

KfK 5313
März 1994

**Regulation der DNA-Bindungs-
und Transaktivierungsfunktion
des Transkriptionsfaktors
Jun**

T. Oehler
Institut für Genetik

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Genetik

KfK 5313

**Regulation
der DNA-Bindungs-
und Transaktivierungsfunktion
des
Transkriptionsfaktors
Jun**

Thomas Oehler

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

**Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Jun, die Hauptkomponente des Transkriptionsfaktors AP-1, kann in seiner Aktivität durch Cytokine, Wachstumsfaktoren, Phorbolster, UV (ultraviolette Strahlung) und Proto-Onkogene moduliert werden. Dabei sind sowohl die DNA-Bindungsdomäne als auch die Transaktivierungsdomäne (TAD) Ziele der Regulation durch externe Stimuli. Die Kontrolle der DNA-Bindungsaktivität wird durch zwei Mechanismen beeinflusst: Phosphorylierung und Redox-Regulation. Die Phosphorylierung von Ser-226 führt zu einer Verminderung der DNA-Bindungsaktivität. Mutation von Ser-226 verstärkt die Bindung von Jun an DNA. Im Gegensatz dazu führt die Mutation von Cys-252, der in die Redox-Regulation involvierten Aminosäure, zu einer Aufhebung Jun-abhängiger Transaktivierung durch Hemmung der DNA-Bindung. Jun-abhängige Transaktivierung kann durch gleichzeitige Mutation von Ser-226 wiederhergestellt werden. Interessanterweise werden beide Mutationen im viralen Gegenstück zu cJun, vJun, gefunden. Sie sind die einzigen Aminosäureaustausche in dieser Region. Daraus kann geschlossen werden, daß vJun durch keinen der beiden Regulationsmechanismen mehr beeinflusst werden kann, wobei die Mutation von Ser-226 eine absolute Vorbedingung für Redox-unabhängige Transaktivierung Jun-abhängiger Gene ist.

Der zweite Angriffspunkt, um Jun zu regulieren, ist seine TAD. Phosphorylierung von Ser63 und Ser73 innerhalb dieser Region führt zu einer stärkeren Transaktivierung Jun-abhängiger Gene. Damit Jun seine transaktivierenden Eigenschaften ausüben kann, muß ein Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie hergestellt werden. Ob diese Interaktion direkt oder indirekt ist, wurde in einem *in vivo* Konkurrenzsystem getestet. Koexpression einer Jun-Mutante, die nur noch die Jun-TAD besitzt, führt zur Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung. Dies bedeutet, daß die Jun-Mutante und Wildtyp-Jun um einen Faktor (Koaktivator) konkurrieren, der für Transaktivierung essentiell ist. Dieser Effekt ist abhängig von der Anwesenheit der kompletten Jun-TAD. Außerdem ist die Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung abhängig von der Phosphorylierung der Jun-TAD. Mutation von Ser63 und Ser73 führt zu einer 50%igen Reduktion der Konkurrenzfähigkeit. Des Weiteren konnte im *in vivo* Konkurrenzsystem eine zusätzliche Region in cJun identifiziert werden, die ebenfalls für Transaktivierung wichtig ist. Die Fähigkeit, mit dem Jun-abhängigen Koaktivator zu interagieren, ist auf saure TADs beschränkt. Die TADs von JunB, GAL4 und VP16, welche alle saure TADs besitzen, können die Aktivität von Jun hemmen. Im Gegensatz dazu ist dies durch die TADs von GHFI, SRF und ER nicht möglich. Diese Transkriptionsfaktoren sind durch einen anderen Typ von TAD charakterisiert.

Es konnten 3 Proteine mit einem Molekulargewicht von 52, 53 und 54kd (p52/54) identifiziert werden, die direkt mit der TAD von Jun interagieren. Deletionen innerhalb der Jun-TAD führen zum Verlust der Interaktion. VP16 bindet ebenfalls an diese Proteine. In Anwesenheit von VP16 ist die Interaktion zwischen der Jun-TAD und p52/54 stark gehemmt, was mit der Eigenschaft von VP16 korreliert, Jun-abhängige Transaktivierung hemmen zu können. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß p52/54 diejenigen Proteine sind, die Jun-abhängige Transaktivierung auf die basale Transkriptionsmaschinerie übertragen und daß diese Interaktion durch Phosphorylierung der Jun-TAD reguliert wird.

Summary

Regulation of the DNA-binding- and transactivation activity of the transcription factor Jun

The activity of Jun, the major component of the transcription factor AP-1, is regulated in response to cytokines, growth factors, phorbol ester, UV light and proto-oncogene products. Targets for regulation within the Jun protein are its TAD (transactivation domain) as well as the DNA binding domain. The DNA binding activity is controlled by two different mechanisms: phosphorylation and redox regulation. Phosphorylation of a single serine residue within the DNA binding domain (ser-226) negatively affects binding activity. In contrast, mutation of the cysteine residue at position 252 (cys-252), which is thought to be involved in redox regulation, completely abolishes transactivation activity by interfering with DNA binding. Additional exchange of ser-226 to phenylalanine completely restores transcriptional activation. Interestingly, both mutations are found in the viral counterpart of cJun, vJun, suggesting that vJun escapes down regulation by both mechanisms. However, mutation of ser-226 is a prerequisite for redox independent activity of vJun.

The second target of regulating Jun activity is its TAD. Phosphorylation of two serine residues (ser-63, ser-73) within this region leads to a strong enhancement of Jun-dependent transactivation. For transactivation, a direct or indirect interaction with components of the basal transcriptional machinery is absolutely required. To discriminate between these possibilities, an *in vivo* competition system has been established which allows to compete for Jun-dependent transactivation by co-expression of a Jun mutant which only contains the TAD. Jun-dependent transactivation was specifically affected upon co-expression of the Jun mutant, whereas basal level transcription in the absence of wild-type Jun was not influenced. This finding suggests an indirect interaction between Jun and the components of the basal transcriptional machinery through a titrable bridging protein (co-activator) to mediate the transactivation function of Jun. The ability of the Jun mutant to compete for Jun-specific transactivation is dependent on the complete TAD. Mutation of transactivationally active subdomains within the Jun-TAD abolishes its competition potency. Additionally, mutation of the serine residues, which are necessary for enhanced transactivation by Jun, strongly affects competition activity suggesting a phosphorylation dependent interaction between the TAD of Jun and its co-activator. Furthermore, an additional region within the cJun-TAD which is important for complete transactivation activity was identified by the *in vivo* competition analysis. The ability to interact with the Jun-dependent bridging protein is not restricted to Jun. Other

transcriptional activators containing acidic TADs such as JunB, GAL4 and VP16 are also able to interact with the Jun-dependent co-activator. Transcriptional activators characterized by a different type of TAD are not able to compete for Jun-dependent transactivation (GHFI, ER and SRF). These results suggest that the TADs of Jun, JunB, GAL4, and VP16 interact with a common factor required for transcriptional activation that can be characterized by its property to recognize TADs containing acidic amino acid residues.

Immunoprecipitation of exogenously expressed Jun-TAD in F9 cells led to the identification of three proteins with molecular masses of 52, 53 and 54kd (p52/54) which can be coprecipitated with the Jun-TAD using a Jun-specific antiserum. Coprecipitation of p52/54 strictly depends on the presence of the complete Jun-TAD which correlates with the characteristics of such mutants in the *in vivo* competition system. Coexpression of VP16, which is able to compete for Jun-dependent transactivation, also interferes with the association between p52/54 and the Jun-TAD. These data strongly suggest that p52/54 represent the proteins which mediate Jun-dependent transactivation to the basal transcriptional machinery which is regulated by phosphorylation of the Jun-TAD.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	1
EINLEITUNG	3
MATERIAL UND METHODEN	15
MATERIAL	15
Bezugsquellen.....	15
Zellen und Bakterien	18
Kulturmedien.....	18
Antikörper.....	20
Plasmidkonstruktionen	20
Oligonukleotide	24
METHODEN	25
Arbeiten mit Bakterien	25
Herstellung von Agarplatten	25
Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1986)	25
Transformation kompetenter Bakterien	25
Einfrieren von Bakterien.....	26
Herstellung von "Magnesiumbakterien".....	26
Behandlung von Nucleinsäuren.....	26
Spektrophotometrische Bestimmung der Nucleinsäure-Konzentration	26
Phenol/Chloroform-Extraktion	26
Präzipitation von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....	27
Plasmid-DNA-Präparation.....	27
Minipräparation von Plasmid-DNA (Del Sal und Schneider, 1987)	28
Präparation genomischer DNA aus Zellen	28
Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	28
Dephosphorylierung von DNA	29
Phosphorylierung von Linkern	29
Linker-Ligation	29
Ligation von Vektoren und DNA-Fragmenten.....	29
<i>In vitro</i> Mutagenese.....	30
Hybridisierung ("Annealing") einzelsträngiger Oligonukleotide	30
DNA-Sequenzierung.....	30
Gel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten.....	30
Agarose-Gelelektrophorese.....	30
Acrylamid-Gelelektrophorese.....	31

Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele.....	31
Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose- und Polyacrylamidgelen.....	32
Vorbereitung von Dialyseschläuchen.....	32
Elution von DNA-Fragmenten.....	32
Radioaktive Markierung von DNA.....	32
Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.....	32
Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	33
Southern-Blot (Southern, 1975).....	33
Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiven Proben.....	33
"Gel-Retardations"-Analysen.....	34
Zellkultur.....	34
Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen.....	34
Transfektion von F9-Zellen (Graham und van der Eb, 1973) und "CAT- Assay" (Gorman et al., 1982b).....	35
Proteinbestimmung.....	36
Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (Laemmli 1970).....	36
Aktivierung von Proteingelen.....	36
Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen.....	37
Silberfärbung von Proteingelen.....	37
Färbung von Proteinen für die Injektion von Kaninchen.....	37
Western-Blot.....	37
Immunpräzipitation von Proteinen.....	38
Quellen von ProteinA-Sepharose und Kopplung von Antiseren.....	38
Immunpräzipitation exogen exprimierter Proteine aus Zellen.....	39
Kernextrakt-Präparation aus Zellen (Dignam et al., 1983).....	39
Überexpression und Reinigung von Proteinen aus Bakterien.....	40
Herstellung einer Heparin-Agarose-Säule.....	40
Herstellung einer Jun-Affinitätssäule.....	40
Präparation und Reinigung von löslichem vJun-Protein.....	41
Präparation und Reinigung von unlöslichem vJun-Protein.....	42
Präparation, Reinigung und Renaturierung von Jun-Proteinen für "Gel- Retardations"-Analysen.....	43
Expression und Reinigung von GST (3X)-Fusionsproteinen (Smith und Johnson, 1988).....	43
Biotinylierung von gereinigten GST (3X)-Fusionsproteinen.....	44
Hybridisierung von cDNA-Expressionsbanken und an Filter gekoppelten Proteinen mit biotinylierten Proteinproben.....	45

Herstellung von Antikörpern in Kaninchen.....	46
ERGEBNISSE	47
REDOX-ABHÄNGIGE REGULATION DER BINDUNG VON JUN AN	
DNA	47
Mutation von Cys-252 hemmt cJun-abhängige Transaktivierung <i>in vivo</i>	47
Mutation von Cys-252 verhindert die Bindung von cJun an DNA <i>in vitro</i>	50
Dimere zwischen vJ/cJ Cys-252 und Fos stellen die Aktivität von	
vJ/cJ Cys-252 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> teilweise wieder her.....	54
Ser-226 kompensiert die Inaktivierung durch Cys-252.....	56
REGULATION DER JUN-TRANSAKTIVIERUNGSDOMÄNE	58
Repression Jun-abhängiger Transaktivierung durch vJun und cJun	
Mutanten	58
cJun und JunB konkurrieren um die Bindung an denselben Koaktivator	65
Der Jun-spezifische Koaktivator interagiert mit TADs, die saure	
Aminosäuren enthalten	68
Serin 63/73 und eine weitere Region in der cJun-TAD beeinflussen die	
Affinität von Jun an seinen Koaktivator	73
p52/54 interagiert mit der Jun-TAD	77
Versuche zur Klonierung von p52/54.....	79
DISKUSSION	87
Mutation von Cys-252 verhindert die Bindung von Jun an DNA	87
Teilweise Wiederherstellung der cJun Cys-252 DNA-Bindungsaktivität	
durch Dimerisierung mit Fos.....	89
Mutation in Ser-226 kompensiert die Mutation in Cys-252.....	90
Haben Ser-226 und Cys-252 in der Tumorentstehung eine physiologische	
Relevanz?.....	90
Identifikation von p52/54 als Jun-TAD assoziiertes Protein.....	92
Die Integration von p52/54 in den Transkriptionskomplex.....	93
Die Umsetzung der Jun-TAD Aktivierung durch Phosphorylierung in eine	
erhöhte Genexpression	94
Möglichkeiten zur Klonierung von p52/54	99
Ist p52/54 an der Tumorentstehung beteiligt?	100
LITERATURVERZEICHNIS	103
LEBENS LAUF	117

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinder-Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol-Transferase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cFos	zelluläres Fos
cJ	cJun (zelluläres Jun)
CoA	Coenzym-A
cpm	counts per minute
CTAB	Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dI/dC	Desoxyinosin-5'-phosphat/Desoxycytidin-5'-phosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
ER	Östrogenrezeptor
FCS	Foetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81m/sec ²)
GBq	Gigabequerel
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GHFI	growth hormone factor I
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G418	Geneticin®-Sulfat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kd	Kilodalton
M	molar
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute
mM	millimolar
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	Nuklearer Faktor-kappa B
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
pH	pH-Wert, Ionenstärke
pM	Pikomol
pMol	pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rATP	(ribo)-Adenosin-5'-triphosphat
Redox	Reduktion-Oxidation
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RSV	Rous Sarcoma Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRF	serum response factor
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit/Enzymeinheit
UV	Ultraviolette Strahlung
vFos	virales Fos
vJ	virales Jun

EINLEITUNG

Biochemische Vorgänge in komplexen biologischen Systemen wie einer Zelle müssen streng reguliert werden. Transkriptionsfaktoren spielen dabei eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression nach Induktion durch extrazelluläre Signale wie Cytokine, Wachstumsfaktoren, Phorbol ester und UV (Angel und Karin, 1991). Sie stellen den Endpunkt der Signalkette von der Zellmembran zum Zellkern dar und spielen dadurch eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression (Abb. 1).

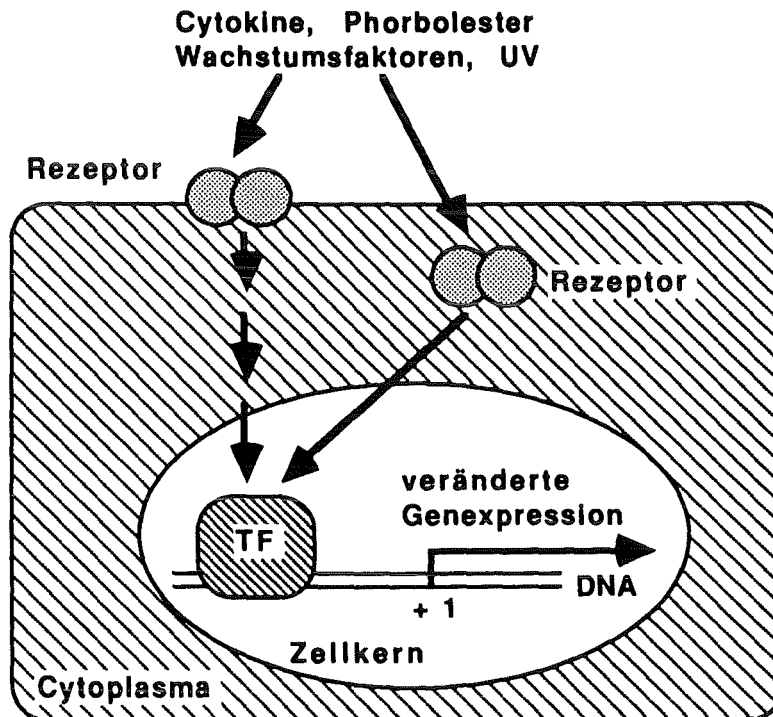


Abb. 1: Schematische Darstellung der Induktion veränderter Genexpression. TF, Transkriptionsfaktor; +1, Initiationsstelle der mRNA-Synthese;

Der Transkriptionsfaktor AP-1

Einer der für die Zelle am bedeutsamsten und am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren ist AP-1 (Aktivator-Protein-1). AP-1 induziert die Expression seiner Zielgene durch Bindung an eine DNA-Sequenz, die als TRE (TPA [12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat] response element) bezeichnet wird (Angel et al., 1987a, 1987b). TREs befinden sich beispielsweise im Metallothionein-, im Kollagenase- und im Stromelysin-Promotor und ebenso innerhalb viraler regulatorischer Elemente wie dem

SV40- (Simian Virus 40) und dem Polyoma-"Enhancer" (Angel und Karin, 1991). Die regulatorischen DNA-Elemente, an die AP-1 bindet, sind sehr ähnlich. Durch Vergleich der Bindungssequenzen konnte eine Konsensussequenz abgeleitet werden, die aus sieben Nukleotiden besteht und für die spezifische Bindung von AP-1 ausreichend ist (5'-TGAG/CTCA-3'; Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987).

AP-1 ist ein Proteinkomplex, der aus zwei Komponenten besteht. Die Bestandteile von AP-1 gehören zu den Mitgliedern der Jun- und Fos-Familie (Rauscher et al., 1988a; 1988b; Franza et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988; Chiu et al., 1988). cJun, ein Vertreter der Jun-Familie, wurde durch seine Sequenzhomologie zu vJun, dem viralen Gegenstück zu cJun (Maki et al., 1987; Vogt et al., 1987), kloniert. vJun und cJun zeigten nach Expression in Bakterien in DNA-Bindungsexperimenten identische Eigenschaften zu AP-1, welches aus HeLa-Zellen gereinigt worden war (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988a; Bos et al., 1988). Außerdem konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* demonstriert werden, daß Jun die Expression eines AP-1-abhängigen Indikatorplasmids induzieren kann (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988a; Bohmann und Tjian, 1989). Hingegen war ein Reporterplasmid mit einer mutierten AP-1 Bindungsstelle durch Jun nicht mehr aktivierbar. Zur Jun-Familie gehören außer cJun (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988a; Bos et al., 1988), JunB (Nakabeppu et al., 1988;) und JunD (Hirai und Yaniv, 1989; Ryder et al., 1989).

cFos, ein Mitglied der Fos-Familie, wurde durch seine Sequenzhomologie zu vFos identifiziert (van Beveren et al., 1983). Bindungsstudien mit der Promotorregion des Adipocyten-spezifischen Gens (aP2; Distel et al., 1987) und Immunpräzipitation eines Fos-Komplexes aus HeLa-Zellen charakterisierten cJun als Partner von cFos im AP-1 Komplex. Nach Separierung des cFos-Komplexes konnte eine Komponente als Protein mit einer Größe von 39kd identifiziert werden. Das 39kd-Protein reagierte mit Antikörpern, die gegen cJun gerichtet waren (Rauscher et al., 1988a; Chiu et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988). Zur Fos-Familie gehören außer cFos (van Beveren et al., 1983), FosB (Zerial et al., 1989), Fra-1 (Cohen et al., 1989) und Fra-2 (Matsui et al., 1990). Sowohl die Mitglieder der Jun- als auch der Fos-Familie haben innerhalb ihrer Familien einen hohen Homologiegrad und einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau. Die Eigenschaften von AP-1, spezifisch innerhalb von Promotorregionen zu binden und nachgeschaltete Gene in ihrer Expression zu modulieren, klassifizieren den Jun/Fos Komplex als Transkriptionsfaktor (Mitchell und Tjian, 1989).

Der strukturelle Aufbau des Jun-Proteins

Der "Leuzin-Zipper"

Für die Bindung von Jun an DNA ist eine Homodimerisierung, eine Heterodimerisierung innerhalb der Jun-Familie oder eine Heterodimerisierung mit Mitgliedern der Fos-Familie notwendig. Alle Mitglieder der Jun-Familie können Homo- und Heterodimere innerhalb der Familie bilden (Halazonetis et al., 1988; Kouzarides und Ziff, 1988; Nakabeppu et al., 1988). Im Gegensatz dazu können die Mitglieder innerhalb der Fos-Familie nicht homo- oder heterodimerisieren. Sie haben deshalb alleine keine DNA-Bindungsaktivität. Hingegen können alle Mitglieder der Fos-Familie Heterodimere mit jedem Mitglied der Jun-Familie bilden. Die Bildung von Homo- oder Heterodimeren erfolgt über eine Struktur, die als "Leuzin-Zipper" bezeichnet wird (Abb. 2; Kouzarides und Ziff, 1988; Landschulz et al., 1988; Gentz et al., 1989; Turner und Tjian, 1989; Ransone et al., 1989; Smeal et al., 1989).

