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

Hirai, S.-I., Ryseck, R.-P., Mehta, F., Bravo, R. und Yaniv, M. (1989). Characterization of *junD*: a new member of the *jun* proto-oncogen family. *EMBO J.* **8**: 1433-1439.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.

Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, U., Zimmer, S. G., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R. B., Herrlich P. und Ponta, H. (1993). A link between ras and metastatic behaviour of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res.* **53**:1516-1521.

Jackson, S. P. und Tjian, R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**: 125-133.

Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. und Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell* **71**: 577-586.

Johnson, R. S., van Lingen, B., Papaioannou, V. E. und Spiegelman, B. M. (1993). A null mutation at the *c-jun* locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* **7**: 1309-1317.

Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Anti-tumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**: 1189-1204.

Kerppola, T. K. und Curran, T. (1991). Fos-Jun heterodimers and Jun homodimers bend DNA in opposite orientations: implications for transcription factor cooperativity. *Cell* **66**: 317-326.

Kitabayashi, I., Kawakami, Z., Chiu, R., Ozawa, K., Matsuoka, T., Toyoshima, S., Umesono, K., Evans, R. M., Gachelin, G. und Yokoyama, K. (1992). Transcriptional regulation of the *c-jun* gene by retinoic acid and E1A during differentiation of F9 cells. *EMBO J.* **11**: 167-175.

König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1989). Autoregulation of *fos*: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* **8**: 2559-2566.

König, H. (1991). Cell-type specific multiprotein complex formation over the *c-fos* serum response element *in vivo*: ternary complex formation is not required for the induction of *c-fos*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3607-3611.

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

König, H. (1992). Konstitutiv und induzierbar an die DNA bindende Transkriptionsfaktoren *in vivo*: Vermittler von positiver und negativer Genregulation. Doktorarbeit am Kernforschungszentrum Karlsruhe im Institut für Genetik.

Kouzarides, T. und Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the Fos/Jun interaction. *Nature* **336**: 646.

Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of cJun kinases. *Nature* **369**: 156-160.

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

Lee, J.-S., Galvin, K. M. und Shi, Y. (1993). Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6145-6149.

Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. und Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of cJun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **70**: 777-789.

Livingstone, C. Patel, G. und Jones, N. (1994). ATF-2 contains a phosphorylation dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* zur Veröffentlichung eingereicht.

Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. und Vogt, P. K. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 2848-2852.

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

Mechta, F., Piette, J., Hirai, S.-I. und Yaniv, M. (1989). Stimulation of protein kinase C or protein kinase A mediated signal transduction pathways shows three modes of response among serum inducible genes. *The New Biol.* **1**: 297-304.

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

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

Müller, R., Curran, T., Müller, D. und Guilbert, L. (1985). Induction of *c-fos* during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature* **314**: 546-548.

Nakabeppu, Y. und Nathans, D. (1989). The basic region of Fos mediates specific DNA binding. *EMBO J.* **8**, 3833.

Nomura, N., You-Li, Z., Maekawa, T., Tabata, S., Akiyama, T. und Ishii, S. (1993). Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J. Biol. Chem.* **268**, 4259-4266.

Oehler, T. und Angel, P. (1992). A common intermediary factor (p52/54) recognizing "acidic-blob"-type domains is required for transcriptional activation by the Jun proteins. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5508-5515.

- Oehler, T., Pintzas, A., Stumm, S., Darling, A., Gillespie, D. und Angel, P. (1993). Mutation of a phosphorylation site in the DNA binding domain is required for redox-independent transactivation of AP-1 dependent genes by vJun. *Oncogene* **8**: 1141.
- Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**: 527-538.
- Ogata, R. T. und Gilbert, W. (1978). An amino-terminal fragment of lac repressor binds specifically to lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5851-5854.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**: 683-689.
- Pugh, B. F. und Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* **61**: 1187-1197.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of *c-jun* mediated by MAP kinases. *Nature* **353**: 670-674.
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* **12**: 1005-1012.
- Roeder, R. G. (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *TIBS* **16**: 402-407.
- Rozek, D. und Pfeifer, G. P. (1993). In vivo protein-DNA interactions at the *c-jun* promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5490-5499.
- Rüther, U., Wagner, E. F. und Müller, R. (1985). Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible *c-fos* genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **4**: 1775-1781.

Rüther, U., Garber, Ch., Komitowski, D., Müller, R. und Wagner, E. F. (1987). Deregulated *c-fos* expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* **325**: 412-416.

Rüther, U., Müller, W., Sumida, T., Tokuhisa, T., Rajewski, K. und Wagner, E. F. (1988). *c-fos* expression interferes with thymus development in transgenic mice. *Cell* **53**: 847-856.

Rüther, U., Komitowski, D., Schubert, F. R. und Wagner, E. F. (1989). *c-fos* expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene* **4**: 861-865.

Ryseck, R.-P., Hirai, S. I., Yaniv, M. und Bravo, R. (1988). Transcriptional activation of *c-jun* during the G₀/G₁ transition in mouse fibroblasts. *Nature* **334**: 535-537.

Ryseck, R. P. und Bravo, R. (1991). cJun, JunB and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* **6**: 553-542.

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

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

Schönthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1988a). Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **53**: 779-787.

Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. und 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., Tsukitani, Y. und Feramisco, J. R. (1991). Transcriptional and post-transcriptional regulation of *c-fos* expression by the tumor promoter okadaic acid. *Oncogene* **6**: 423-430.

Schönthal, A., Alberts, A. S., Fost, J. A. und Feramisco, J. R. (1991). Differential regulation of *jun* family gene expression by the tumor

promoter okadaic acid. *New Biol.* **3**: 977-986.

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

Seto, E., Lewis, B. und Shenk, T. (1993). Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature* **365**: 462-464.

Shaw, P. E. und Gille, H. (1994). Involvement of phosphorylation and dephosphorylation in the control of AP-1 activity. In: "The Fos and Jun families of transcription factors", *CRC-press*, Boca-Raton, FL, U.S.A. (Eds. Angel, P.E., Herrlich, P.A.), pp. 71-85.

Sherman, M. L., Stone, R. M., Datta, R., Bernstein, S. H. und Kufe, D. W. (1990). Transcriptional and post-transcriptional regulation of *c-jun* expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 3320-3323.

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

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

Stein, B., Gebel, S., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. und Ponta, H. (1989). Different proteins bind to the phorbol ester responsive sequences in collagenase and *c-jun* promoters. In: "*Gene Regulation and AIDS: Transcriptional activation, retroviruses, and pathogenesis*" Advances in Applied Biotechnology Series, Vol. **7**: T.S. Papas (Ed.), Portfolio Publ. Company, The Woodlands, Texas 37-43.

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

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

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

van Beveren, C., Enami, S., Curran, T. und Verma, I. M. (1984). FBR murine osteosarcoma virus. II. Nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome contains sequences acquired from two cellular genes. *Virology* **135**: 229-243.

van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1990). Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5857-5864.

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

van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. und Angel, P. (1994). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate *c-jun* induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

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

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

Wilhelm, D., van Dam, H., Herr, I., Baumann, B., Herrlich, P. und Angel, P. (1994). Both ATF-2 and cJun are phosphorylated by stress-activated protein kinases in response to UV-irradiation. *J. Immunol.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

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

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