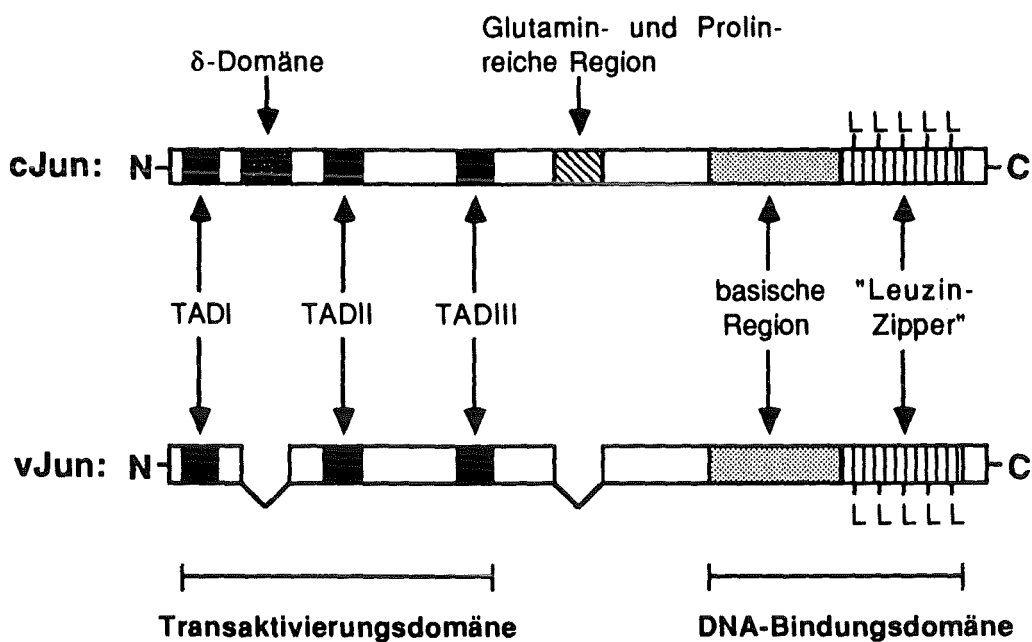


Abb. 2: Schematische Darstellung der vJun und cJun Proteine. N, amino-terminales Ende; C, carboxy-terminales Ende; TAD, Transaktivierungsdomäne; L, Leuzin;

Der "Leuzin-Zipper" ist eine Region von ungefähr 35 Aminosäuren, in der jede siebte Aminosäure ein Leuzin ist (Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989a; 1989b). Das "Leuzin-Zipper"-Motiv hat eine α -helikale Anordnung, wobei jeweils 7 Aminosäuren zwei Windungen der α -Helix bilden. Insgesamt bilden sich 8 Windungen aus. Die

Dimerisierung erfolgt sowohl über hydrophobe als auch über ionische Wechselwirkungen von geladenen Aminosäuren. Die Leuzine entsprechen jeweils Position "d" eines Windungspaares. Eine weitere hydrophobe Aminosäure in Position "a" ist ebenfalls an der Dimerisierung beteiligt. Die geladenen Aminosäuren befinden sich an den Positionen "e" und "g". Dadurch wird eine Struktur gewährleistet, in der sich jeweils hydrophobe und geladene Aminosäuren zweier "Leuzin-Zipper" gegenüberstehen, wodurch eine Dimerisierung erlaubt wird. Die Aminosäuren in den Positionen "b", "c" und "f" sind in der Regel nicht an der Dimerisierung beteiligt (Schürmann et al., 1991; O'Shea et al., 1992). Es gibt jedoch auch Beispiele, die von dieser Regel abweichen (van Dam et al., unveröffentlicht; Deng und Karin, 1993). So spielen beispielsweise die Aminosäuren "b" und "c" bei der Homodimerisierung von JunB eine wichtige Rolle (Deng und Karin, 1993).

Die Interaktion zwischen zwei α -helikal angeordneten Aminosäurebereichen ("coiled coil") wird nicht nur in Dimeren innerhalb und zwischen den einzelnen Mitgliedern der Jun und Fos Familie gefunden. Sie ist eine Struktur, die zum Beispiel auch für die Dimerisierung des Tropomyosins und der Transkriptionsfaktoren Myc und GCN4 verantwortlich ist (Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989a; 1989b).

Die strukturellen Eigenschaften des "Leuzin-Zippers" sind nicht nur für die Dimerisierung, sondern auch für die Spezifizierung des Bindungspartners ausreichend. Zum Beispiel ist Fos zwar in der Lage, mit jedem Mitglied der Jun-Familie Heterodimere zu bilden, jedoch nicht mit anderen Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls eine "Leuzin-Zipper"-Struktur besitzen wie GCN4, Myc oder Fos selbst (Halazonetis et al., 1988; Hirai und Yaniv, 1989; Zerial et al., 1989; Cohen et al., 1989; Nakabeppu und Nathans, 1989; Risse et al., 1989; Gentz et al., 1989; Turner und Tjian, 1989; Ransone et al., 1989; Smeal et al., 1989). Der Transkriptionsfaktor CREB, ein Mitglied der CREB/ATF-Familie, die ebenfalls einen "Leuzin-Zipper" besitzt (Hai et al., 1989; Vogt und Bos, 1990), bildet weder mit cJun noch mit JunB oder cFos Heterodimere (Angel und Karin, 1991). ATFII kann im Gegensatz dazu mit cJun, aber nicht mit cFos Heterodimere formen (Benbrook und Jones, 1990; MacGregor et al., 1990; van Dam et al., 1993).

Die basische Region

Während der "Leuzin-Zipper" für die Interaktion zwischen den Komponenten der Jun- und Fos-Familie verantwortlich ist, wird die Bindung an DNA über eine Region vermittelt, die unmittelbar N-terminal an den "Leuzin-Zipper" anschließt. Diese Region ist durch Aminosäuren charakterisiert, die eine stark positive Ladung besitzen. Sie wird deshalb als basische Region bezeichnet (Abb. 2; Vogt und Bos, 1990). Aufgrund der

negativen Ladung der DNA interagiert die basische Region durch ionische Wechselwirkungen. Wie Sequenzanalysen ergaben, ist die basische Region zwischen den Jun- und Fos-Proteinen ebenso hochkonserviert wie bei den Proteinen der CREB- und ATF-Familie. Alle Kombinantanten zwischen Jun und Fos binden an ein TRE oder an Bindungsstellen, die sich von einer AP-1 Erkennungssequenz nur leicht unterscheiden (Nakabeppu et al., 1988; Nakabeppu und Nathans, 1989; Risse et al., 1989). Sie besitzen jedoch stark unterschiedliche DNA-Bindungsaffinitäten (Ryseck und Bravo, 1991). Der Transkriptionsfaktor CREB bindet als Homodimer an eine Bindungssequenz, die als CRE (cAMP response element) bezeichnet wird (Gonzales et al., 1989). Das CRE und das TRE unterscheiden sich nur in einem Basenpaar (Montminy et al., 1986). Dies zeigt, daß, obwohl CREB und Jun starke Homologien zwischen ihren DNA-Bindungsdomänen besitzen, diese eine hohe Spezifität zu ihren unterschiedlichen Erkennungssequenzen vermitteln können.

Die Transaktivierungsdomäne

Ungleich dem "Leuzin-Zipper" und der basischen Region ist die Transaktivierungsdomäne (TAD), eine dritte funktionelle Region des Jun-Proteins, nicht in die DNA-Bindung involviert. Die TAD ist verantwortlich für die transkriptionelle Aktivierung Jun-abhängiger Zielgene *in vivo* (Angel et al., 1989). Sie befindet sich am N-Terminus (Abb. 2) und ist durch eine starke Anhäufung negativ geladener Aminosäuren charakterisiert (Angel et al., 1989). Innerhalb der TAD sind nur diese Aminosäureregionen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Jun-Familie konserviert (Vogt und Bos, 1990). Die TADs von vJun und cJun unterscheiden sich durch eine 27 Aminosäuren lange Insertion in der cJun-TAD. Diese wird als δ -Domäne bezeichnet und besitzt einen negativ regulatorischen Effekt (Baichwal et al., 1990).

Die Anhäufung negativ geladener Aminosäuren wird nicht nur in der Jun-TAD gefunden, sondern auch in den TADs des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 (Ma und Ptashne, 1987) und des Herpes Simplex Virus Proteins VP16 (Triezenberg et al., 1988). Außer der *in vivo* definierten Jun-TAD wurde *in vitro* eine weitere TAD innerhalb des N-Terminus identifiziert (Bohmann und Tjian, 1989). Diese Region ist Glutamin- und Prolin-reich (Abb. 2). Sie ist nur im menschlichen cJun-Protein vorhanden. Die *in vivo*-Funktion dieses Aminosäurebereiches ist bisher noch nicht geklärt. Sie scheint jedoch *in vivo* nicht in die Transaktivierung involviert zu sein, da eine selektive Deletion dieser Region keinen Einfluß auf die Transaktivierungseigenschaften von cJun hat (Angel et al., 1989; Angel und Karin, 1991).

Behandlung von Zellen mit TPA führt zu einer Dephosphorylierung dieser Aminosäuren und zu einer Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität (Boyle et al., 1991). In vJun, dem viralen Gegenstück zu cJun (Maki et al., 1987), ist das Serin in Position 226 in Phenylalanin mutiert, wodurch eine Phosphorylierungskaskade verhindert und eine Regulation der DNA-Bindungsaktivität nicht mehr möglich ist. Sie ist bereits konstitutiv maximal.

Zum anderen ist für die cJun DNA-Bindungsdomäne ein Regulationsmechanismus vorgeschlagen, der über Reduktion und Oxidation (Redox) eines Cystein-Restes in Position 252 die Bindung von cJun an DNA kontrolliert (Abb. 3; Abate et al., 1990). Oxidation führt zur Hemmung der DNA-Bindung *in vitro*, Reduktion zu deren Aktivierung. In diesen Prozeß ist der Redox-Faktor Ref-1 involviert, eine der Haupt-Redoxaktivitäten in höheren Zellen (Xanthoudakis und Curran, 1992). Dieser Mechanismus wurde bisher nur in einem *in vitro* System demonstriert, seine *in vivo*-Relevanz ist bisher unklar. In vJun ist das Cystein in Position 252 durch ein Serin ausgetauscht. Dadurch würde sich vJun auch diesem Regulationsmechanismus entziehen. Ein anderer Transkriptionsfaktor, der ebenfalls durch Oxidation reguliert wird, ist NF- κ B (Picard und Schaffner, 1984; Sen und Baltimore, 1986; Schreck et al., 1991). Die in diesen Prozeß involvierte Aminosäure ist bisher nicht identifiziert worden. Im Gegensatz zu cJun wird jedoch NF- κ B durch oxidierende Substanzen aktiviert. Durch Oxidation wird der physiologische Inhibitor I- κ B (Baeuerle und Baltimore, 1988) von NF- κ B abgespalten. Dies führt zum Transport von NF- κ B in den Zellkern, wodurch NF- κ B-spezifische Zielgene aktiviert werden (Baeuerle und Baltimore, 1991).

Eine weitere Möglichkeit, um die DNA-Bindungsaktivität von Jun zu regulieren, ist durch Protein-Protein Interaktion. Zum einen wird die DNA-Bindungsaktivität durch die Interaktion mit anderen "Leuzin-Zipper"-enthaltenden Proteinen reguliert. So binden beispielsweise Jun:Jun Homodimere aufgrund ihrer geringeren Stabilität schlechter an DNA als Jun:Fos Heterodimere (Rauscher et al., 1988b). Des Weiteren kann MyoD, ein muskelspezifischer Transkriptionsfaktor, die DNA-Bindung von Jun hemmen (Bengal et al., 1992). Der Glukocorticoid-Rezeptor bindet direkt an den "Leuzin-Zipper" von Jun, obwohl der Rezeptor selbst keine derartige Struktur besitzt. Es wird dadurch die Aktivität von Jun gehemmt ohne dessen DNA-Bindungsaktivität zu verändern (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Im Gegensatz dazu beeinflusst das Adenovirus-Protein E1A die Aktivität des Jun-Proteins vermutlich durch indirekte Interaktion mit der DNA-Bindungsdomäne (Hagmeyer et al., 1993). Genauso variantenreich wie die Regulation der DNA-Bindungsaktivität, ist die Regulation der Transaktivierungsaktivität von Jun.

Die Regulation der Jun-TAD

Die TADs von vJun und cJun unterscheiden sich in einer 27 Aminosäuren langen Deletion in vJun (δ -Domäne; siehe Abb. 2). Dieser Domäne wird eine negative regulatorische Funktion durch Interaktion mit einem zellspezifischen Inhibitor zugeordnet (Baichwal und Tjian, 1990). Die Interaktion kann durch vSrc und EJ Ras aufgehoben werden (Baichwal et al., 1991). Die δ -Domäne kann jedoch nicht der einzige Interaktionspunkt des postulierten Inhibitors mit der Jun-TAD sein, da vJun-abhängige Transaktivierung durch diesen Mechanismus ebenfalls noch gehemmt werden kann. Als zweite interagierende Region wurde eine Aminosäuresequenz identifiziert (A1; Baichwal et al., 1992), die TAD II entspricht (siehe Abb. 2).

Die Aktivität der Jun-TAD kann außerdem ebenso wie die DNA-Bindungsaktivität durch Phosphorylierung reguliert werden (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991; Adler et al., 1992; Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Phosphorylierung innerhalb der Jun-TAD führt zu dessen Aktivierung (Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Dabei sind zwei Serine involviert, die sich an den Positionen 63 und 73 des Jun-Proteins befinden. Die Phosphorylierung dieser Serine kann durch den Phorbol-ester TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat), sowie durch ultraviolettes Licht induziert werden (Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Außerdem ist eine Stimulation der Phosphorylierung durch Ha-Ras (Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991) und durch EGF (epidermal growth factor) und Interleukin-1 möglich (Sachsenmaier, persönliche Mitteilung). An der Phosphorylierung der Jun-TAD ist die MAP-Kinase (mitogen-activated protein serine kinase, ERK; Pulverer et al., 1991) zumindest *in vitro* beteiligt. Damit die MAP-Kinase Jun phosphorylieren kann, ist eine Aktivierungskaskade notwendig, in die Rezeptoren in der Zellmembran, Src, PKC (Proteinkinase C), Ras, Raf-1 und die MAP-KK (MAP-Kinase-Kinase, ERK-K) involviert sind (Marshall, 1993). Die Aktivierung der beteiligten Faktoren erfolgt ebenfalls durch Phosphorylierungen (siehe auch Abb. 24).

Phosphorylierungen erhöhen den Aktivitätsstatus der Jun-TAD, was zu einer erhöhten Genexpression Jun-abhängiger Gene führt. Dies erfordert eine verstärkte Interaktion mit Komponenten, die an der Transkription Polymerase II-abhängiger Gene beteiligt sind.

Von der DNA-Bindung zur Jun-induzierten Genexpression

Um Jun-abhängige Zielgene zu aktivieren, ist zum einen eine Bindung von Jun an DNA, zum anderen eine Interaktion der Jun-TAD mit der basalen Transkriptionsmaschinerie notwendig. Die basale Transkriptionsmaschinerie besteht aus den Komponenten TFIIA, TFIIB, TBP (TATA-binding protein), TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TFII-I und der RNA-Pol II

(RNA-Polymerase II) (Abb. 4; Sawadogo und Sentenac, 1990; Zawel und Reinberg, 1992). Anfänglich war für Transkriptionsfaktoren eine direkte Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie vorgeschlagen (Ptashne, 1986; Stringer et al., 1990; Lin et al., 1991; Lin und Green, 1991). Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch für viele Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, daß für eine Interaktion mit den basalen Komponenten zumindest ein weiterer Faktor benötigt wird (Gill und Ptashne, 1988; Angel et al., 1989; Berger et al., 1990). Diese Faktoren werden als Koaktivatoren, TAFs ("TATA-associated factors") (Tanese et al., 1991; Hoey et al., 1993; Weinzierl et al., 1993) oder Adaptoren (Berger et al., 1992) bezeichnet (Abb. 4).

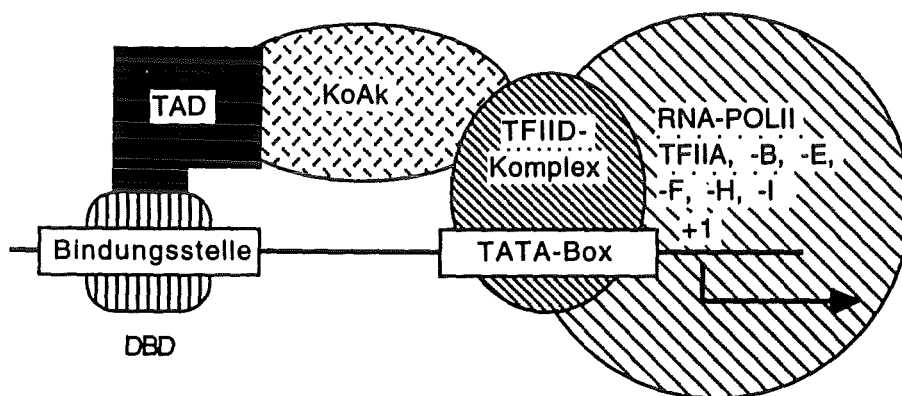


Abb. 4: Schematische Darstellung der durch Transkriptionsfaktoren aktivierten Transkription. DBD, DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors; TAD, Transaktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors; KoAk, Koaktivator; +1, Initiationsstelle der mRNA-Synthese; RNA-Pol II, RNA-Polymerase II; TFIIA, -B, -E, -F, -H, -I, Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie;

Sie sind Bestandteil des TFIID-Komplexes. Von TFIID wurde zunächst angenommen, daß es identisch zu TBP ist. In einem *in vitro* Transkriptionssystem konnte jedoch demonstriert werden, daß TFIID-depletierte Kernextrakte nach Zugabe von rekombinatem TBP in ihrer basalen Transkriptionsaktivität wiederhergestellt werden können, eine durch Transkriptionsfaktoren aktivierte Transkription war allerdings nicht möglich. Unter basaler Transkription wird die Aktivität verstanden, die durch die spontane Ausbildung des basalen Transkriptionskomplexes in Abwesenheit eines transkriptionellen Aktivators beobachtet wird. Erst nach Zugabe von TAFs konnte auch eine Transkriptionsfaktor-abhängige aktivierte Transkription rekonstituiert werden (Tanese et al., 1991). Dies bedeutet, daß Faktoren eine Rolle spielen, die an TBP binden und durch Assoziation an TBP aus den Kernextrakten depletiert wurden. Weitere Untersuchungen zeigten, daß TFIID außer TBP mindestens acht weitere Proteine enthält,

die direkt oder indirekt an TBP assoziiert sind (Hoffmann et al., 1990; Peterson et al., 1990; Pugh und Tjian, 1990; Dynlacht et al., 1991; Pugh und Tjian, 1991; Weinzierl et al., 1993). Es wird angenommen, daß sie die transaktivierenden Eigenschaften von Transkriptionsfaktor zur basalen Transkriptionsmaschinerie durch eine direkte Interaktion vermitteln (Dynlacht et al., 1991; Hoey et al., 1993).

Die Beteiligung von zusätzlichen Faktoren, die für Transkriptionsfaktor-abhängige Transkription eine Rolle spielen, konnte ebenfalls in einem *in vivo* Wettbewerbssystem nachgewiesen werden. Hierbei ist es möglich, die durch einen Transkriptionsfaktor induzierte Genexpression durch die Anwesenheit einer mutierten Version des Transkriptionsfaktors, die nur noch die TAD enthält, zu hemmen (Gill und Ptashne, 1988; Angel et al., 1989; Tora et al., 1989). Diese Hemmung resultiert aus einer Konkurrenzreaktion zwischen der TAD des nicht-mutierten Transkriptionsfaktors und der Mutante. Es wird um Faktoren kompetiert, die für eine Transkriptionsfaktor-abhängige Transkription notwendig sind und durch die Mutante dem System entzogen werden. Diese Art des Nachweises für die Existenz von Koaktivatoren wurde auch für Jun durchgeführt (Angel et al., 1989). Dabei war es möglich, Jun-abhängige Transaktivierung durch gleichzeitige Expression einer Mutante, die lediglich die Jun-TAD enthält, zu hemmen (siehe Abb. 10).

Ziel der Arbeit

Die transaktivierenden Eigenschaften von Jun können auf der Ebene der DNA-Bindung und dem Aktivitätsstatus der TAD reguliert werden. Die DNA-Bindungsfunktion von Jun wird durch Phosphorylierung und einen Redox-Mechanismus reguliert. Die Aminosäure Cystein in Position 252 (Cys-252) des cJun-Proteins ist der Angriffspunkt der Redox-Regulation *in vitro*. In vJun ist Cys-252 gegen Serin ausgetauscht. Dies impliziert, daß vJun nicht mehr durch einen Redox-Mechanismus reguliert werden kann. Anfängliches Ziel war es, in cJun Cys-252 gegen Serin auszutauschen und die physiologische Relevanz dieses Mechanismus' zu untersuchen. Hierfür sollten die transaktivierenden Eigenschaften von cJun und der Mutante in transienten Transfektionen in F9-Teratokarzinom-Zellen unter oxidierenden Bedingungen durch die Zugabe von H₂O₂ untersucht werden. Da die cJun-Mutante überraschenderweise auch unter reduzierenden Bedingungen keine transaktivierenden Eigenschaften aufwies, ergaben sich die Fragen, welcher Mechanismus in vJun den negativen Effekt von Ser-252 auf cJun kompensiert und welche Funktion im cJun Protein durch diesen Aminosäureaustausch gestört ist. Um die erste Frage beantworten zu können, wurden einzelnen Aminosäuren oder ganze Regionen in der inaktiven cJun-Mutante gegen Aminosäuren aus dem vJun Protein

ausgetauscht und versucht, deren transaktivierende Eigenschaften zu rekonstituieren. Für die Klärung der zweiten Frage, wurden die Dimerisierungseigenschaften, die Halblebenszeit, die Funktionalität der TAD und die DNA-Bindungsaktivität der Jun-Mutante untersucht. Die Untersuchungen erfolgten zum einen in transienten Transfektionen in F9-Teratokarzinom-Zellen, zum anderen in *in vitro* DNA-Bindungsstudien mit bakteriell exprimierten Jun Proteinen.

Der zweite Angriffspunkt der Regulation Jun-abhängiger Transaktivierung ist die TAD. Phosphorylierung der TAD führt zu einer Erhöhung des Aktivitätsstatus und resultiert sehr wahrscheinlich in einer verstärkten Assoziation der Jun-TAD zu einem bestimmten Koaktivator. Dabei war von besonderem Interesse, 1) welche Regionen der Jun-TAD mit einem Koaktivator interagieren, 2) ob andere Transkriptionsfaktoren ähnliche Koaktivatoren zur Transaktivierung verwenden und damit ähnliche Transaktivierungsmechanismen besitzen, 3) ob die Affinität dieser Kofaktoren durch Phosphorylierung der Jun-TAD reguliert wird und 4) welche zur Transaktivierung notwendigen Proteine an die Jun-TAD binden. Um die ersten drei Fragen beantworten zu können, wurden *in vivo* Konkurrenzexperimente durchgeführt, in denen es möglich ist, Jun-abhängige Transaktivierung durch die gleichzeitige Expression der homologen TAD, von Jun-TAD Mutanten oder von heterologen TADs zu hemmen.

Durch die exogene Expression der Jun-TAD und dessen Immunpräzipitation aus Zellextrakten, sollten Proteine kopräzipitiert werden, die direkt mit der Jun-TAD interagieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Kopräzipitation dieser Proteine durch die gleichzeitige Expression von TADs, die Jun-abhängige Transaktivierung im *in vivo* Konkurrenzsystem hemmen können, verhindert wird. Um die Gene zu identifizieren, die für Jun-TAD assoziierte Proteine kodieren, sollte die Jun-TAD bakteriell exprimiert werden und damit eine Expressionsbibliothek abgesucht werden. Durch eine *in vitro* Protein-Protein Interaktion könnten die kodierenden Gene der *in vivo* identifizierten assoziierten Proteine kloniert werden.

MATERIAL UND METHODEN

Material

Bezugsquellen

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

Acetyl-CoA	Sigma, München
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Alkalische Phosphatase-gekoppeltes Streptavidin	Sigma, München
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
BIORAD-Proteinassay	Biorad, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
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
Coomassie-Blau (R250)	Serva, Heidelberg
CTAB	Sigma, München
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

Desoxycholsäure (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Sigma, München
DMSO	Fluka, Buchs
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DTE	Sigma, München
DTT	Boehringer, Mannheim
ECL-Kit	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
FCS	Gibco, Karlsruhe
Ficoll	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Freund'sches Adjuvans (complete/incomplete)	Gibco, Karlsruhe
F12-Medium	Gibco, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt
Geneticin [®] -Sulfat	Gibco, Karlsruhe
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma, München
Glutathion-beads	Sigma, München
Guanidinhydrochlorid	Sigma, München
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Detroit
Heparin-Agarose	Pharmacia, Freiburg
HEPES	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hyperfilm XR [®]	Amersham-Buchler, Braunschweig
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	USB, Cleveland
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt

Leuzin	Sigma, München
Lysin	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Roth, Karlsruhe; Sigma, München
Methanol (technisch)	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, München
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimido-Biotin	Sigma, München
Nitrozellulosefilter	Schleicher und Schüll, Dassel
Nonidet P-40	Sigma, München
PEG	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, München
poly dI/dC	Boehringer, Mannheim
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, München
Propanol	Merck, Darmstadt
ProteinA-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Proteinstandards	Biorad, München
rATP	Pharmacia, Freiburg
RPMI (defizient)	Sigma, München
Rhubidiumchlorid	Sigma, München
Saccharose	Serva, Heidelberg
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Spermidin	Sigma, München
TEMED	Biorad, München

Trinatriumphosphat	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Biorad, München
T7-Sequenzierungs-Kit	Pharmacia, Freiburg
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Whatman 3MM [®]	Bender und Hobein, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Zinkchlorid	Sigma, München

Radiochemikalien

D-threo-(dichloracetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (7,4 MBq/ml, 2,11 GBq/mmol), L-³⁵S-Methionin (370 MBq/ml, >37000 GBq/mmol), ¹⁴C-methylierte Proteine, α -³²P-dCTP (370 MBq/ml, 11000 GBq/mmol), γ -³²P-dATP (370MBq/ml, 18500 GBq/mmol) α -³⁵S-dATP (296MBq/ml, 22000 GBq/mmol) wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

Alle Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) und USB (Cleveland) bezogen. Taq-Polymerase für die "polymerase chain reaction" wurde von Amersham-Buchler bezogen, ProteinaseK von Sigma.

Zellen und Bakterien

F9tk⁻: embryonale Maus-Teratokarzinom-Zelllinie. Erhalten von Dr. Peter Angel, Karlsruhe (im nachfolgenden nur noch als F9 bezeichnet).

E. coli XL1 blue: F[']::Tn10 proA+B+ lacI^q Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k-m_k+) supE44 relA1 lac. Dieser Stamm wurde ausschließlich für die Amplifikation von Plasmiden verwendet.

E. coli LysS: hsdS gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1). Enthält endogen das Lysozymgen, welches konstitutiv exprimiert wird. Dadurch läßt sich der Bakterienstamm sehr gut lysieren. Er wurde für die Expression von eukaryontischen Proteinen verwendet.

E. coli X90: Ion⁻. Die Aktivität von Proteasen in diesem Stamm ist sehr gering. Das verhindert die Degradation von Proteinen, die in diesem Stamm exprimiert werden. Er wurde ebenfalls für die Expression von eukaryontischen Proteinen verwendet. Erhalten von Dr. Ulla Günthert, Basel.

Kulturmedien

Kulturmedium für F9-Zellen:

DMEM/F12 (1:1) mit 10% FCS, 2mM Glutamin, 10⁻⁴ M β -Mercaptoethanol

Kulturmedium für metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin

RPMI (ohne Glutamin, Leuzin, Lysin, Methionin), 0,5% FCS, 2mM Glutamin, 2mM Leuzin, 2mM Lysin

TY-Medium:

1% Trypton, 1% Hefeextrakt, 0,1% Casaminsäuren, 0,5% NaCl

M9-Medium:

40mM NaH₂PO₄, 22mM KH₂PO₄, 19mM NH₄Cl, 8,5mM NaCl, 2mM MgAcetat, 0,1mM CaCl₂, 0,2% Glukose, 10 μ g/ml Thiamin, 0,5% Casaminsäuren

M9ZB-Medium:

1% Trypton, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,3% KH₂PO₄, 0,53% Na₂HPO₄, 0,4% Glukose, 1mM MgSO₄

PSI-Medium

2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,4% MgSO₄, 10mM KCl, pH7,7

LB (Luria Bertani)-Medium:

1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl

Antikörper**Kontroll-Kaninchenserum:**

Serum aus nicht-immunisierten Tieren

Jun-Antikörper (PEP-1):

Kaninchenserum gegen ein synthetisches Peptid, welches Aminosäure 209-225 (PIDMESQERIKAERKRM) umfaßt. Das Antiserum erkennt sowohl cJun als auch vJun. Der Antikörper ist affinitätsgereinigt und wurde von Dianova, Hamburg, bezogen.

vJun-Antikörper (Castorp):

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

vJun-Antikörper (Feelgood)

Kaninchenserum gegen 75kd trpE-vJun-Fusionsprotein (enthält das gesamte vJun) (Angel et al., 1988a). Hergestellt von T. Oehler. "Castorp" und "Feelgood" erkennen unterschiedliche Epitope in vJun (T. Oehler, unveröffentlicht).

GHFI-Antikörper:

Kaninchenserum gegen zwei synthetische Peptide aus der Homeodomäne von GHFI (Sequenzen: NH₂-KVERRIKLGYTQTNV-COOH; NH₂-FANEFKVERRIKLGYT-COOH). Diese Sequenzen umfassen die Aminosäuren 140-153 und 135-148 (Bodner et al., 1988). Zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Karin, San Diego.

Ziege anti Kaninchenantikörper:

Ziegenserum gegen Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg).

Plasmidkonstruktionen**Eukaryontische Expressionsvektoren**

Der Expressionsvektor für vJ/cJ wurde durch Klonierung des NcoI/BglII-Fragments aus dem Hühner cJun, welches für die DNA-Bindungsdomäne und 3' nicht-translatierte Bereiche kodiert, in die entsprechenden Restriktionsstellen von vJun/GHFI (siehe unten)

konstruiert. RSV vJ/cJ Cys-252 und RSV vJ/cJ Cys-303 wurde durch Benutzung der äquivalenten DNA-Sequenzen aus dem Hühner cJun (ccJun) konstruiert (die Punktmutanten wurden von David Gillespie, Glasgow, zur Verfügung gestellt). Das NcoI/SalI-Fragment aus der mutierten DNA-Bindungsdomäne wurde bei beiden Mutanten in die NcoI/XhoI-Schnittstellen von vJun/GHFI kloniert. Dadurch werden die GHFI-Sequenzen durch die mutierte DNA-Bindungsdomäne des Hühner cJun's ersetzt. Das Serin in Position 226 wurde durch *in vitro* Mutagenese in Phenylalanin mutiert. Für die PCR wurde ein "primer" verwendet, welcher Serin 226 überspannt (5'-CCCCTGTTCCCGATCGACA-TGGAG-3'). RSV cJ/vJ, RSV cJ/cJ und die entsprechenden Konstrukte, die Punkt-mutationen in der DNA-Bindungsdomäne enthalten, wurden durch Insertion eines HindIII/NcoI-Fragments, welches für die TAD des Hühner cJun's kodiert, konstruiert. Hierfür wurde das Hühner cJun-Gen mit EcoRI linearisiert, das Ende mit der großen Untereinheit der E. coli DNA-Polymerase ("Klenow") aufgefüllt und am 5'-Ende ein HindIII-Linker angehängt. Das HindIII/NcoI-Fragment wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen von RSV vJun (Angel et al., 1989), RSV vJ/cJ und in die RSV vJ/cJ Mutanten kloniert, wodurch die TAD von vJun durch die des Hühner cJun's ersetzt wird. RSV cFos Δ 237 wurde aus RSV cFos/GHFI hergestellt. Dabei wurde aus dem cFos-Anteil das StuI/XhoI-Fragment, welches für Aminosäuren 237-380 kodiert, und alle GHFI-Sequenzen entfernt, der Vektor mit "Klenow" aufgefüllt und religiert (Gebel, 1992).

RSV vJun/GHFI wurde durch Austausch des HindIII/BglII-Fragments in cJun G126 (cJun/GHFI; Theill et al., 1989) gegen das entsprechende Fragment aus vJun/GHFI Δ POU (Angel et al., 1989) hergestellt. Dadurch wird die TAD von cJun in cJun/GHFI gegen die vJun-TAD ausgetauscht. RSV vJun Δ 6-12/GHFI, RSV vJun Δ 6-58/GHFI und RSV vJun Δ 6-91/GHFI wurden durch Austausch eines HindIII/NcoI-Fragments in vJun/GHFI gegen die entsprechenden Fragmente aus RSV vJun Δ 6-12, RSV vJun Δ 6-58 und RSV vJun Δ 6-91 (Angel et al., 1989) hergestellt. Der verbleibende Teil der POU-Domäne, der das Epitop für die Erkennungsstelle des GHFI-Antiserums darstellt (Bodner et al., 1988), wurde in allen vJun/GHFI-Mutanten durch Austausch des BglII/Asp718-Fragments durch das entsprechende Fragment aus RSV cJun/GHFI (Theill et al., 1989) eingesetzt. Um RSV vJun Δ 6-119/GHFI zu konstruieren, wurde RSV vJun Δ 6-58/GHFI mit NcoI linearisiert, die Enden mit "Klenow" aufgefüllt, ein SalI-Linker angehängt und mit SalI nachgeschnitten, um alle vJun-Sequenzen zu entfernen. Die Religation des Vektors führt zur Herstellung von RSV vJun Δ 6-119/GHFI.

RSV GHFI/SRF wurde wie folgt hergestellt: Ein 1000bp BglII/HincII-Fragment aus der SRF-cDNA (Norman et al., 1988), welches für die Aminosäuren 245-508 und 3' nicht-translatierte Sequenzen kodiert, wurde in den Vektor vJun Δ 6-91/GHFI (Angel et al.,

1989) kloniert, der mit XhoI linearisiert, mit "Klenow" aufgefüllt und mit BglII nachgeschnitten war (RSVΔG). Die gesamte DNA-Bindungsdomäne von GHFI wurde durch PCR aus dem Konstrukt cJun/GHFI amplifiziert. Dabei wurden "primer" verwendet, die die Nukleotide 599-623 von cJun (5'-CCCGACGTGGGGCTGCTCAA-GCTG-3') und die Nukleotide 873-851 (unterstrichen) von GHFI umfassen (5'-GGGATCCGTCTCTCTGCACTCAAGATGCTCCTTTG-3'). Das amplifizierte Produkt wurde mit BamHI und BglII nachgeschnitten und in die BglII-Schnittstelle von RSVΔG zwischen den Rous Sarcoma Virus (RSV) "long terminal repeat" (LTR) und die SRF-Sequenzen kloniert. RSV JunB/GHFI, RSV GHFI, pSV vJun, RSV cJun, pUC RSV=RSV0 und pUC SV sind bereits beschrieben (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b, Angel et al., 1988a, Angel et al., 1988b, Theill et al., 1989; Chiu et al., 1989). Dasselbe gilt für die Expressionsvektoren für den ER (Östrogenrezeptor), ER-GAL4 und GAL4-VP16 (Tasset et al., 1990; Webster et al., 1988; Sadowski et al., 1988).

RSV vMYB wurde wie folgt hergestellt: aus pVM116 (Burk et al., 1991) wurde das komplette vMYB-Gen mit Asp718/XbaI herausgeschnitten und mit "Klenow" aufgefüllt. Dieses Fragment wurde in RSV cJun/JunB (Chiu et al., 1989), das mit HindIII/XhoI verdaut und ebenfalls mit "Klenow" aufgefüllt war, kloniert.

cJ S63/73/GHFI wurde durch den Austausch des AccI/Asp718-Fragments in cJun S1+S2 (Pulverer et al., 1991), welches für die cJun DNA-Bindungsdomäne kodiert, gegen ein AccI/Asp718-Fragment aus cJun/GHFI, welches für die DNA-Bindungsdomäne von GHFI kodiert, hergestellt. Um ccJun/GHFI zu konstruieren, wurde das HindIII/NcoI-Fragment aus cJ/cJ in vJunΔ6-91/GHFI, ebenfalls geschnitten mit HindIII/NcoI, kloniert. Dadurch wurden vJun-Sequenzen in vJunΔ6-91/GHFI durch die TAD des Hühner cJun's ersetzt. ccJunS63/73/GHFI ist ein Derivat von ccJun/GHFI. Um die Serine in ccJun/GHFI in Alanine zu mutieren, wurden zwei PCR-Reaktionen mit ccJun/GHFI als "template" durchgeführt. Für die erste Amplifikation wurde ein "primer", der im RSV-Promotor bindet (5'-GAATTCCGC-ATTGCAGAGAT-3') und ein "primer", der Serin 63 überlappt (Position 489-516; 5'-GCCAGCTTCTGCAGCCCCA-CGTCGGGGGCGGTGAGGA-3'), verwendet. Für die zweite Amplifikation wurde ein "primer" verwendet, der Serin 73 überlappt (Position 493-529; 5'-GACGTGGGGCTG-CTTAAGCTGGCCGCCCCGGAGCTG-3'), und ein "primer", der in den GHFI-Sequenzen bindet (Position 443-459 (unterstrichen); 5'-GGGAATTCCACGTTTGTCT-GGGTGT-3'). Mit den erhaltenen Fragmenten wurde eine weitere PCR durchgeführt, um den gesamten Bereich zu amplifizieren. Das erhaltene Fragment wurde HindIII/NcoI geschnitten und in vJunΔ6-91/GHFI, ebenfalls HindIII/NcoI geschnitten, kloniert. vJunS63/73/GHFI wurde auf ähnliche Weise hergestellt. Der Unterschied war, daß vJun/GHFI als "template" benutzt wurde. Die verwendeten "primer" sind identisch. Für

die Herstellung von cJun Δ 146-193/GHFI wurde cJun/GHFI mit SacII linearisiert, mit "Klenow" aufgefüllt und ein BglII-Linker angehängt. Durch Verdau mit BglII wurde das DNA-Fragment, welches für die Aminosäuren 146-193 kodiert, entfernt und der Vektor religiert.

RSV-GAL4-ADA2 wurde aus RSV-GAL4-Fos durch Austausch der Fos-Sequenzen hergestellt. Die gesamte kodierende Region von ADA2 wurde aus dem Hefe-Expressionsvektor pSA5 (Neal Silverman, Boston, unveröffentlicht) durch PCR amplifiziert. Die verwendeten "primer" liegen direkt am 5'-Ende (ADA2-Sequenzen sind unterstrichen; 5'-GGCTCGAGAAGCTTCCAGTATGTCAAACAAGTTTCACIGTGA-3') und am 3'-Ende (ADA2-Sequenzen sind unterstrichen; 5'-CCGATATCGCGGCCGCTTACATCCAATTCTGGCTCTGGA-3') der kodierenden Region für ADA2. Das PCR-Fragment wurde mit BglII/NotI verdaut und in die korrespondierenden Stellen von GAL4-Fos kloniert. Dasselbe PCR-Fragment wurde mit XhoI/NotI verdaut und in vJun/GHFI, geschnitten mit Sall/NotI, kloniert, um RSV-ADA2 herzustellen. Dabei werden vJun und GHFI-Sequenzen durch die gesamte kodierende Region von ADA2 ersetzt. RSV-Jun-ADA2 ist ein Derivat von RSV-GAL4-ADA2. RSV-GAL4-ADA2 wurde mit XhoI linearisiert, mit "Klenow" aufgefüllt und ein BglII-Linker angehängt. Nach Verdau mit BglII/NotI wurde das für ADA2 kodierende Fragment in RSV-Jun-SRFI (Dr. Peter Angel, unveröffentlicht) durch Verwendung der korrespondierenden Schnittstellen kloniert. Dabei werden die SRF-Sequenzen durch ADA2-Sequenzen ersetzt.

Reporterplasmide

-73/+63 CollCAT, -73/+42 tkCAT, SV2-CAT und RSV-CAT sind bereits beschrieben (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b, Angel et al., 1988a, Angel et al., 1988b). Das CAT-Reporterplasmid, welches Bindungsstellen für vMYB besitzt, wurde bereits beschrieben (Burk et al., 1991). GH-CAT ist bereits beschrieben (Theill et al., 1989). Das GAL4-Reporterplasmid ist ebenfalls bereits beschrieben (Schmitz und Baeuerle, 1991).

Bakterielle Expressionsvektoren

vJun, cJ/cJ, cJun Cys-252 und cJ Cys-303 wurden durch *in vitro* Mutagenese als NdeI/EcoRI-Fragmente in den bakteriellen Expressionsvektor pRK171 (Studier et al., 1990) kloniert. Die für die PCR verwendeten "primer" entsprechen den 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des vJun-Gens, beziehungsweise des Hühner cJun-Gens (5'-AGTGCACATATGGAGCCTACTTTCT-ACGAG-3' und 5'-GTTCTGGAATTCTCA-

AAACGTTTGCAACTG-3'). Für die Herstellung von bZipFos wurde ein BglII/StuI-Fragment des FBJ MSV (Sarkomvirus, welches vFos enthält; van Beveren et al., 1983), welches den "Leuzin-Zipper" und die basische Region des vFos-Proteins umfaßt, in den bakteriellen Expressionsvektor pGex3X (Smith und Johnson, 1988) kloniert. Hierfür wurde das BglII/StuI-Fragment mit "Klenow" aufgefüllt und in die SmaI-Schnittstelle von pGex3X eingesetzt. Die bakteriellen Expressionsvektoren für das Hühner cJun, die Punktmutanten cJ Cys-252 und Cys-303, vJun sowie für bZipFos wurden von Dr. Alex Pintzas, Straßburg, hergestellt.

Für die Herstellung von p3X-Jun-TAD wurde ein Sall/BglII-Fragment aus RSV-vJM (Angel et al., 1989), welches für die vJun-TAD kodiert, mit "Klenow" aufgefüllt und in die SmaI-Schnittstelle von pGex3X (Smith und Johnson, 1988) eingefügt. p3X-Jun-DBD entstand durch Verdau von RSV-cJM mit NaeI und anschließender Ligation eines BamHI-Linkers. Nach Verdau mit BamHI und EcoRI konnte die Region, welche für die DNA-Bindungsdomäne von cJun kodiert, in die BamHI/EcoRI-Schnittstellen von pGex-1 (Smith und Johnson, 1988) kloniert werden (p3X-Jun-DBD wurde von Dr. Adriana Radler-Pohl zur Verfügung gestellt).

Alle hergestellten Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen oder im Falle von durch *in vitro* Mutagenese hergestellten Konstrukten durch Sequenzierung überprüft.

Oligonukleotide

Kollagenase-TRE ("TPA response element", Position -72 bis -65)

-72 -65

5' -GATCGAGCATGAGTCAGACAC-3'
3' -CTCGTACTCAGTCTGTGCTAG-5

E3-Promotor (Position -96 bis -89)

-96 -89

5' -CCGAAGTTCAGATGACTAACTCAGGG-3'
3' -GGCTTCAAGTCTACTGATTGAGTCCC-5

Oligonukleotide und "primer" wurden von Eurogentec (Seraing), MWG (Ebersberg) und Molbiol (Berlin) bezogen. Linker wurden von Biolabs (Frankfurt) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Methoden

Die beschriebenen Methoden sind, soweit nicht anders angegeben, aus dem Handbuch von Maniatis et al., 1982, abgeleitet.

Arbeiten mit Bakterien

Herstellung von Agarplatten

In einer 1l Flasche wurden die Substanzen für das jeweils herzustellende Medium eingewogen und 16g Agar zugesetzt. Die Mischung wurde mit Wasser auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums auf 45°C wurde für Selektivagarplatten 25µg/ml Chloramphenicol und/oder 100µg/ml Ampicillin zugegeben. Mit 1l Medium können 40 Platten gegossen werden. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1986)

Der Bakterienstamm XL1 blue wurde auf einer Agarplatte mit TY-Medium ausgestrichen und bei 37°C für 16h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6ml Kultur mit PSI-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD von 0,28 (bei 600nm) inkubiert. Mit diesem Ansatz wurde eine 100ml Kultur mit PSI-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD von 0,48 (bei 600nm) wachsen gelassen. Danach wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Nach Sedimentation der Bakterien bei 1500g für 10min. bei 4°C, wurden diese in 10ml vorgekühltem (4°C) TFB I-Puffer (100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM KAc, 10mM CaCl₂, pH 7,8 mit 0,2M Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert) für 3h auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien bei 1500g für 5min. bei 4°C sedimentiert, in 10ml vorgekühltem (4°C) TFB II-Puffer (10mM MOPS pH7, 10mM RbCl₂, 75mM CaCl₂, 15% Glyzerin) 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 gehalten. Nach einem Hitzeschock bei 37°C für 3min. und Inkubation für 3min. auf Eis 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 (100µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und für 16h bei 37°C inkubiert.

Einfrieren von Bakterien

400µl einer Bakterienkultur, die 12h bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde, wurde mit 600µl Glycerin (50%) gemischt und bei -80°C gelagert.

Herstellung von "Magnesiumbakterien"

Vom Bakterienstamm E. coli XL1 blue wurde eine 20ml Kultur (in TY) angeimpft und für 16h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (5min., 4000g), in 10ml 10mM MgSO₄ resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die Bakterien können bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Behandlung von Nucleinsäuren

Spektrophotometrische Bestimmung der Nucleinsäure-Konzentration

Die Nucleinsäuren wurden in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt (DNA 1:100, Oligonucleotide 1:400) und die Extinktion bei 260nm in einem Photometer bestimmt.

$$E_{260} \times 50 = \mu\text{g/ml DNA}$$

$$E_{260} \times 20 = \mu\text{g/ml Oligonucleotid}$$

Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus einer Nucleinsäurelösung wurde diese mit Wasser auf 200µl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (TE-gesättigt; TE: 10mM Tris, 0,1mM EDTA) wurde gut geschüttelt und dieselbe Menge Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 zugegeben. Nach erneutem Schütteln wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (2min. 13000xg) und die Oberphase abgenommen. Diese wurde noch weitere 2 Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 auf die gleiche Weise extrahiert.

Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit Natriumacetat pH4,8 auf eine Endkonzentration von 0,3M eingestellt. Bei der Präzipitation von Oligonukleotiden wurde zusätzlich $MgCl_2$ zugegeben (Endkonzentration 1mM). Nach Zugabe von drei Volumen Ethanol (99,6%) wurde 10min. bei $-80^{\circ}C$ im Ethanol/Trockeneis-Bad inkubiert und 10min. bei 13000xg zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde anschließend mit 200 μ l Ethanol (80%) gewaschen, um das ebenfalls präzipitierte Salz zu entfernen.

Bei der Präzipitation genomischer DNA wurde Ethanol durch Isopropanol ersetzt. Außerdem wurde kein NaAcetat zugesetzt, da im Zellysis-Puffer (siehe Präparation genomischer DNA) bereits genügende Mengen an Salz vorhanden sind, um die genomische DNA zu präzipitieren.

Plasmid-DNA-Präparation

200ml einer Bakterien-Übernachtskultur (Schüttler, $37^{\circ}C$, in TY-Kulturmedium, welches 100 μ g/ml Ampicillin enthält) wurden bei $4^{\circ}C$ und 3600xg für 5min. abzentrifugiert und in 5ml 50mM Tris pH8, 25% Saccharose resuspendiert, in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5ml 50mM Tris pH8, 100mM EDTA, 0,1% Triton X-100 versetzt. Nach 10min. Inkubation bei Raumtemperatur und weiteren 10min. bei $70^{\circ}C$ (Lyse der Bakterien), wurden die Zelltrümmer durch 60min. Zentrifugation bei 30000xg und $4^{\circ}C$ von der Plasmid-DNA getrennt. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 10ml 20% PEG, 1M NaCl in TE (10mM Tris pH8, 0,1mM EDTA) und 90min. Inkubation bei Raumtemperatur präzipitiert, und durch Zentrifugation bei 2400xg sedimentiert. Das DNA-Präzipitat wurde durch 30min. Inkubation bei $37^{\circ}C$ nach Zugabe von 3ml TE gelöst. Zur DNA-Lösung wurden 4,2g Cäsiumchlorid gegeben, dieses bei $37^{\circ}C$ gelöst und 250 μ l einer Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) zugegeben. Diese Lösung wurde in einem Vertikalrotor (Beckmann, VTI65) für 16h mit 55000rpm zentrifugiert. Durch das Cäsiumchlorid bildet sich ein Dichtegradient aus, in dem die Plasmid-DNA, verbliebene genomische und partiell zerstörte Plasmid-DNA entsprechend ihrer verschiedenen Dichtegrade voneinander getrennt werden. Die Plasmid-DNA wird aus dem Dichtegradienten mit einer Spritze abgezogen und unter denselben Bedingungen für weitere 5h erneut im Dichtegradienten zentrifugiert. Nach Abziehen der Plasmid-DNA aus dem Gradienten wird vier Mal mit Wasser-gesättigtem Butanol extrahiert, um das Ethidiumbromid zu entfernen, und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (99,6%) und 4h Inkubation bei $-20^{\circ}C$ präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 16800xg für 20min., $4^{\circ}C$, wurde das DNA-Präzipitat mit 5ml Ethanol (80%) gewaschen und nachfolgend die DNA im Vakuumexsikkator getrocknet.

Minipräparation von Plasmid-DNA (Del Sal und Schneider, 1987)

1,5ml einer Bakterien-Übernachtskultur (Schüttler, 37°C, in TY-Kulturmedium mit 100µg/ml Ampicillin) wurden 5min. bei 4000xg abzentrifugiert, in 200µl STET-Puffer (8% Saccharose, 0,1% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris pH8) resuspendiert und nach Zugabe von 20µl Lysozym (10mg/ml) 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45sec. Kochen in einem Wasserbad wurde 10min. bei 13000xg zentrifugiert, um die Bakterientrümmen von der Plasmid-DNA-Lösung zu trennen. Die Bakterientrümmen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt und der Überstand mit 8µl CTAB (5% in 0,5M NaCl) versetzt. Dadurch wird die DNA präzipitiert. Nach Zentrifugation für 10min. bei 13000xg wurde die DNA in 300µl NaCl (1,2M) gelöst, 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugegeben, für 10min. bei -80°C im Ethanol/Trockeneis-Bad inkubiert und die präzipitierte DNA erneut bei 13000xg zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde danach mit Ethanol (80%) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und die DNA in 50µl TE (10mM Tris, pH8, 1mM EDTA) gelöst.

Präparation genomischer DNA aus Zellen

Von einer Zellkulturschale (ø3cm) mit konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 5ml eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄) gewaschen. Danach wurden 400µl Zellysis-Puffer (10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA, 0,1M NaCl, 1% SDS, 500µg/ml ProteinaseK) auf die Zellen gegeben und 16h bei 37°C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und die genomische DNA mit zwei Volumen Isopropanol präzipitiert, für 10min. bei 13000g zentrifugiert und mit 80% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet, in 1ml H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert,

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Das Schneiden von den DNA mit Restriktionsenzymen wurde jeweils unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen bei optimaler Temperatur durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, beträgt die eingesetzte Menge an Enzym 2U/µg DNA. Die Inkubationsdauer ist 2h. Allen Restriktionsverdau wurde standardmäßig 1µl RNaseA (1mg/ml) zugesetzt.

Dephosphorylierung von DNA

5µg einer mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA wurden mit 1µl alkalischer Phosphatase (2U/µl) und CIP-Puffer (Endkonzentration 50mM Tris pH9, 1mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂, 1mM Spermidin) in einem Volumen von 50µl für 30min. bei 37°C inkubiert. Nach 30min. wurde erneut 1µl alkalische Phosphatase zugesetzt und für weitere 30min. bei 37°C inkubiert. Bei Restriktionsenzymen, die glatte Enden generieren ("blunt ends"), wurde 15min. bei 37°C und 15min. bei 56°C inkubiert, danach 1µl alkalische Phosphatase zugegeben und die Inkubation wiederholt. In beiden Fällen wurde die Reaktion durch Zugabe von 43µl Wasser, 10µl 10xTE (100mM Tris pH8, 10mM EDTA), 2µl 5M NaCl und 2,5µl 20% SDS und 15min. Inkubation bei 68°C gestoppt. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und die Präzipitation der DNA.

Phosphorylierung von Linkern

1µg Linker-DNA wurde mit 1µl 10mM ATP, 1x Linker-Kinase-Puffer (66mM Tris pH7,6, 10mM MgCl₂, 15mM DTT, 1mM Spermidin, 0,2mg/ml BSA) und 1µl T4-Polynukleotid-Kinase (10U/µl) in einem Gesamtvolumen von 10µl für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren bei -20°C gestoppt.

Linker-Ligation

200ng eines phosphorylierten Linkers wurden zu 5µg einer "blunt end" geschnittenen oder mit "Klenow" aufgefüllten DNA gegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15°C in 70mM Tris pH7,5, 7mM MgCl₂, 1,5mM rATP mit 2U T4-DNA-Ligase. Das Gesamtvolumen betrug 20µl. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Ligationsansatz anschließend 15min. bei 68°C inkubiert, Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym nachgeschnitten, um die Enden der DNA auf die entsprechende Restriktionsschnittstelle zu trimmen. Überschüssige Linker wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel entfernt.

Ligation von Vektoren und DNA-Fragmenten

In einem Endvolumen von 25µl wurden 0,02pM linearisierte Vektor-DNA und 0,2pM DNA-Fragment mit 2U T4-DNA-Ligase in 1xLigase-Puffer (20mM Tris pH7,5, 10mM MgCl₂, 10mM DTE, 1,2mM rATP) für 16h bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Einfrieren bei -20°C gestoppt.

***In vitro* Mutagenese**

Alle Punktmutationen und Deletionen innerhalb des Jun-Gens wurden durch PCR ("polymerase chain reaction") hergestellt. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Denaturierung der DNA bei 94°C für 1min., die Kopplung der "primer" bei 52°C für 1,5min. und die Amplifikation der DNA-Fragmente je nach Länge des zu erwarteten Produktes bei 72°C für 1-5min. Die eingesetzte Menge der zu amplifizierenden DNA betrug 20ng, die Menge der "primer" je 20pM. Die Reaktion wurde nach Überschichtung des Ansatzes mit 100µl Mineralöl in 1xPCR-Puffer (50mM KCl, 10mM Tris pH8,3, 1,5mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 10mM dNTPs) durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 100µl. Alle Reaktionen erfolgten in einem Coy TempCycler®.

Hybridisierung ("Annealing") einzelsträngiger Oligonukleotide

Je 0,4-100µg zweier komplementärer Oligonukleotide wurden in 1x"Annealing"-Puffer (10mM Tris pH7,8, 10mM MgCl₂, 10mM DTE, 100mM NaCl) in einem Wasserbad für 1min. auf 100°C erhitzt und anschließend 1h bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. Das Gesamtvolumen betrug zwischen 20-500µl. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden bei -20°C aufbewahrt.

DNA-Sequenzierung

Von einer DNA-Minipräparation wurde 1µg DNA mit 1xAlkali-Puffer (0,2M NaOH, 0,02mM EDTA) in einem Volumen von 200µl für 10min. inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Danach wurde die DNA präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Zur Sequenzierung der DNA wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Es wurde der T⁷Sequencing™-Kit (Pharmacia) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

Gel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten

Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8-1,5% Agarosegele verwendet. Das Gelvolumen beträgt je nach Größe der Gelkammer zwischen 50-200ml. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50-200ml 1xTBE (100mM Tris pH8,3, 100mM H₃BO₃, 1,25mM EDTA) gegeben und 2-5min. im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Zugabe von 5-20µl Ethidiumbromid (10mg/ml) wurde das Gel gegossen und zur Herstellung der Auftragstaschen ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel

ausgehärtet war (30min.) wurde der Kamm entfernt und der Laufpuffer eingegossen. Die Proben wurden in Ficoll-Puffer (1xTBE, 0,6% Ficoll, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100V. Die DNA-Banden wurden unter UV (260nm) sichtbar gemacht.

Acrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 6-20% Gele verwendet. Das Gel wurde zwischen zwei 14x15cm große Glasplatten mit 1mm dicken Abstandhaltern gegossen (30ml einer 6%igen Gellösung: 6ml deionisierte Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) Lösung, 1,5ml 10xTBE (0,5x: 50mM Tris pH8,3, 50mM H₃BO₃, 0,625mM EDTA), 300µl 10% APS, 30µl TEMED, 22,5ml Wasser). Nach Einsetzen eines geeigneten Kamms und 15min. Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Taschen gespült und das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je 400ml 0,5xTBE. Nach Auftragen der Proben in Ficoll-Puffer (1xTBE, 0,06% Ficoll, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) erfolgte die Auftrennung der Fragmente bei 280V. Nach Ende des Laufes wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und 15min. in 1µg/ml Ethidiumbromid in Wasser gefärbt. Unter UV (260nm) wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht.

Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten unter denaturierenden Bedingungen wurden 20x39cm große Glasplatten mit 0,1mm dicken Abstandhaltern verwendet. Für ein 6% Gel werden 30ml Acrylamid-Lösung (6ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8), 1xTBE (100mM Tris pH8,3, 100mM H₃PO₃, 1,25mM EDTA), 8,3M Harnstoff, 250µl 10% APS, 25µl TEMED, Wasser ad 30ml) benötigt. Nach Einsetzen eines geeigneten Kamms und Polymerisation des Gels wird dieses in eine Vertikalkammer eingespannt und zur gleichmäßigen Erwärmung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten jeweils 400ml 1xTBE. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen gespült. Zur Erwärmung des Gels diente ein 30min. Vorlauf bei 30W. Die Proben wurden für 3min. gekocht, auf Eis gestellt und nach nochmaligem Spülen der Taschen aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 30W. Danach wurde eine Glasplatte mit einem dünnen Spatel abgehoben, das Gel auf ein Whatman 3MM[®]-Papier übertragen und getrocknet. Für die Detektion der DNA-Banden wurde auf das getrocknete Gel ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP[®], Amersham) aufgelegt und für 5min. bis 1h bei -80°C exponiert.

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose- und Polyacrylamidgelen

Vorbereitung von Dialyseschläuchen

Dialyseschläuche wurden in 1,42mM EDTA/H₂O für 15min. gekocht. Danach wurden die Dialyseschläuche in 1,25mM EDTA/H₂O gegeben und ein zweites Mal für 15min. gekocht. Der dritte Kochschritt erfolgte in 0,4mM EDTA/H₂O für 15min. Die Dialyseschläuche wurden in 0,4mM EDTA, 0,1mM NaN₃ bei 4°C aufbewahrt.

Elution von DNA-Fragmenten

Nach einem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarose- oder Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die für weitere Schritte zu verwendenden DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit 150µl 0,2xTBE (20mM Tris pH8,3, 20mM H₃BO₃, 0,25mM EDTA) in einen Dialyseschlauch gegeben, in eine Flachbettkammer mit 0,2xTBE gelegt und die DNA aus dem Gelstück durch Elektroelution eluiert (2h, 200V). Um die an der Innenseite des Dialyseschlauchs befindliche DNA abzulösen, wurde für 30sec. umgepolt und die DNA-Lösung aus dem Dialyseschlauch pipettiert. Der Dialyseschlauch wurde anschließend zweimal mit je 100µl Wasser nachgespült und die DNA-haltigen Lösungen vereinigt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA wurde das getrocknete Pellet in 20µl Wasser aufgenommen.

Radioaktive Markierung von DNA

Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

20ng eines doppelsträngigen Oligonukleotids wurden mit 5µl γ -³²P-ATP in 1x Linker-Kinase-Puffer (66mM Tris pH7,6, 10mM MgCl₂, 15mM DTT, 1mM Spermidin, 0,2mg/ml BSA) und 1µl T4-Polynukleotid-Kinase (10U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20µl für 1h bei 37°C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert. Um überschüssiges γ -³²P-ATP zu entfernen, wurde nach der Phenol/Chloroform-Extraktion die DNA dreimal mit Ethanol präzipitiert, anschließend mit 200µl Ethanol (80%) gewaschen und in 100µl Wasser gelöst. Der Einbau beträgt im Durchschnitt 5×10^5 cpm/ng.

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

50-100ng eines gereinigten DNA-Fragments wurden mit 5µl α -³²P-dCTP mit Hilfe des Prime it™-Kits (Stratagene) gemäß dem Herstellerprotokoll markiert. Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide abzutrennen, wurde die DNA dreimal mit Ethanol gefällt, mit 200µl Ethanol (80%) gewaschen und die getrocknete DNA in 200µl Wasser gelöst. Der Gesamteinbau beträgt im Durchschnitt 5×10^5 cpm/ng Fragment.

Southern-Blot (Southern, 1975)

Nach Auftrennung von mit Restriktionsenzymen geschnittener DNA auf einem Agarosegel, wurde das Gel für 10min. in 0,25M HCl geschüttelt. Anschließend wurde das Gel für 30min. in Denaturierungspuffer (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) inkubiert. Danach erfolgte für 2x15min. eine Inkubation des Gels in Neutralisationspuffer (1,5M NaCl, 0,5M Tris pH7,2, 1mM EDTA). Für die Übertragung der DNA aus dem Gel auf eine Membran (Hybond N+™) wurde das Gel auf einen Stapel von fünf Whatman 3MM®, welches mit 20xSSC (3M NaCl, 0,3M Na₃Citrat) getränkt war, gelegt (Oberseite nach unten). Auf das Gel wurde die Membran und ein weiteres mit 20xSSC getränktes Whatman 3MM®-Papier gelegt. Nach Entfernung von Luftblasen wurde ein Stapel von Papierhandtüchern aufgelegt und der Stapel mit 1kg beschwert. Nach 4h war die DNA durch die Saugwirkung der Papierhandtücher auf die Membran übertragen (Kapillar-Blot). Um die DNA auf der Membran zu fixieren, wurde diese für 30min. auf ein Whatman 3MM®-Papier gelegt, welches mit 0,25M NaOH getränkt war. Durch kurzes Schwenken in 5xSSC wurde die Membran wieder neutralisiert. Alle beschriebenen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt und entweder bei 4°C gelagert oder sofort mit einer radioaktiven Probe hybridisiert (siehe unten).

Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiven Proben

Die in eine Folie eingeschweißte Membran wurde mit 25-100ml (je nach Größe der Membran) Church-Puffer (0,5M NaPi pH7,2, 7% SDS, 1mM EDTA) bei 65°C für 1h vorhybridisiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung durch frischen Church-Puffer ersetzt und die denaturierte (5min. 100°C, dann sofort auf Eis), radioaktiv markierte DNA-Probe in die Folie pipettiert. Dabei darf die radioaktive Probe eine Aktivität von $1,5 \times 10^6$ cpm/ml nicht unterschreiten. Nach einer Inkubation von 16h bei 65°C wurde die radioaktive Lösung entfernt und die Membran mit 400ml 40mM NaPi/1%SDS (vorgewärmt auf die jeweilige Waschttemperatur) in mehreren Schritten unter Schütteln

gewaschen: 2x5min. bei 55°, 1x15min. bei 65°C und 1x45min. bei 65°C. Die hybridisierenden Banden werden durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP[®], Amersham) und Exposition bei -80°C detektiert.

"Gel-Retardations"-Analysen

500ng Jun-Protein (siehe Proteinreinigung) wurde in 1x "band-shift"-Puffer (10mM HEPES pH 7,9, 0,2mM EDTA, 100mM NaCl, 100ng BSA, 0,1mM PMSF, 1µg poly dI/dC, 5mM DTT, 4% Glycerin) mit 0,2ng radioaktiv markiertem doppelsträngigen Oligonukleotid für 30min. auf Eis inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 20µl. Als Oligonukleotid wurde entweder die Region von -103 bis -81 aus dem E1A-induzierbaren E3 Promotor (Hurst und Jones, 1987) oder die Region -76 bis -62 aus dem menschlichen Kollagenasepromotor (Angel et al., 1987b) verwendet. Die Proben wurden nach der Inkubation auf Eis direkt auf ein 4-6% Polyacrylamid-Gel geladen, nach dem Lauf (2,5h; 100V) auf Whatman 3MM[®]-Papier getrocknet und ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP[®], Amersham) aufgelegt. Die Exposition erfolgte für 12h bei -80°C.

Zellkultur

Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen

Alle Zellen wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Von subkonfluent gewachsenen Zellen einer 9cm Schale wurde das Medium abgesaugt, mit 1ml 0,05% oder 0,25% Trypsinlösung gewaschen und erneut 1ml Trypsinlösung auf die Zellen gegeben. Nach 1min. Inkubation im Brutschrank wurde 1ml Medium auf die Zellen gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen wurden anschließend bei 330g für 5min. abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 1:5-1:8 verdünnt auf neue Schalen ausgesät. Alle Medien und Trypsin wurden auf 37°C vortemperiert.

Sollten Zellen nicht weiter kultiviert werden, wurden sie nach dem Trypsinieren in Einfriermedium (80% Medium, 10% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, in 1ml-Aliquots auf Einfrier Röhrchen verteilt und sofort auf Eis gestellt. Nach 1h wurden die Zellen für einen Tag bei -80°C aufbewahrt und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde das Einfrier Röhrchen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in 10ml warmes Medium gegeben und bei 330g für 5min. abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml warmem Medium resuspendiert und in eine 9cm Schale gegeben.

Transfektion von F9-Zellen (Graham und van der Eb, 1973) und "CAT-Assay" (Gorman et al., 1982b)

F9-Zellen wurden mit 8×10^5 Zellen pro 9cm Schale 12h vor der Transfektion angesetzt. Für die Herstellung des Präzipitats wurden 10-15 μ g DNA in einem Volumen von 450 μ l mit 50 μ l 2,5M CaCl_2 versetzt und gemischt. Diese Lösung wurde tropfenweise in 500 μ l 2xHBS (280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na_2HPO_4 , pH7,05) unter Schütteln pipettiert. Das Präzipitat wurde 30min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend gleichmäßig im Kulturmedium einer Petrischale verteilt. Nach 7h wurde das präzipitathaltige Medium abgesaugt, einmal mit 10ml 37°C warmem PBS (123mM NaCl, 17mM Na_2HPO_4 , 2,5mM KH_2PO_4 , pH7,3) gewaschen und den Zellen 10ml frisches Medium gegeben. Nach weiteren 16h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 10ml eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml eiskaltem PBS abgeschabt. Die Zellen wurden bei 3000g für 5min. pelletiert. Anschließend wurde zu den pelletierten Zellen 100 μ l 0,25M Tris pH7,8 gegeben und dreimal schockgefroren, um die Zellen aufzubrechen. Die aufgebrochenen Zellen wurden 5min. bei 13000g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellextrakt voneinander zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 5 μ l 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 pH 7,8 auf 78,75 μ l aufgefüllt wurden. Nach Zugabe von 1,25 μ l ^{14}C -Chloramphenicol wurde die Reaktion mit 20 μ l 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 13000g wieder getrennt und die Ethylacetat-Phase abgenommen. Das Ethylacetat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet, das eingedampfte Chloramphenicol in 20 μ l 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 Position der verschiedenen Formen des Chloramphenicols auf den DC-Platten zugeordnet werden. Das nicht-acetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am wenigsten. Die 1'-acetylierten, 3'-acetylierten und die 1', 3'-diacetylierten Formen sind polarer und laufen deshalb höher. 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.

Proteinbestimmung

1-5µl einer Proteinlösung wurden mit 100µl 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 kann eine Eichkurve erstellt und anhand dieser die absolute Proteinmenge einer Proteinlösung ermittelt werden.

Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (Laemmli 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden 10-14%ige Acrylamid-Gele (Trenngel) und ein 5% Kammgel (Sammelgel) benutzt. Die Größe der benutzten Glasplatten betrug 14x15cm oder 24x15cm, die Dicke der Abstandhalter betrug 1mm oder 2mm. Für 40ml eines 10% Trenngels werden 11,2ml Wasser, 15,6ml 1M Tris pH8,8, 13,2ml Acrylamid:Bisacrylamid Lösung (30:0,8), 0,2ml 20% SDS, 0,4ml 10% APS und 20µl TEMED benötigt. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Ethanol (99,6%) überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war (30min.), wurde das Ethanol abgegossen. Für das Sammelgel wurden 7,8ml Wasser, 0,62ml 1M Tris pH6,8, 1,5ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8), 50µl 20% SDS, 40µl 10% APS und 14µl TEMED benötigt. Nach Gießen des Sammelgels wurde ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation (15min.) wurde der Kamm entfernt, die Taschen gespült und das Gel in eine Vertikalkammer eingespannt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je 400ml 1xLaemmli-Puffer (25mM Tris pH8,3, 192mM Glyzin, 0,1% SDS). Die Proben wurden nach 10min. Kochen, kurzem Abzentrifugieren und Abkühlen auf Eis, in 25µl 1xProben-Puffer (5% β-Mercaptoethanol, 2,8% SDS, 14% Glyzerin, 90mM Tris pH6,8, 0,1% Bromphenolblau) auf das Gel geladen und die Proteine bei 30mA für 2,5-6,5h aufgetrennt.

Aktivierung von Proteingelen

Proteingele mit ³⁵S-Methionin markierten Proteinen wurden vor dem Trocknen des Gels aktiviert. Hierfür wurde das Gel nach dem Lauf in 200ml 40% Methanol/12% Essigsäure für 20min. fixiert und anschließend für 20min. gewässert. Für die Aktivierung selbst

wurde das Gel in 200ml 1M Natriumsalicylat für 20min. unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel auf ein Whatman 3MM[®]-Papier gelegt und auf einem Gelrockner getrocknet. Um die radioaktiv markierten Proteine zu detektieren, wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP[®], Amersham) aufgelegt und bei -80°C exponiert.

Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Das Proteingel wurde in Coomassie-Blau-Färbelösung (40% Methanol, 12% Essigsäure, 0,2% Coomassie-Blau) unter leichtem Schütteln für 30min. gefärbt und mit 40% Methanol, 12% Essigsäure so lange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund unterschieden werden konnten.

Silberfärbung von Proteingelen

Proteingele wurden für 2h in 40% Methanol/12% Essigsäure fixiert und anschließend für 2x20min. in 30% Ethanol gewaschen. Zur Oberflächenbehandlung wurde das Gel für 1min. in 0,02% Natriumthiosulfat gegeben und nachfolgend 3x30sec. mit Wasser gewaschen. Die Färbung des Gels erfolgte in 0,2% AgNO₃/0,03% Formaldehyd für 20min. Anschließend wurde 2x1min. mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde in 6% Na₂CO₃/0,02% Formaldehyd/0,02% Natriumthiosulfat 5min. entwickelt, 2x2min. mit Wasser gewaschen und in 40% Methanol/12% Essigsäure aufbewahrt. Alle Lösungen wurden kurz vor Gebrauch hergestellt. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Färbung von Proteinen für die Injektion von Kaninchen

Das Proteingel wurde für 5min. in 10% Methanol/1% Coomassie-Blau gefärbt und für 6h mit Wasser entfärbt. Das zu injizierende Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in einer möglichst geringen Menge PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH7,3) homogenisiert und bei -80°C aufbewahrt.

Western-Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen wurde das Gel auf ein Whatman 3MM[®]-Papier gelegt und auf das Gel eine Nylonmembran, die zuvor für 1min. mit Methanol (100%) aktiviert wurde. Darauf wird nochmals ein Whatman 3MM[®]-Papier gelegt. Der so hergestellte Blot wurde in eine Halterung eingespannt und diese in eine

Blot-Kammer mit 3,5l Blot-Puffer (25mM Tris/Base, 192mM Glyzin, 20% Methanol) gestellt. Die Proteine wurden bei 90V für 3h auf die Membran übertragen. Danach wurde die Membran für 1h mit 100ml 10% Milchpulver in PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH7,3) unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/0,05% Tween20 (je 10ml) wird die Membran mit 5ml des 1. Antikörper (1:1000 in PBS verdünnt, 0,05% Tween20, 1% Gelatine) in eine Folie eingeschweißt und für 4h inkubiert. Danach wurde wiederum für 3x5min. mit je 100ml PBS/0,05% Tween20 gewaschen und die Membran für 1h mit 5ml eines Peroxidase-gekoppelten 2. Antikörper (IgG Ziege gegen Kaninchen, 1:3000 in PBS, 0,05% Tween20, 1% Gelatine) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit je 100ml für 3x5min. in PBS/0,05% Tween20 und 1x5min. in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Detektion der spezifischen Proteinbanden erfolgte mit dem "ECL Western blotting detection system" (Amersham) gemäß den Angaben des Herstellers.

Immunpräzipitation von Proteinen

Quellen von ProteinA-Sepharose und Kopplung von Antiseren

Um Antiseren an ProteinA-Sepharose koppeln zu können, muß diese zunächst gequollen werden. Hierfür wurden 0,5g ProteinA-Sepharose mit 30ml eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH7,3) gemischt und für 2h auf Eis gehalten. Danach wurde die gequollene ProteinA-Sepharose abzentrifugiert und viermal mit je 30ml eiskaltem PBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde jeweils bei 3000g für 2min. zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrritt wurde die ProteinA-Sepharose in 5ml TSA (140mM NaCl, 10mM Tris pH8, 0,025% NaN₃) resuspendiert.

Von der auf diese Weise vorbereiteten ProteinA-Sepharose wurden pro Immunpräzipitation 25µl abzentrifugiert (10000g, 1min.) und der Überstand mit einer Spritze (Kanüle der Größe 26 "gauge") abgezogen. Danach wurde dreimal mit je 1ml eiskaltem RIPA (150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 10mM Tris pH8) gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde jeweils bei 10000g für 1min. zentrifugiert und die Waschlösungen mit einer Spritze (Kanüle der Größe 26 "gauge") abgezogen. Um das Serum zu koppeln, wurden zur ProteinA-Sepharose 20µl RIPA und 3-5µl Antiserum gegeben. Der Ansatz wurde für 12h bei 4°C auf einem Rotatorque gerollt.

Vor der Immunpräzipitation muß das Antiserum, das nicht an die ProteinA-Sepharose gebunden war, entfernt werden. Hierfür wurde die ProteinA-Sepharose abzentrifugiert

und der Überstand mit einer Spritze (Kanüle der Größe 26 "gauge") abgezogen. Danach wurde dreimal mit RIPA gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde jeweils 1min. bei 10000g zentrifugiert und die Waschlösungen mit einer Spritze (Kanüle der Größe 26 "gauge") abgezogen. Die so vorbereitete ProteinA-Sepharose/Antiserum Lösung kann jetzt für die Immunpräzipitation verwendet werden.

Immunpräzipitation exogen exprimierter Proteine aus Zellen

Die Herstellung der Präzipitate für die Transfektion erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 35). 1×10^6 Zellen wurden 3h vor der Transfektion auf einer 9cm Schale ausgesät und transfiziert. Nach 12h wurden die Zellen einmal mit 10ml PBS (123mM NaCl, 17mM Na_2HPO_4 , 2,5mM KH_2PO_4 , pH7,3) gewaschen, 2ml RPMI (ohne Methionin) und $400\mu\text{C}$ L- ^{35}S -Methionin zugegeben und für weitere 2h inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 5ml eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen in 1ml RIPA (150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 10mM Tris pH8) lysiert und die Zelltrümmer vom Extrakt durch Zentrifugation bei 60000g für 30min. bei 4°C getrennt. Um unspezifisch bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen, wurde der Extrakt für 1h durch Rollen auf einem Rotatorque bei 4°C mit $25\mu\text{l}$ eines an ProteinA-Sepharose gekoppelten Präimmunserums inkubiert. Danach wurde die ProteinA-Sepharose mit den unspezifisch bindenden Proteinen abzentrifugiert (10000g, 4°C) und das Lysat mit Hilfe einer Spritze (Kanüle 26 "gauge") zu $25\mu\text{l}$ des an ProteinA-Sepharose gekoppelten spezifischen Antiserums gegeben. Nach 2h Rollen auf einem Rotatorque bei 4°C wurde die ProteinA-Sepharose abzentrifugiert (10000g, 4°C). Sowohl die ProteinA-Sepharose aus dem ersten Präzipitationsschritt als auch die ProteinA-Sepharose aus der spezifischen Präzipitation wurde viermal mit je 1ml eiskaltem RIPA und einmal mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 1min. bei 10000g zentrifugiert und die Waschlösungen mit einer Spritze (Kanüle 26 "gauge") abgezogen. Die ProteinA-Sepharose wurde anschließend in $25\mu\text{l}$ 1xProbenpuffer (5% β -Mercaptoethanol, 2,8% SDS, 14% Glycerin, 90mM Tris pH6,8, 0,1% Bromphenolblau) aufgenommen, für 10min. gekocht, kurz abzentrifugiert und die radioaktiv markierten Proteine auf einem 10-14% Proteingel aufgetrennt.

Kernextrakt-Präparation aus Zellen (Dignam et al., 1983)

Kernextrakte wurden von einer Schale ($\varnothing 9\text{cm}$) mit subkonfluent gewachsenen Zellen (5×10^6) präpariert. Die Zellen wurden zweimal mit je 10ml eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na_2HPO_4 , 2,5mM KH_2PO_4) gewaschen, in 1ml PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und pelletiert (5min., 1500g). Die Zellen wurden in $100\mu\text{l}$ DignamA-

Puffer (10mM HEPES pH7,9, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT) für 15min. auf Eis inkubiert und fünfmal durch eine Kanüle (Größe 26 "gauge") gedrückt, um die Zellen zu lysieren. Die intakten Zellkerne wurden vom Zytoplasma durch Zentrifugation (30sec., 14000g) abgetrennt. Die Zellkerne wurden in 50µl DignamC-Puffer (20mM HEPES, 25% Glycerin, 0,42M NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA pH8, 0,5mM DTT) für 30min. auf Eis inkubiert und die aus dem Zellkern extrahierten Proteine von den Kernmembranen bei 14000g für 5min. abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Extrakts wurde mit dem "Proteinassay" der Firma Biorad bestimmt.

Überexpression und Reinigung von Proteinen aus Bakterien

Herstellung einer Heparin-Agarose-Säule

0,2g Heparin-Agarose wurden für 2h mit 20ml KTM100-Puffer (25mM HEPES pH7,9, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 12,5mM MgCl₂, 20% Glycerin, 100mM KCl, 1mM PMSF) auf Eis inkubiert. Danach wurde zweimal mit je 10ml KTM100-Puffer gewaschen und die Heparin-Agarose in 5ml KTM100-Puffer (0,025% NaN₃) resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 0,7ml in eine Säule gefüllt, mit 10ml KTM100-Puffer gewaschen und die Säule bei 4°C aufbewahrt. Die Bindungskapazität von Heparin-Agarose beträgt 15mg/ml.

Herstellung einer Jun-Affinitätssäule

100µg doppelsträngiger Oligonukleotide, die eine Bindungsstelle für Jun enthalten, wurden kinasiert und für 48h in einem Volumen von 50µl ligiert. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die Oligos präzipitiert. Die Enden der Oligos wurden in 1xM-Puffer (10mM Tris pH7,5, 6mM MgCl₂, 6mM β-Mercaptoethanol, 60mM NaCl, 0,1mg BSA) mit 10µl dNTP-T (dATP, dCTP, dGTP, jedes 2mM) und 50nMol Biotin-11-dUTP mit 20U "Klenow" in einem Gesamtvolumen von 100µl für 30min. bei Raumtemperatur aufgefüllt. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA dreimal mit Ethanol (99,6%) präzipitiert, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Die DNA wurde in 1ml TE (10mM Tris, pH7,5, 1mM EDTA) gelöst.

1ml Streptavidin-Agarose wurde in eine Säule gefüllt, mit 50ml TE, 10ml TE, welches 1M KCl enthielt, und nochmals mit 10ml TE gewaschen. Anschließend wurde die biotinylierte DNA geladen und mit einer Durchflußrate von 5ml/h an die Streptavidin-Agarose gekoppelt. Die Säule wurde anschließend mit 10ml TE, 10ml TE (1M KCl) und 10ml TE gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

Präparation und Reinigung von löslichem vJun-Protein

Von einem Glycerolstock des Bakterienstammes pLys-S, der mit dem Plasmid T7-vJun transformiert wurde, wurden 5x20ml Kulturen angeimpft. Diese wurden in M9ZB-Medium (100µg/ml Ampicillin, 25µg/ml Chloramphenicol) für 16h bei 28°C geschüttelt. Diese Kulturen wurden in jeweils 1080ml M9ZB-Medium (100µg/ml Ampicillin, 25µg/ml Chloramphenicol) überimpft und bis zu einer OD von 0,5 (bei 600nm) bei 28°C geschüttelt. Dann wurde Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG, 0,4mM Endkonzentration) zugegeben, um die Expression von vJun zu induzieren. Nach weiteren 2,5h bei 28°C im Schüttler wurden die Bakterien abzentrifugiert (4000g, 7min., 4°C) und in 125ml PufferE (25mM HEPES pH7,9, 15mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 5mM DTT, 1mM PMSF) resuspendiert. Nach zweimaligem Schockfrieren (-80°C, +37°C) wurden die Bakterien 3x15sec. mit Ultraschall behandelt (Sonifier, Stufe 6, 50% pulse). Um unlösliche Proteine und Bakterientrümmern zu entfernen, wurde 15min. bei 30000g und 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Die einzelnen Fällungsschritte umfaßten die Bereiche 0-20%, 20-40% und 40-60%. Es wurden entsprechende Mengen von fein gemahlenem Ammoniumsulfat langsam dem Überstand unter vorsichtigem Rühren zugesetzt (auf Eis). Nachdem alles Ammoniumsulfat gelöst war, wurde für weitere 30min. vorsichtig gerührt (auf Eis). Danach wurden die präzipitierten Proteine pelletiert (für 30min. bei 30000g, 4°C) und mit dem Überstand der nächste Fällungsschritt durchgeführt (20-40%). Hier wurde genauso verfahren, ebenso für die 40-60% Fraktion. Die pelletierten Proteine wurden in 7,5ml KTM100-Puffer (25mM HEPES pH7,9, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 12,5mM MgCl₂, 20% Glycerin, 100mM KCl, 1mM PMSF) gelöst und gegen 4x11 KTM100-Puffer für jeweils 30min. bei 4°C dialysiert, um das Ammoniumsulfat zu entfernen. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Um zu bestimmen, in welcher Fraktion sich das vJun-Protein befindet, wurden identische Mengen Protein jeder Fraktion durch einen Western-Blot mit einem Jun-spezifischen Antiserum analysiert. Das vJun-Protein befindet sich in der 20-40% Ammoniumsulfat-Fraktion.

Für die weitere Reinigung des vJun-Proteins wurde die 20-40% Fraktion über eine Heparin-Agarose-Säule gegeben. Nach Äquilibrieren der Säule mit 50ml KTM100-Puffer, wurde die 20-40% Ammoniumsulfat-Fraktion auf die Säule geladen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 470µl/min. Danach wurde die Säule mit 10ml KTM100-Puffer gewaschen. Die Elution der Proteine von der Säule erfolgte durch Erhöhung der KCl Konzentration im KTM-Puffer. Es wurden mit je 4ml KTM-Puffer (300mM, 500mM, 800mM, 1M, 2,5M KCl in KTM-Puffer) die Proteine von der Säule

eluiert, wobei jeweils 500µl-Fractionen gesammelt wurden. Von den einzelnen Fractionen wurde jeweils eine Proteinbestimmung durchgeführt und die Fractionen mit der höchsten Proteinkonzentration eines jeden Gradientenschritts vereinigt. Die vereinigten Fractionen wurden 4x30min. bei 4°C gegen je 1l KTM100-Puffer dialysiert. Um die Fraction zu identifizieren, in der sich das vJun-Protein befindet, wurden Western-Blots und "Gel-Retardations"-Analysen durchgeführt. Das vJun-Protein eluiert bei einer Konzentration von 800mM KCl.

Für die weitere Reinigung des vJun-Proteins wurde die vJun-enhaltende Fraction über eine Jun-Affinitätssäule gegeben. Nach dessen Äquilibrierung mit 10ml KTM100-Puffer wurde die dialysierte 800mM KCl-Fraction der Heparin-Agarose-Säule geladen (Durchflußrate 20ml/h). Danach wurde die Säule mit 10ml KTM100-Puffer gewaschen und mit je 1ml KTM-Puffer, der steigende Konzentrationen von KCl enthielt (200mM-800mM in 100mM KCl-Schritten), eluiert (50ml/h). Es wurden 200µl-Fractionen gesammelt und mit jeder Fraction eine "Gel-Retardations"-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, daß das vJun-Protein bei 400-600mM KCl von der Affinitätssäule eluiert. Diese Fractionen wurden vereinigt, 4x30min. gegen jeweils 1l KTM100-Puffer bei 4°C dialysiert und in 20µl-Aliquots bei -80°C gelagert. Die Ausbeute beträgt 0,25µg/µl.

Präparation und Reinigung von unlöslichem vJun-Protein

Bakterien wurden mit dem Plasmid T7-vJun transformiert. Dieses Plasmid kodiert für den aminoterminalen Teil des Tryptophan-E-Proteins und das gesamte vJun-Protein (Angel et al., 1988a). Mit diesen Bakterien wurde eine 10ml-Kultur mit M9-Medium mit 20µg/ml Tryptophan (in DMSO) 24h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden dann für 5min. bei 2000g zentrifugiert, das Sediment mit M9-Medium ohne Tryptophan gewaschen und in 100ml M9-Medium bis zu einer OD von 0,5 (bei 600nm) wachsen gelassen. Die Bakterien wurden anschließend bei 4000g für 10min. abzentrifugiert und in 20ml 10mM Tris pH8, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 2mg/ml Lysozym, 1mM PMSF resuspendiert und 30min. auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Gefrierschock (-80°C, +37°C) wurde dreimal 30sec. mit Ultraschall behandelt (Sonifier, Stufe 6, pulse 50%). Die unlöslichen Proteine wurden 10min. bei 8000g abzentrifugiert und der Niederschlag unter kräftigem Schütteln mit 10ml eiskaltem 10mM Tris pH8, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Nonidet P-40 gewaschen. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit je 10ml eiskaltem 10mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0,5% Nonidet P-40 wurde das Sediment in 1,5ml Probenpuffer (5% β-Mercaptoethanol, 2,8% SDS, 14% Glycerin, 90mM Tris pH6,8, 0,1% Bromphenolblau) resuspendiert, für 30sec. mit Ultraschall behandelt, 3min. gekocht und die Hälfte des Ansatzes auf ein

großes (15x29cm), 2mm dickes 10% SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel entsprechend der Vorschrift zur Färbung von Proteinen für die Injektion von Kaninchen behandelt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und in möglichst wenig PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH7,3) homogenisiert.

Präparation, Reinigung und Renaturierung von Jun-Proteinen für "Gel-Retardations"-Analysen

Proteine für "Gel-Retardations"-Analysen (cJun, vJun, cJun Cys-252, cJun Cys-303) wurden vom Plasmid pRK171 (Studier et al., 1990) exprimiert. Die Plasmide wurden in den E. coli Stamm pLys-S transformiert. Eine 1ml Kultur, die 16h in LB (100µg/ml Ampicillin, 25µg/ml Chloramphenicol) unter Schütteln bei 37°C inkubiert wurde, wurde zu 99ml LB (100µg/ml Ampicillin, 25µg/ml Chloramphenicol) gegeben und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD von 0,4 (bei 600nm) wachsen gelassen. Danach wurde Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) zugegeben (Endkonzentration 0,4mM). Nach weiteren 4h bei 37°C wurden die Bakterien bei 4000xg und 4°C für 10min. pelletiert und in 20ml 50mM Tris pH7,5/5mM EDTA resuspendiert. Die Suspension wurde einmal schockgefroren (-80°C; +37°C) und anschließend für 30min. auf Eis gehalten. Danach wurden 1,4ml 5M NaCl hinzugefügt und geschüttelt. Anschließend wurden 1,5ml Triton X-100 zugesetzt und wieder geschüttelt. Nach Behandlung der Suspension mit Ultraschall (Sonifier, 4x15sec., pulse, Stufe 6) wurde 10min. bei 15000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 10ml 10mM Tris pH7,5 gewaschen und anschließend in 10ml kaltem 20mM Tris pH7,5, 1mM EDTA, 2mM DTT, 0,1% Triton X-100 resuspendiert und kristalliner Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 8M zugegeben. Nach vollständigem Lösen des Pellets wurde viermal gegen je 250ml Puffer A (20mM Tris pH7,5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,1% Triton X-100, 50% Glycerin) bei 4°C dialysiert und die löslichen Proteine bei -80°C gelagert. Auf diese Weise gereinigte Proteine sind im allgemeinen zu 95% rein.

Expression und Reinigung von GST (3X)-Fusionsproteinen (Smith und Johnson, 1988)

Um Glutathion-beads für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen benutzen zu können, müssen diese zunächst gequollen werden. 1g Glutathion-beads wurden mit 30ml eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH7,3) für 2h auf Eis inkubiert. Danach wurden die "beads" dreimal mit je 30ml eiskaltem PBS gewaschen, in 15ml eiskaltem PBS (mit 0,025% NaN₃) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Der Bakterienstamm X90 wurde mit den bakteriellen Expressionsvektoren p3X, p3X-Jun-DBD und p3X-Jun-TAD transformiert. Von diesen Bakterien wurde je eine 20ml-Kultur angeimpft (in LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin) und für 16h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde mit der 20ml Kultur eine 200ml Kultur angeimpft und für weitere 2,5h bei 37°C geschüttelt (in LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin). Dann wurde Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) zugegeben (Endkonzentration 0,1mM), um die Expression der Proteine zu induzieren. Nach weiteren 2h bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert (4000g, 10min., 4°C), in 10ml kaltem Puffer E (25mM HEPES pH7,9, 15mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 5mM DTT, 1mM PMSF, 2mg/ml Lysozym) resuspendiert und dreimal schockgefroren. Danach wurden die Bakterien 4x15sec. mit Ultraschall behandelt (Sonifier, Stufe 6, pulse 50%). Um Bakterientrümmern und unlöslichen Proteinen zu entfernen, wurde 15min. bei 30000g bei 4°C zentrifugiert. Zum Überstand wurden 1ml gequollene Glutathion-beads gegeben und 1h bei 4°C auf einem Rotator gerollt. Die Glutathion-beads mit den gekoppelten Proteinen wurden viermal mit je 20ml eiskaltem PBS (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, pH7,3) gewaschen. Dann wurden die "beads" in eine Säule gefüllt und die gekoppelten Proteine mit 5x500µl eiskaltem Elutionspuffer (50mM Tris pH8, 5mM Glutathion (reduziert)) eluiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt, die Fraktionen mit der höchsten Konzentration vereinigt und für 4x30min. gegen je 1l MES pH8 dialysiert. Die Proteine wurden in 100µl Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert.

Biotinylierung von gereinigten GST (3X)-Fusionsproteinen

200µg eines gereinigten Fusionsproteins¹ wurden mit 200µg N-Hydroxysuccinimido-Biotin (in Dimethylformamid) gemischt und für 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das biotinylierte Protein für 5x3h gegen 50mM MES, pH8 dialysiert, um überschüssiges Biotin zu entfernen.

Hybridisierung von cDNA-Expressionsbanken und an Filter gekoppelten Proteinen mit biotinylierten Proteinproben

Die Prozedur wurde entsprechend dem beschriebenen Protokoll von MacGregor et al. (1990) durchgeführt. 1,5 Millionen Phagen einer induzierbaren cDNA-Expressionsbank (Titer 1x10¹⁰ pfu/ml, zur Verfügung gestellt von Dr. Marian Waterman, San Diego) von Jurkat-Zellen (menschliche T-Zelllinie) wurden mit 5ml "Magnesiumbakterien" des Stammes E. coli XL1 blue gemischt, für 15min. bei 37°C inkubiert und gleichmäßig auf 50 Ansätze verteilt. Zu jedem Ansatz wurden anschließend 7,5ml vorgewärmte Top-

Agarose (0,7% Agarose, 0,8% Trypton, 0,5% NaCl, 50°C) gegeben, kurz gemischt und jeder Ansatz auf eine 15cm Agarplatte (TY-Medium) gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Platten für 4h bei 42°C inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Phagenplaques bereits sichtbar. Dann wurden Nitrozellulosefilter aufgelegt, die mit 10mM Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) getränkt waren, um die Expression der Proteine von der cDNA zu induzieren. Nach weiteren 4h Inkubation bei 37°C wurden die Filter von den Platten entfernt und kurz mit TBST-Puffer (10mM Tris pH8, 150mM NaCl, 0,05% Tween20) gespült. Alle nachfolgenden Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C durchgeführt. Die Proteine auf dem Filter wurden zunächst einer Denaturierung/Renaturierung unterzogen (Vinson et al., 1988). Dazu wurden die Filter zweimal in je 1l HBB-Puffer (20mM HEPES pH7,5, 5mM MgCl₂, 1mM KCl, 5mM DTT) geschüttelt, der 6M Guanidinhydrochlorid enthielt. Anschließend wurden die Filter für 4x5min. in je 1l HBB-Puffer, der 3M Guanidinhydrochlorid enthielt, unter Schütteln inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Filter danach für 30min. in 1l HBB-Puffer (5% fettfreies Milchpulver) geblockt. Die Lösung wurde durch HBB-Puffer (1% fettfreies Milchpulver) ersetzt und für weitere 10min. geschüttelt. Die Filter wurden dann in 200ml HBB-Puffer (1% fettfreies Milchpulver) für 16h mit 200µg biotinyliertem Protein unter vorsichtigem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden die Filter 4x5min. mit PBST (123mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 2,5mM KH₂PO₄, 0,2% Triton X-100) gewaschen und für 1h in 200ml PBS/Streptavidin-alkalisches Phosphatase-Konjugat (1000:1) inkubiert. Anschließend wurden die Filter 3x10min. in PBST gewaschen, auf Whatman 3MM[®]-Papier gelegt und kurz getrocknet. Jeder Filter wurde in jeweils 15ml NBT/BCIP-Lösung (BCIP: 2,5mg 5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz in 50µl Dimethylformamid; NBT: 5mg 4-Nitrotetrazolium-chloridblau in 15ml AP-Puffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9,5)) gelegt. Positive Klone erscheinen als violette Kreise auf dem Filter. Eine Entwicklung der Filter von 5min. war ausreichend, um positive Klone sichtbar zu machen.

Die entsprechenden Phagenplaques wurden aus den Platten ausgestochen, und die Phagen für 12h bei 4°C unter leichtem Schütteln in 1ml SM-Puffer (100mM NaCl, 10mM MgSO₄, 50mM Tris pH8, 0,01% Gelatine) aus dem Agar eluiert. Von diesen Phagen wurden etwa 200 Klone ausplattiert und die Prozedur wiederholt. Danach konnten Einzelklone aus den Agarplatten ausgestochen und weiter analysiert werden.

Wurden Proteine durch Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit biotinyliertem Protein hybridisiert, wurde keine Renaturierung/Denaturierung durchgeführt, da die Proteine beim Blotten renaturieren. Ansonsten wurde die Prozedur

exakt wie oben beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die verwendeten Puffermengen der Größe der Membran angepaßt wurden.

Herstellung von Antikörpern in Kaninchen

6 Wochen alte "Weiße Neuseeländer" (Savo GmbH) wurden zunächst eine Woche ohne irgendwelche Behandlungen gehalten, damit sich die Tiere beruhigen und an ihre neue Umgebung gewöhnen. Blut wurde aus den Ohrvenen mit einem "butterfly" abgenommen. Vor der Injektion des Antigens wurden 40ml Blut abgenommen, die als Kontrollserum dienten. Es wurden grundsätzlich nicht mehr als 40ml Blut abgenommen, um die Kaninchen nicht zu sehr zu schwächen. Dann wurden 100µg gereinigtes vJun Protein mit 500µl Freund'schem Adjuvans ("complete") in einer Spritze gut gemischt und subkutan an mehreren Stellen injiziert. Nach 11 Tagen wurde der erste "boost" abgenommen. Nach weiteren 10 Tagen wurde wieder Antigen injiziert (100µg vJun-Protein gemischt mit 500µl Freund'schem Adjuvans ("incomplete"). Nach weiteren 11 Tagen wurde der zweite "boost" abgenommen. Anschließend wurde nach weiteren 10 Tagen wieder Antigen injiziert, jetzt jedoch nur noch 20µg vJun Protein mit 200µl Freund'schem Adjuvans ("incomplete"). Diese Menge ist ausreichend, um die Immunantwort auf einem hohen Level zu halten. Sie wurde bei allen folgenden Injektionen beibehalten. Bei den darauffolgenden Injektionen und Blutabnahmen wurde der 11/10 Tage-Rhythmus exakt eingehalten. Die erste spezifische Immunantwort konnte nach dem zweiten "boost" in der Immunpräzipitation detektiert werden. Der Antikörper trägt den Namen "Feelgood". Er ist sowohl in der Immunpräzipitation als auch im Western-Blot fähig, Jun-Proteine spezifisch zu erkennen. Nach Abnahme des Bluts nach dem 17. "boost" wurde die weitere Injektion eingestellt. Um das Serum aus dem Blut zu gewinnen, wurde das Blut 16h bei 4°C gelagert, um eine Gerinnung zu erlauben. Danach wurde 30min. bei 3300g zentrifugiert und anschließend nochmals 30min. bei 8800g, um alle Erythrozyten aus dem Serum zu entfernen. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -80°C.

ERGEBNISSE

Redox-abhängige Regulation der Bindung von Jun an DNA

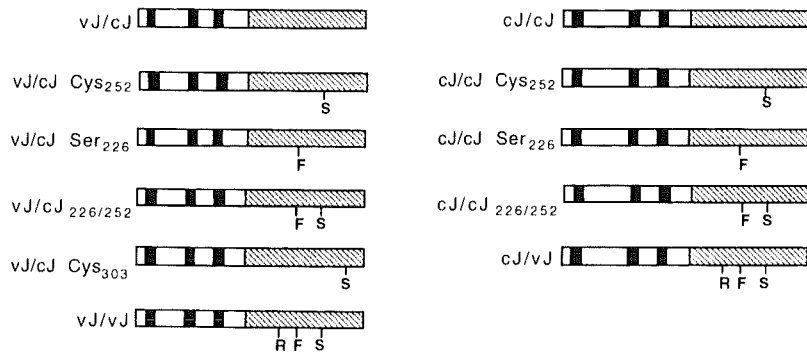
In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß cJun *in vitro* unter oxidativen Bedingungen nicht mehr an DNA binden kann (Abate et al., 1990). Für diese Versuche wurde eine Jun-Mutante verwendet, die nur noch die basische Region und den "Leuzin-Zipper" besitzt. Wird Cys-252*, welches innerhalb der basischen Region liegt, gegen ein Serin ausgetauscht, so kann die cJun-Mutante sowohl unter reduzierenden als auch unter oxidierenden Bedingungen an DNA binden (Abate et al., 1990). Im Gegensatz dazu spielt Cys-303, welches ebenfalls ein Ansatzpunkt für Redox-Regulation sein könnte, im *in vitro* System keine Rolle (Abate et al., 1990). Da alle bisherigen Experimente *in vitro* durchgeführt wurden, sollte geklärt werden, ob Cys-252 und Cys-303 *in vivo* eine physiologische Relevanz für die Regulation der DNA-Bindungsaktivität von Jun besitzen.

Mutation von Cys-252 hemmt cJun-abhängige Transaktivierung *in vivo*

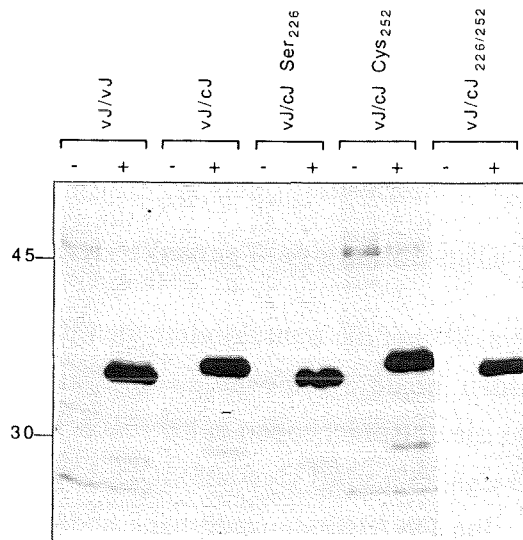
Um die Effekte von Cys-252 und Cys-303 auf die transaktivierenden Eigenschaften von Jun *in vivo* zu untersuchen, wurden beide Aminosäuren separat durch *in vitro* Mutagenese durch Serin ersetzt und die entsprechenden eukaryontischen Expressionsvektoren hergestellt (Abb. 5a; vJ/cJ Cys-252; vJ/cJ Cys-303). Diese Vektoren kodieren für die Wildtyp oder die mutierte cJun DNA-Bindungsdomäne und aus klonierungstechnischen Gründen für die TAD von vJun. Um zu zeigen, daß diese Mutanten äquivalent exprimiert werden, wurden F9-Zellen mit den Konstrukten vJ/cJ, vJ/cJ Cys-252 und vJ/cJ Cys-303 transient transfiziert und die exprimierten Proteine nach metabolischer Markierung der Zellen mit ³⁵S-Methionin mit einem Jun-spezifischen Antiserum präzipitiert. F9-Zellen sind undifferenzierte embryonale Maus-Teratokarzinom-Zellen, die endogen weder Jun noch Fos exprimieren (Kryszke et al., 1987; Angel et al., 1989). Diese Zellen bieten den großen Vorteil, verschiedenste Eigenschaften von exogenem Jun untersuchen zu können, ohne daß diese von endogenem Jun oder endogenem Fos beeinflusst werden. Wie in Abb. 5b demonstriert, werden alle Proteine in vergleichbaren Quantitäten exprimiert.

*In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde das Hühner cJun verwendet. Deshalb beziehen sich alle Zahlenangaben für die Position der Aminosäuren auf das Hühner cJun. Abate et al. verwendeten in ihren Experimenten das Maus cJun, wodurch die Positionsangabe der Aminosäuren anders ist als hier angegeben. Es gibt jedoch keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz selbst. Das Maus cJun und das Hühner cJun sind im Bereich der DNA-Bindungsdomäne zu 100% homolog.

A



B



C

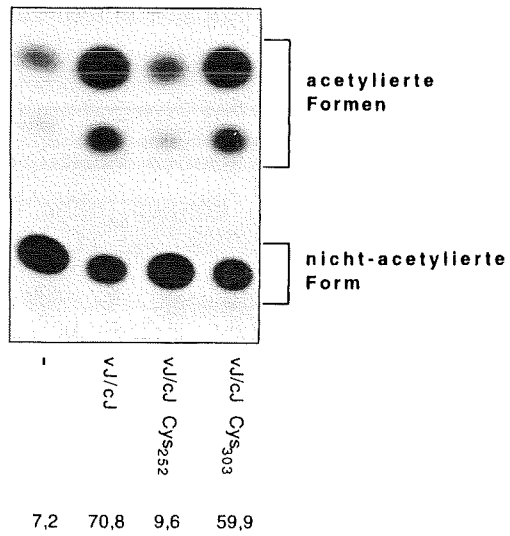


Abb. 5: Mutation in Cys-252 hemmt Jun-abhängige Transaktivierung. (A) Schematische Darstellung von cJun, vJun und den mutierten Formen von vJun und cJun. Schwarz markierte Regionen, TADs innerhalb der cJun und vJun Proteine; weiße Regionen, restlicher Anteil des vJun-Proteins; gepunktete Regionen, restlicher Anteil des cJun-Proteins; schraffierte Regionen, DNA-Bindungsdomäne von cJun und vJun; Cys, Cystein; Ser, Serin; ausgetauschte Aminosäuren innerhalb der DNA-Bindungsdomäne sind gekennzeichnet und im "Ein-Buchstaben-Code" dargestellt; die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen, in denen ein Austausch vorgenommen wurde; die Positionsangabe der Aminosäuren bezieht sich auf das Hühner cJun-Protein; (B) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit je 15µg der angegebenen Expressionsvektoren transfiziert. Nach 12h Stunden wurden die Zellen für 2h in RPMI-Medium, welches ³⁵S-Methionin enthielt, kultiviert und anschließend Gesamtzellextrakte präpariert. Die exogen exprimierten Proteine wurden nach Vorinkubation der Extrakte mit einem unspezifischen Antiserum (-) mit einem Jun-spezifischen Antiserum (+) präzipitiert und die Proteine auf einem 10%igen Proteingel aufgetrennt. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte durch Autoradiographie. Am linken Bildrand sind die Größen der Proteinstandards in kd angegeben. Jun-Proteine, in denen Ser-226 gegen Phenylalanin ausgetauscht ist, zeigen gegenüber den nicht-mutierten Formen sehr wahrscheinlich durch strukturelle Veränderungen innerhalb der Proteine ein leicht verändertes Laufverhalten. (C) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit je 1µg der angegebenen Expressionsvektoren zusammen mit 5µg des -73/+63 CollCAT-Indikatorplasmids kotransfiziert. Bei (-) wurde kein Expressionsvektor transfiziert. Die Menge zu transfizierender DNA wurde mit RSV-0 auf jeweils 10µg aufgefüllt. Anschließend wurde die CAT-Aktivität bestimmt. Die Zahlen beziehen sich auf den prozentualen Umsatz von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierte Formen (Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 10% voneinander abwichen).

Um die transaktivierenden Eigenschaften der von diesen Konstrukten kodierten Hybridproteine untersuchen zu können, wurde außer den Expressionsvektoren ein Indikatorplasmid (Reporterplasmid) kotransfiziert (-73/+63 CollCAT; Angel et al., 1987a, 1987b), in der sich eine Bindungsstelle für Jun befindet, und ein Indikatorgen, welches für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) kodiert und sich 3' von der Jun-Bindungsstelle befindet. Die Region -73/+63 ist zur entsprechenden Region des endogenen menschlichen Kollagenasepromotors identisch. Basale und aktivierte Transkription des -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids werden fast vollständig von der authentischen Startstelle initiiert wie das endogene Kollagenasegen (Angel et al., 1987a). Die mRNA-Synthese des für die CAT kodierenden Gens wird nach Bindung von Jun an seine Bindungsstelle induziert. Dieser Vorgang wird als Transaktivierung bezeichnet. Die dadurch exprimierte CAT kann aufgrund ihrer enzymatischen Eigenschaften nachfolgend dazu verwendet werden, indirekt die transaktivierenden Eigenschaften des Jun-Proteins zu messen. Dieser Nachweis erfolgt in einem "CAT-Assay", in dem -nach Extraktion der

exprimierten CAT aus den Zellen- Chloramphenicol mit Acetyl-CoA als Substrat in acetylierte Formen des Chloramphenicols umgesetzt werden kann (Gorman et al., 1982b). Die entstandenen Produkte werden anschließend chromatographisch aufgetrennt. Das Mengenverhältnis zwischen nicht acetyliertem und acetyliertem Chloramphenicol spiegelt die Jun-abhängige Aktivierung des CAT-Indikatorplasmids wieder. Je nach Aktivitätszustand oder der exprimierten Menge von Jun werden verschiedene CAT-Aktivitäten erhalten.

Die Expression eines vJ/cJ Wildtyp-Hybrids in Gegenwart des -73/+63 ColICAT-Indikatorplasmids führt zu einer starken Transaktivierung (Abb. 5c). Im Gegensatz dazu besitzt vJ/cJ Cys-252 nahezu keine transaktivierenden Eigenschaften mehr (Abb. 5c). Die transaktivierenden Eigenschaften von vJ/cJ Cys-303 sind gegenüber denen des Wildtyps nur leicht schwächer (Abb. 5c).

Mutation von Cys-252 verhindert die Bindung von cJun an DNA *in vitro*

Da eine Cys-252 Mutante *in vitro* noch an DNA binden kann (Abate et al., 1990) und die TAD der des Wildtyp-vJun Proteins entspricht, war die gehemmte Transaktivierung sehr überraschend. Für das Verhalten von vJ/cJ Cys-252 gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Aufgrund der Mutation in Cys-252 könnte die Gesamtstruktur des Proteins derart verändert sein, daß der Transport in den Zellkern gestört ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Expressionsvektoren, die für vJ/cJ Cys-252 und vJ/cJ kodieren, in F9-Zellen transfiziert, Kernextrakte präpariert, die Extrakte auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (Western Blot). Nach Inkubation mit einem Jun-spezifischen Antiserum wurden die exprimierten Proteine mit einem ECL-Detektionskit sichtbar gemacht. Es zeigte sich, daß sowohl die Mutante als auch der Wildtyp mit gleicher Effizienz in den Zellkern transportiert werden (Abb. 6a). Genauso wie der Transport in den Zellkern ist die Halblebenszeit von vJ/cJ Cys-252 gegenüber der von vJ/cJ nicht verändert. Für deren Bestimmung wurden die Expressionsvektoren für vJ/cJ und vJ/cJ Cys-252 transient in F9-Zellen transfiziert, die Proteine metabolisch mit ³⁵S-Methionin markiert und entweder sofort oder nach 2h und 6h Wachstum in nicht-radioaktivem Medium geerntet. Aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte präpariert und eine Immunpräzipitation mit einem Jun-spezifischen Antikörper durchgeführt. Nach autoradiographischer Detektion der präzipitierten Proteine (Abb. 6b) wurden die spezifisch präzipitierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die Menge an Radioaktivität gemessen. Die Halblebenszeit beider Proteine beträgt ungefähr 90 Minuten.

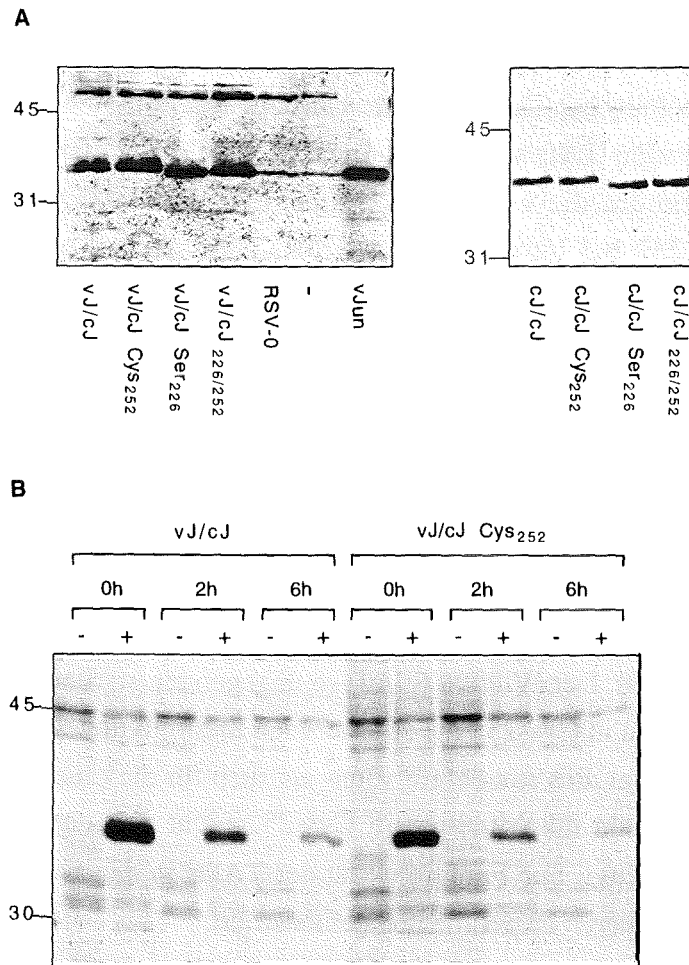


Abb. 6: Expression der vJun, cJun und vJun/cJun-Hybride. (A) Western-Blot Analyse der Jun-Proteine. 15µg der verschiedenen Expressionsvektoren oder eines leeren Expressionsvektors (RSV-0) wurden in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert, Kernextrakte präpariert und gleiche Proteinmengen auf einem 10%igen Proteingel aufgetrennt. Als Kontrollen dienten Kernextrakte aus nicht transfizierten Zellen (-) sowie vJun, welches als lösliches bakterielles Protein exprimiert wurde. Nach Übertragung der Proteine auf eine Membran wurden die Jun-Proteine mit einem Jun-spezifischen Antiserum detektiert. Die Zahlen am jeweils linken Bildrand geben die Größen der Proteinstandards in kd an. (B) Bestimmung der Halblebenszeit von vJ/cJ und vJ/cJ Cys-252. 15µg der entsprechenden Expressionsvektoren wurden in nicht-differenzierte F9-Zellen transfiziert und anschließend für zwei Stunden in ³⁵S-Methionin-haltigem Medium kultiviert. Nach Entfernen des radioaktiven Mediums wurden die Zellen entweder sofort oder nach zwei beziehungsweise sechs Stunden Kultivierung in nicht-radioaktivem Medium geerntet. Nach

Präparation von Gesamtzellextrakten wurden diese mit einem unspezifischen Antiserum vorgereinigt (-) und anschließend die Jun-Proteine mit einem Jun-spezifischen Antiserum präzipitiert (+). Am linken Bildrand sind die Größen der Proteinstandards in kd angegeben.

Aus klonierungstechnischen Gründen wurde anstelle der homologen TAD in den ersten Experimenten die vJun-TAD verwendet. Eventuell hat die Mutation in Cys-252 einen strukturellen Effekt auf die vJun-TAD, der bei der cJun-TAD nicht auftritt. Ob die Mutation in Cys-252 bei Verwendung der cJun-TAD denselben Effekt zeigt wie in Anwesenheit der vJun-TAD, wurde die TAD von vJun gegen die authentische cJun-TAD ausgetauscht (cJ/cJ Cys-252; Abb. 5a). Derselbe Austausch wurde in vJ/cJ vorgenommen (cJ/cJ; Abb. 5a). Die vJun- und die cJun-TAD unterscheiden sich nur durch die δ -Domäne in cJun (siehe Abb. 2). cJ/cJ Cys-252 wird wie cJ/cJ effizient exprimiert und korrekt in den Zellkern transportiert (Abb. 6a). Auch mit der TAD von cJun bleibt der negative Effekt des mutierten Cys-252 erhalten. cJ/cJ Cys-252 zeigt nach transienter Transfektion des entsprechenden Expressionsvektors in F9-Zellen in Anwesenheit des -73/+63 ColICAT-Reporterplasmids keine transaktivierenden Eigenschaften (Abb. 9). Der Wildtyp (cJ/cJ) ist dagegen ein starker Transaktivator (Abb. 9). Sollte die Mutation in Cys-252 die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der TAD verändern, erfolgt dies sowohl für vJun- als auch für die cJun-TAD. Dies bedeutet, daß der negative Effekt der Mutation in Cys-252 nicht von der Anwesenheit der δ -Domäne in cJun abhängt. Die Funktionalität der TADs in den Cys-Mutanten bleibt zu klären und wird in späteren Experimenten demonstriert.

Da der Effekt der Cys-252 Mutation unabhängig von der jeweils verwendeten TAD ist, wurden die folgenden *in vitro* Experimente nur mit Jun-Proteinen durchgeführt, die die cJun-TAD enthalten. Die Aminosäure Cys-252 liegt innerhalb der DNA-Bindungsdomäne, sodaß die Vermutung nahe liegen könnte, daß diese funktionelle Struktur des Jun-Proteins durch die Mutation von Cys-252 beeinflusst wird. Aufgrund der *in vitro* Bindungsstudien von Abate et al., 1990 war es dennoch unwahrscheinlich, daß in cJ/cJ Cys-252 die Bindungsfähigkeit an DNA aufgehoben ist. Um diese Möglichkeit trotzdem zu überprüfen, wurden die kodierenden Regionen für vJun, cJun, cJun Cys-252 und cJun Cys-303 (entspricht cJ/cJ Cys-252 und cJ/cJ Cys-303) in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert (pRK171; Studier et al., 1990) und identische Mengen der exprimierten und nachfolgend gereinigten Proteine in "Gel-Retardations"-Analysen auf DNA-Bindung getestet. Unter reduzierenden Bedingungen sind cJun und cJun Cys-303 in der Lage, an DNA zu binden (Abb. 7). In Übereinstimmung mit früheren Experimenten (Abate et al., 1990) wird die Bindungsaktivität von cJun und cJun Cys-303 in Anwesenheit von oxidierenden Agenzien (Diamid) vollständig gehemmt

(Abb. 7). Überraschenderweise besitzt cJun Cys-252 weder unter reduzierenden noch unter oxidierenden Bedingungen DNA-Bindungsaktivität. Dieses Ergebnis ist konträr zu den bisher veröffentlichten Daten und läßt sich nur dadurch erklären, daß Abate et al. für ihre Experimente eine verkürzte Version des Jun-Proteins verwendet haben. Die hier erhaltenen *in vitro* Daten lassen den Schluß zu, daß cJun Cys-252 aufgrund seiner fehlenden DNA-Bindungsaktivität keine transaktivierenden Eigenschaften *in vivo* besitzt. Die DNA-Bindungsaktivität von vJun ist unter oxidierenden Bedingungen nicht beeinflusst (Abb. 7). Sehr wahrscheinlich ist der Grund dafür, daß sich in vJun an Position 252 kein Cystein, sondern ein Serin befindet. Dadurch könnte vJun durch oxidierende Agenzien nicht mehr beeinflusst werden.

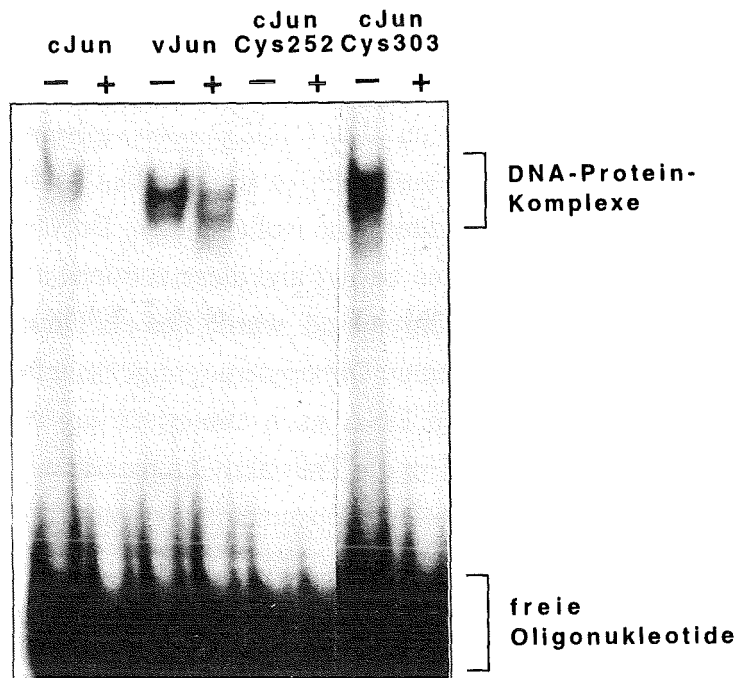


Abb. 7: DNA-Bindungseigenschaften der verschiedenen Jun-Proteine. Je 500ng der bakteriell exprimierten Jun-Proteine (oben angegeben) wurden auf ihre Bindungsaktivität in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 100μM Diamid an ein ³²P-markiertes Oligonukleotid getestet. Das Oligonukleotid enthält eine AP-1 Bindungsstelle und entspricht der Region -103 bis -81 des Adenovirus E3 Promotors. Im Vergleich zur freien DNA-Probe (untere Bildhälfte) haben DNA-Protein Komplexe in nicht-denaturierenden Gelen ein verzögertes elektrophoretisches Laufverhalten.

Die *in vitro* DNA-Bindungsstudien wurden mit bakteriell exprimierten Proteinen durchgeführt. Bakteriell exprimierte Proteine werden nicht phosphoryliert. Cys-252 könnte jedoch nach Expression in höheren Zellen eine verstärkte Phosphorylierung der cJun DNA-Bindungsdomäne induzieren. Dies würde in einer stark gehemmten DNA-Bindungsaktivität resultieren (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Durch Phosphoamino-Peptidanalysen von vJ/cJ und vJ/cJ Cys-252, exprimiert in F9-Zellen, konnte allerdings gezeigt werden, daß die Phosphorylierungsmuster beider Proteine identisch sind (Hagmeyer und Oehler; Daten nicht gezeigt) und damit die verminderte DNA-Bindungsaktivität von cJ Cys-252 nicht auf eine veränderte Phosphorylierung zurückzuführen ist.

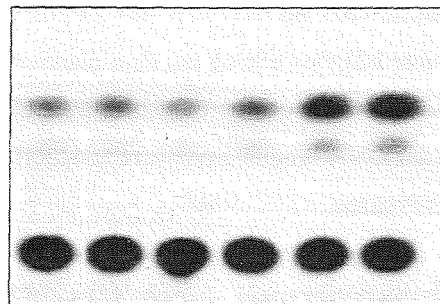
Dimere zwischen vJ/cJ Cys-252 und Fos stellen die Aktivität von vJ/cJ Cys-252 *in vitro* und *in vivo* teilweise wieder her

Eine wichtige Frage ist, ob die TAD von vJ/cJ Cys-252 noch vollständig funktionell ist (siehe oben) oder ob der Aminosäureaustausch zu strukturellen Änderungen führt, die zusätzlich zur gehemmten DNA-Bindung eine Rolle spielen. Da vJ/cJ Cys-252 selbst keine transaktivierenden Eigenschaften besitzt und diese zumindest teilweise auf eine gehemmte DNA-Bindung zurückzuführen sind, wurde Fos als Dimerisierungspartner verwendet. Sollte vJ/cJ Cys-252 in seinen Dimerisierungseigenschaften nicht gehemmt sein, so könnte Fos die Bindung an DNA nach Dimerisierung mit vJ/cJ Cys-252 zumindest teilweise rekonstituieren. Um die Transaktivierung alleine von der Jun-TAD abhängig zu machen, wurde eine Fos-Deletionsmutante verwendet, die zwar noch die basische Region und den "Leuzin-Zipper" besitzt, jedoch keine TAD (Gebel, 1992). Diese Regionen sind für Dimerisierung mit Jun und DNA-Bindung ausreichend. Kotransfektion der Expressionsvektoren, die für vJ/cJ Cys-252 und die Fos-Deletionsmutante kodieren, in F9-Zellen in Gegenwart des -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids, führt zu dessen Aktivierung (Abb. 8a). Weder vJ/cJ Cys-252 noch Fos alleine können transaktivieren (Abb. 8a). Dieses Ergebnis demonstriert, daß die Transaktivierungsfunktion von vJ/cJ Cys-252 nicht beeinträchtigt ist.

Da Fos die Transaktivierung von vJ/cJ Cys-252 teilweise wiederherstellen kann, die Cys-Mutante jedoch keine DNA-bindenden Eigenschaften besitzt, wird die für die Transaktivierung notwendige DNA-Bindung sehr wahrscheinlich durch Fos vermittelt. Die Bestätigung dieser Annahme zeigten "Gel-Retardations"-Analysen, bei denen die bakteriell exprimierten Jun-Proteine (cJun, vJun, cJun Cys-252 und cJun Cys-303) in Kombination mit der bakteriell exprimierten Fos-Deletionsmutante (bZipFos) auf DNA-Bindung getestet wurden. Die fehlende DNA-Bindungsaktivität von cJun Cys-252 kann

durch Zugabe von bZipFos teilweise wiederhergestellt werden (Abb. 8b). Die Bindung von Fos an DNA erfolgt erst nach Dimerisierung mit Jun, was demonstriert, daß die Dimerisierung zwischen cJun Cys-252 und Fos nicht gestört ist. Das bZipFos-Protein hat alleine keine DNA-Bindungsaktivität (Abb. 8b). Die schon vorhandene DNA-Bindungsaktivität von cJun, vJun und cJun Cys-303 wird durch Zugabe von bZipFos verstärkt (Abb. 8b), da Jun-Fos Heterodimere stabiler sind als Jun-Jun Homodimere (Rauscher et al., 1988b).

A



-	-	-	1	1	1	vJ/cJ Cys ₂₅₂
-	0,5	1	-	0,5	1	cFos Δ 237
7,8	8,8	6,3	11,8	25,3	30,9	

B

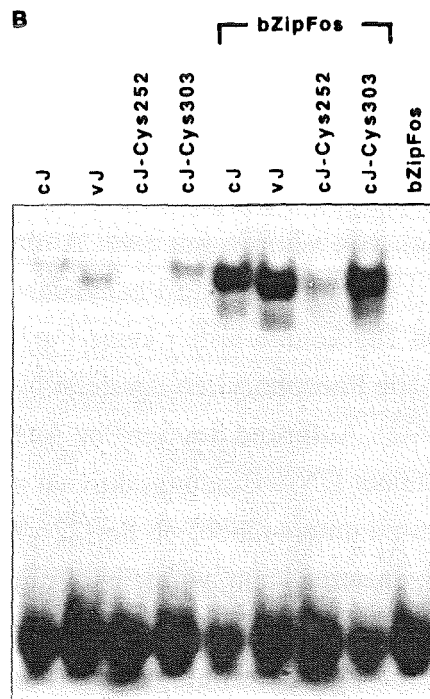


Abb. 8: Eine Fos-Deletionsmutante rekonstituiert die Transaktivierung und DNA-Bindungsaktivität von vJ/cJ Cys-252. (A) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit jeweils 5µg des Jun-abhängigen Reporterplasmids -73/+63 CollCAT mit steigenden Mengen (0,5; 1µg) eines Expressionsvektors, der für cFosΔ237 kodiert, in Anwesenheit oder Abwesenheit von je 1µg des Expressionsvektors für vJ/cJ Cys-252 transfiziert. Die Zahlen am unteren Rand geben die prozentuale Umsatzrate von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen an (Durchschnittswerte von 5 unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 15% Abweichung zeigten). (B) DNA-Bindungseigenschaften der vJun und cJun Proteine in Anwesenheit oder Abwesenheit von bZipFos. Je 500ng der oben angegebenen bakteriell exprimierten Jun-Proteine wurden in Abwesenheit (Spur 1-4) oder Anwesenheit (Spur 5-8) auf ihre DNA-Bindungseigenschaften an ein ³²P-markiertes Oligonukleotid getestet. Als Oligonukleotid wurde die E3 Promotorregion (Position -103 bis -81) von Adenovirus verwendet, welche eine Jun-Bindungsstelle besitzt. In Spur 9 wurde bZipFos alleine mit dem markierten Oligonukleotid inkubiert. Die DNA-Protein Komplexe befinden sich in der oberen Bildhälfte, freie Oligonukleotide in der unteren. Das unterschiedliche Laufverhalten der DNA-Protein Komplexe resultiert sehr wahrscheinlich aus den Größen der verwendeten Jun- und Fos-Proteine.

Ser-226 kompensiert die Inaktivierung durch Cys-252

Daß cJun Cys-252 nicht mehr an DNA binden kann, ist nicht nur aufgrund der konträren Ergebnisse zu früheren Experimenten überraschend (Abate et al., 1990). Ein Vergleich zwischen der Aminosäuresequenz von cJun und vJun offenbart, daß vJun an derselben Position natürlicherweise eine Cystein-Serin Transition trägt. Werden cJun und vJun bakteriell exprimiert und in "Gel-Retardations"-Analysen getestet, so ist die DNA-Bindungsaktivität beider Proteine jedoch fast identisch (Abb 8b; Angel et al., 1988a; Boyle et al., 1991). Daraus ergibt sich die Frage: Welcher Mechanismus im vJun-Protein kompensiert den inaktivierenden Effekt der Mutation in Cys-252 und läßt vJun in Redox-unabhängiger Weise an DNA binden und transaktivieren?

vJ/cJ Cys-252 unterscheidet sich von vJun in nur zwei Aminosäuren: einem Glyzin-Arginin Austausch in Position 185 und der Serin-Phenylalanin Transition in Position 226. Dem Austausch in Position 185 konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Ser-226 hingegen ist als potentielle Phosphorylierungsstelle *in vivo* identifiziert worden (Boyle et al., 1991; Lin et al, 1992). Aufgrund des Ser/Phe Austausches kann vJun nicht mehr durch GSK3 und CKII in seiner DNA-Bindungsaktivität reguliert werden (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Um zu untersuchen, ob Ser-226 den negativen Effekt des Cystein-Serin Austausches kompensieren kann, wurde in cJ/cJ und in cJ/cJ Cys-252 Ser-226 durch *in vitro* Mutagenese in Phenylalanin mutiert (Abb. 5a). Dieselbe Punktmutation wurde in die vJ/cJ-Chimaeren eingeführt. Die Mutanten werden nach

transienter Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren in F9 Zellen effizient exprimiert und korrekt in den Zellkern transportiert (Abb. 6a). Wie in Abb. 9 gezeigt, transaktiviert vJ/cJ Ser-226 nur unwesentlich stärker als die nicht mutierte Form. Es wäre zu erwarten gewesen, daß aufgrund der fehlenden Phosphorylierungsstelle in vJ/cJ Ser-226 die DNA-Bindungsaktivität durch GSK3 und CKII nicht mehr gehemmt werden kann, was zu einer stärkeren Transaktivierung führt (Boyle et al., 1991; Lin et al, 1992). Sehr wahrscheinlich ist die Menge an exprimiertem Jun-Protein jedoch so hoch, daß GSK3 und CKII nur einen geringen Anteil an Jun-Protein phosphorylieren können. Dadurch könnten die Aktivitätsunterschiede zwischen vJ/cJ und vJ/cJ Ser-226 nicht detektiert werden.

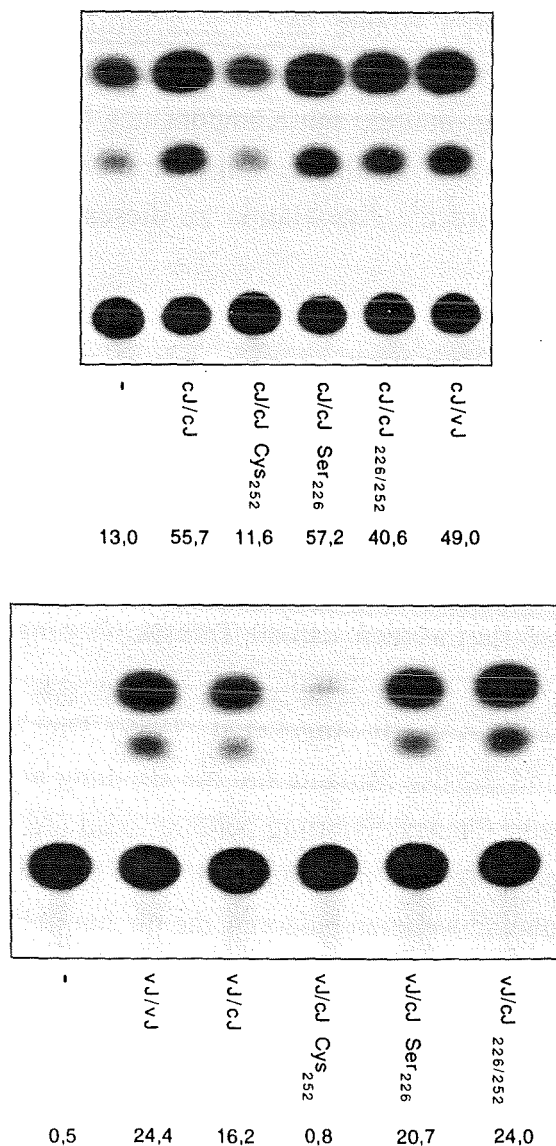


Abb. 9: Transaktivierungseigenschaften von cJun, vJun und der vJ/cJ- und cJ/vJ-Hybride. Je 1µg der angegebenen Expressions-vektoren wurden mit je 5µg des Jun-abhängigen Reporterplasmids -73/+63 CollCAT in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert. Bei (-) wurde die Menge an Expressionsvektor durch RSV-0 ersetzt. Die transfizierte DNA-Menge wurde mit RSV-0 auf 10µg Gesamt-DNA je Transfektion aufgefüllt. Die Zahlen beziehen sich auf die prozentuale Umsatzrate von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen (Durchschnittswerte von 4 unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 10% voneinander abwichen).

Durch die Einführung von Phenylalanin in Position 226 in cJ/cJ Cys-252 wird dessen Transaktivierungsfähigkeit komplett wiederhergestellt (Abb. 9). Dasselbe Resultat wird mit den vJ/cJ Chimaeren erhalten (Abb. 9). Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß vJun im Gegensatz zu cJun weder durch Hyperphosphorylierung noch durch Redox-Regulation gehemmt werden kann. Dabei ist der Aminosäureaustausch in Position 226 eine entscheidende Vorbedingung, um beide Kontrollmechanismen zu unterlaufen.

Regulation der Jun-Transaktivierungsdomäne

Durch die Bindung von Jun an seine Erkennungssequenz innerhalb von Promotorregionen werden nachgeschaltete Gene transaktiviert. Dabei ist die DNA-Bindung nur der erste Schritt in diesem Aktivierungsprozess. Damit Jun seine transaktivierenden Eigenschaften entfalten kann, muß eine Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie erfolgen. Dadurch könnte der Transkriptionskomplex stabilisiert werden und leichter für die Pol II zugänglich sein (Buratowski et al., 1989). Dabei stellt sich die Frage, ob Jun direkt oder indirekt mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie assoziiert ist. Wenn die Interaktion indirekt ist, welche weiteren Proteine sind beteiligt und wie wird die Assoziation zu diesen Proteinen reguliert?

Repression Jun-abhängiger Transaktivierung durch vJun und cJun Mutanten

Für den Transkriptionsfaktor Jun gab es seit einiger Zeit indirekte Hinweise, daß Jun-abhängige Transaktivierung nicht durch direkte Interaktion zwischen der Jun-TAD und der basalen Transkriptionsmaschinerie vermittelt wird (Angel et al., 1989). In *in vivo* Konkurrenzexperimenten konnte demonstriert werden, daß die Transaktivierung durch Jun in Anwesenheit eines Jun-abhängigen Reporterplasmids durch eine Mutante gehemmt wird, die nur noch für die Jun-TAD kodiert (Abb. 10; Angel et al., 1989). Dies könnte bedeuten, daß die TAD des Wildtyps und die der Mutante um die Bindung an einen Faktor konkurrieren, der für Jun-abhängige Transaktivierung benötigt wird (Abb. 10). Diese Komponente bildet entweder eine Brücke zwischen Jun und dem basalen Transkriptionskomplex oder zwischen Jun und weiteren Faktoren, die für Jun-abhängige Transaktivierung benötigt werden. Diese Faktoren sind für eine durch Jun aktivierte jedoch nicht für basale Transkription notwendig. Die basale Transkriptionsrate kann durch alleinige Transfektion eines Jun-abhängigen Reporterplasmids gemessen werden. Sie wird durch Kotransfektion der Mutante, die für die Jun-TAD kodiert, nicht beeinflusst.

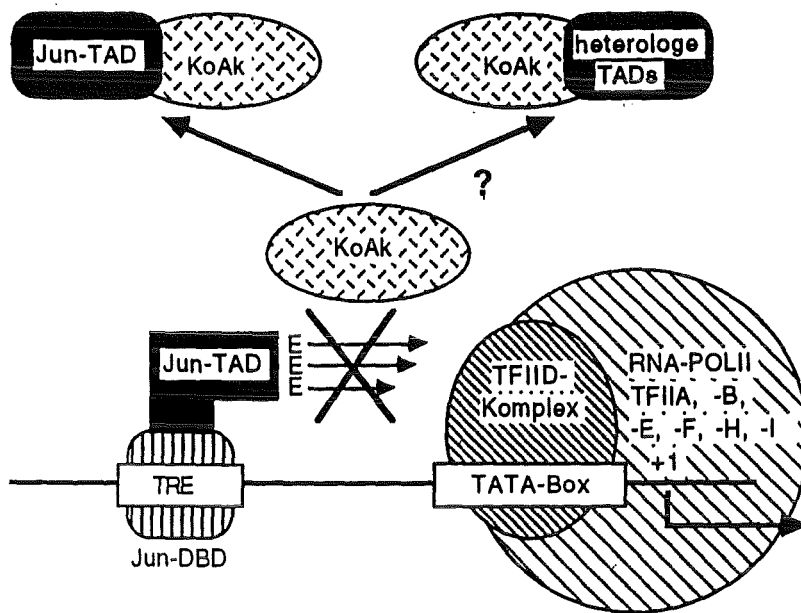
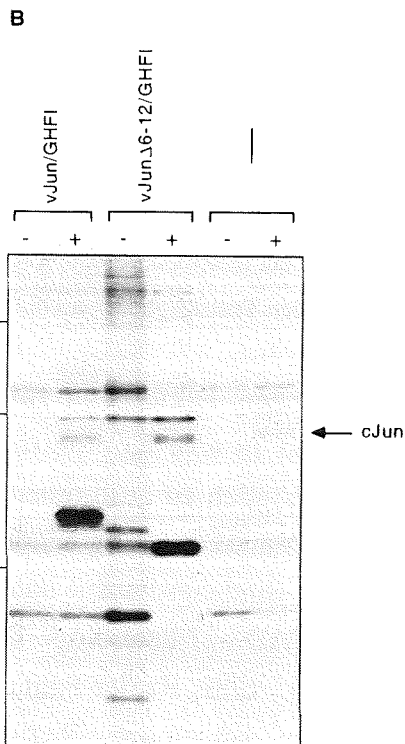
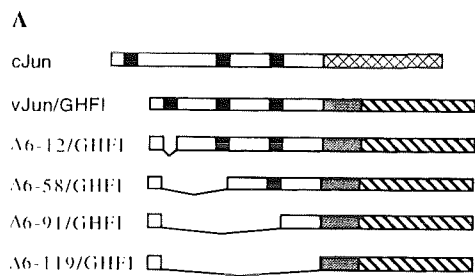


Abb. 10: Schematische Darstellung des *in vivo* Wettbewerbssystems. TRE, TPA response element; Jun-DBD, DNA-Bindungsdomäne von Jun; Jun-TAD, Transaktivierungsdomäne von Jun; TADs, Transaktivierungsdomänen; EEE symbolisiert die sauren Aminosäuren innerhalb der Jun-TAD, die für Transaktivierung essentiell sind; KoAk, Koaktivator; +1, Initiationsstelle der mRNA-Synthese; RNA-Pol II, RNA-Polymerase II; TFIIA, -B, -E, -F, -H, -I, Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie;

Um genauer zu analysieren, ob und welchen zusätzlichen Faktor Jun für die Transaktivierung Jun-abhängiger Gene benötigt, wurden *in vivo* Wettbewerbs-experimente durchgeführt. In diesem System ist es auch möglich zu bestimmen, mit welchen Regionen innerhalb des Jun-Proteins ein für die Transaktivierung benötigter Faktor interagiert. Die Jun-TAD ist unabhängig von der DNA-Bindungsdomäne und vom "Leuzin-Zipper" funktionell. Nach Übertragung der Jun-TAD auf heterologe DNA-Bindungsdomänen ist Transaktivierung möglich (Theill et al., 1989; Radler-Pohl et al., 1993; Abb. 11d). Dadurch konnte davon ausgegangen werden, daß nur diese Region für eine Interaktion mit einem Koaktivator in Frage kommt. Deshalb wurden Konstrukte hergestellt, die die komplette Jun-TAD oder Deletionsmutanten davon enthält. Den Deletionsmutanten fehlt entweder TADI ($\Delta 6-12$), TADI+II ($\Delta 6-58$), TADI-III ($\Delta 6-91$) oder die gesamten Jun-Sequenzen ($\Delta 6-119$) (Abb. 11a). Um einen effizienten Transport

in den Zellkern zu gewährleisten, wurden die verschiedenen Mutanten mit der DNA-Bindungsdomäne von GHFI (growth hormone factor) fusioniert, da diese Region ein Kern-Lokalisationssignal enthält (Theill et al., 1989). Die Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren und nachfolgende Immunpräzipitation der exprimierten Proteine aus metabolisch mit ^{35}S -Methionin markierten F9-Zellen zeigt, daß die Hybride in vergleichbaren Mengen exprimiert werden (Abb. 11c und Abb. 17a).



C

Kompetitor	cJun(0.5 µg)		-fach Aktivierung
	-	+	
—	—	51,9	7,6
vJun/GHFI	0,5	16,7	4,7
	1	8,8	3,5
	2,5	5,5	4,2
vJunΔ 6-12/GHFI	0,5	27,1	14,7
	1	24,3	33,9
	2,5	24,2	24,2
vJunΔ 6-58/GHFI	0,5	38,6	5,1
	1	32,2	5,5
	2,5	32,9	4,8
vJunΔ 6-91/GHFI	0,5	31,9	4,9
	1	32,7	5,9
	2,5	34,2	6,1
vJunΔ 6-119/GHFI	0,5	49,6	7,1
	1	55,2	7,1
	2,5	50,9	7,6

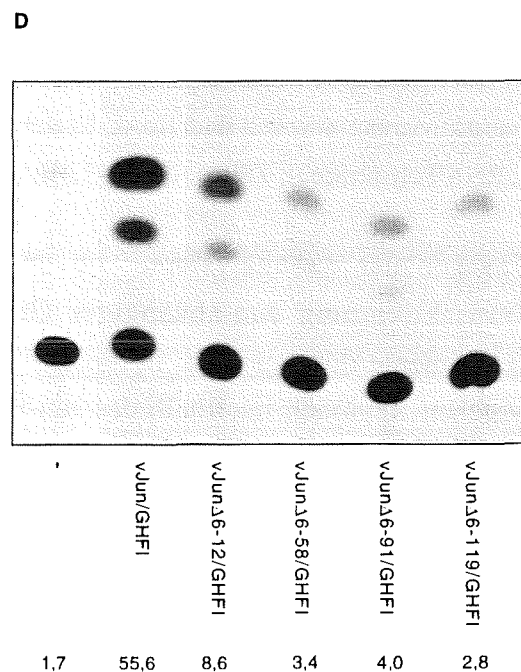


Abb. 11: *In vivo* Konkurrenzseigenschaften der vJun-TAD. (A) Schematische Darstellung von cJun, vJun/GHFI und der Deletionsmutanten von vJun/GHFI. Schwarze Regionen, TADs; kreuzschraffierte Region, DNA-Bindungsdomäne von cJun; gepunktete Regionen, POU-Domäne von GHFI; gestreifte Regionen, Homeobox-Domäne von GHFI; weiße Regionen, restliche Bereiche in cJun und vJun; (B) Je 10µg der Expressionsvektoren für vJun/GHFI und vJunΔ6-12/GHFI oder 10µg RSV-0 wurden in Anwesenheit von je 5µg eines cJun-Expressionsvektors in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert. Nach metabolischer Markierung der Proteine mit ³⁵S-Methionin für 2h wurden Kernextrakte präpariert, die Extrakte mit einem unspezifischen Antiserum vorgereinigt (-) und die exprimierten Jun-Proteine nachfolgend mit einem Jun-spezifischen Antiserum präzipitiert (+). Die Lokalisation des cJun-Proteins ist mit einem Pfeil auf der rechten Seite gekennzeichnet. Die Größe von vJun/GHFI beträgt 37kd, die Größe von vJunΔ6-12/GHFI 36kd. Die Zahlen auf der linken Seite beziehen sich auf die Größen eines Proteinmarkers in kd. (C) Steigenden Mengen (0,5; 1; 2,5µg) der Expressionsvektoren für die Kompetitoren vJun/GHFI, vJunΔ6-12/GHFI, vJunΔ6-58/GHFI, vJunΔ6-91/GHFI und vJunΔ6-119/GHFI wurden in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) eines cJun-Expressionsvektors (0,5µg) und je 5µg des Jun-abhängigen Reporterplasmids -73/+63 CollCAT in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert. Bei (-) wurde kein Expressionsvektor für einen Kompetitor transfiziert. Die Gesamtmenge an transfiziertem Expressionsvektor wurde durch Auffüllen der DNA auf 10µg mit RSV-0 konstant gehalten. Zahlen in der zweiten Spalte: transfizierte Mengen der Expressionsvektoren für die verschiedenen Kompetitoren; Zahlen in der dritten und vierten Spalte: prozentualer Umsatz von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierte Formen in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) eines Jun-Expressionsvektors mit oder ohne steigende Mengen (0,5; 1; 2,5µg) der verschiedenen Kompetitoren (Durchschnittswerte von 7 unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 20% voneinander abwichen); Zahlen in der fünften Spalte: Jun-spezifische Transaktivierung in Anwesenheit oder Abwesenheit von Kompetitoren; (D) Je 0,5µg der angegebenen Expressionsvektoren wurden zusammen mit je 5µg des GHFI-abhängigen Reporterplasmids GH-CAT in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert. Bei (-) wurde kein Expressionsvektor transfiziert. Die DNA-Menge betrug pro Transfektion 10µg und wurde durch Zugabe entsprechender Mengen an RSV-0 konstant gehalten. Die Zahlen beziehen sich auf die prozentualen Umsatzraten von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen (Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten, die eine Abweichung von nicht mehr als 12% zeigten).

Ebenso ist ein effizienter Transport in den Zellkern gewährleistet. Die Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren in F9-Zellen und Immunpräzipitation der exprimierten Proteine nach metabolischer Markierung mit ³⁵S-Methionin aus Kernextrakten zeigt einen äquivalenten Transport in den Zellkern (Abb. 11c). Außerdem erlaubt die Fusion an die DNA-Bindungsdomäne von GHFI eine Überprüfung der Funktionalität dieser Hybride. Die Transfektion eines Expressionsvektors, der für vJun/GHFI kodiert,

in Anwesenheit eines GHFI-abhängigen Reporterplasmids in F9-Zellen führt zu einer starken Transaktivierung (Theill et al., 1989; Abb. 11d und 16c).

Die Transfektion von F9-Zellen mit einem Expressionsvektor, welcher für cJun kodiert, führt zu einer 7-fachen Induktion eines Jun-abhängigen CAT-Reporterplasmids (-73/+63 ColICAT; Abb. 11a). Zusätzliche Transfektion von identischen Mengen des Expressionsvektors für das vJun/GHFI-Hybrid (Abb. 11a) führt zu einer Reduktion cJun-abhängiger Transaktivierung um 50% (Abb. 11c). Eine weitere Erhöhung der transfizierten Menge des Expressionsvektors für vJun/GHFI hebt Jun-abhängige Transaktivierung vollständig auf (Abb. 11c). Die Deletion von TADI in vJun Δ 6-12/GHFI eliminiert die Fähigkeit der vJun-TAD, cJun-abhängige Transaktivierung zu hemmen, fast vollständig (Abb. 11c). Sehr ähnliche Ergebnisse werden für die Proteine erhalten, denen entweder TADI+II (vJun Δ 6-58/GHFI), alle TADs (vJun Δ 6-91/GHFI) oder die gesamten vJun-Sequenzen (vJun Δ 6-119/GHFI) fehlen (Abb. 11c). Dies zeigt, daß die Hemmung cJun-abhängiger Transaktivierung nicht auf den GHFI-Anteil zurückzuführen ist, sondern auf die Anwesenheit der kompletten vJun-TAD. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen steht, daß ein vJun/GHFI-Hybrid, welchem Teile der DNA-Bindungsdomäne von GHFI fehlen (ohne die Translokation in den Kern zu unterbinden), ebenso noch in der Lage ist, Jun-abhängige Transaktivierung zu hemmen (Daten nicht gezeigt). Außerdem stimmt die Kompetitionsfähigkeit der verschiedenen vJun/GHFI-Hybride mit deren Fähigkeit zu transaktivieren überein und bestätigt die Analyse der transaktivierenden Regionen innerhalb der vJun-TAD (Angel et al., 1989). Eine vJun-Mutante, in der TADI deletiert ist, besitzt nur noch eine schwache Transaktivierungsfähigkeit (ungefähr 30% verglichen zum Wildtyp) eines Jun-abhängigen Reporterplasmids. Zusätzliche Deletion von TADII in vJun hebt vJun-abhängige Transaktivierung völlig auf (Angel et al., 1989). Dasselbe gilt, wenn die homologe DNA-Bindungsdomäne durch die DNA-Bindungsdomäne von GHFI ersetzt wird. Schrittweise Deletion der Jun-TAD führt zum Verlust der Transaktivierungsfähigkeit eines GHFI-abhängigen Reporterplasmids, wobei die Deletion von TADI den stärksten Effekt hat (Abb. 11d).

Die Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung durch vJun/GHFI ist nicht darauf zurückzuführen, daß der Transport von cJun in den Zellkern gehemmt ist. Die Expressionsvektoren, die für vJun/GHFI und vJun Δ 6-12/GHFI kodieren, wurden jeweils zusammen mit einem Expressionsvektor für cJun in F9-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nachfolgend metabolisch mit ³⁵S-Methionin markiert und die exogen exprimierten Proteine mit einem Jun-spezifischen Antikörper aus Kernextrakten präzipitiert. Wie in Abb. 11b demonstriert, wird weder der Transport von cJun in den Zellkern noch dessen Synthese beeinträchtigt.

Die Repression Jun-abhängiger Transaktivierung durch ein vJun/GHFI-Hybrid ist nicht auf das -73/+63 CollCAT-Reporterplasmid beschränkt. Dies konnte in *in vivo* Konkurrenzexperimenten demonstriert werden, in denen das -73/+63 CollCAT-Reporterplasmid durch ein -73/-42 tkCAT-Konstrukt (Angel et al., 1987b) ersetzt wurde. Dieses Konstrukt besitzt den Thymidinkinase (TK)-Promotor (McKnight et al., 1981; 1984) des Herpes Simplex Virus. Die basale Aktivität dieses Promotors wird durch die Transkriptionsfaktoren CTF (Jones et al., 1987) und Sp1 (Kadonaga et al., 1987) hervorgerufen. Der TK-Promotor besitzt zwei Bindungsstellen für Sp1, eine Bindungsstelle für CTF und die TATA-Box. In F9-Zellen werden beide Transkriptionsfaktoren endogen exprimiert und binden funktionell an ihre Bindungsstellen. In "*in vivo* footprinting" Analysen wurde beobachtet, daß der endogene Jun-Promotor, der ebenfalls Bindungsstellen für CTF und Sp1 besitzt, CTF und Sp1 bindet (Herr und Angel, unveröffentlicht). Vor dem TK-Promotor befindet sich ein minimaler Kollagenasepromotor, der noch eine Jun-Bindungsstelle, jedoch keine TATA-Box besitzt. Die Transfektion dieses Konstrukts zusammen mit einem cJun-Expressionsvektor führt zu einer 5-fachen Stimulierung des TK-Promotors (Abb. 12a). Zusätzliche Transfektion des Expressionsvektors für vJun/GHFI hemmt cJun-abhängige Transaktivierung. Dieser Effekt ist dosisabhängig. Transfektion steigender Mengen von vJun/GHFI führen zu einer graduellen Abnahme cJun-abhängiger Transaktivierung (Abb. 12a). Hingegen haben steigende Mengen von vJun/GHFI keinen Effekt auf die basale Transaktivierung, wenn vJun/GHFI zusammen mit dem -73/-42 tkCAT Konstrukt transfiziert wird (Abb. 12a). Unter basaler Transaktivierung wird die Aktivität verstanden, die bei alleiniger Transfektion eines Reporterplasmids erhalten wird. Sie resultiert aus der Bindung endogener Transkriptionsfaktoren an das Reporterplasmid und der spontanen Ausbildung des basalen Transkriptionskomplexes an der TATA-Box. Dies bedeutet, daß die Jun-TAD weder um Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie noch um Faktoren, die für Sp1- und CTF-induzierte Aktivierung notwendig sind, kompetiert. Im Gegensatz dazu kann unter denselben Bedingungen in Anwesenheit des -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids ein signifikanter Effekt auf die basale Transaktivierung beobachtet werden. Dieser Effekt ist jedoch nicht auf vJun/GHFI beschränkt, sondern kann bei allen vJun/GHFI-Konstrukten beobachtet werden, die noch Aminosäure 91-119 besitzen (Abb. 11c). Erst nach Deletion dieser Region wird keine Hemmung der basalen Transaktivierung beobachtet. Die Funktion dieser Region in vJun ist unbekannt. Es könnte sein, daß diese Aminosäuren aufgrund ihrer artifiziell veränderten Sekundärstruktur im vJun/GHFI-Hybrid die Bindung anderer aktivierender Proteine an den Kollagenasepromotor verhindern. Dabei könnte es sich beispielsweise um den Faktor handeln, der in der Region von -60 bis -35 bindet (Angel et al., 1987a).

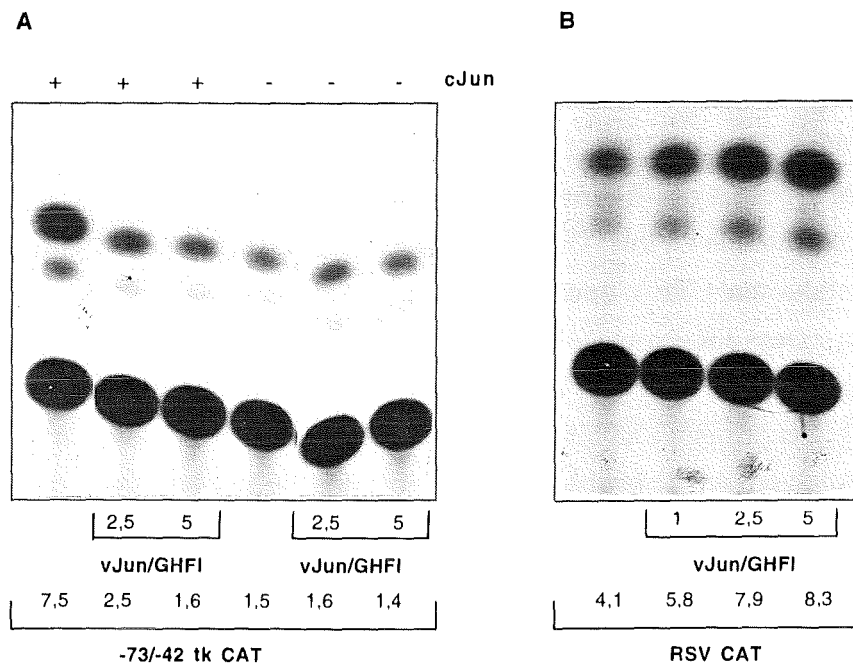


Abb. 12: *In vivo* Konkurrenz-eigenschaften von vJun/GHFI auf verschiedene Promotoren. (A) Steigende Mengen (2,5; 5µg) eines vJun/GHFI Expressionsvektors wurden in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 0,5µg eines cJun Expressionsvektors zusammen mit je 2µg des Jun-abhängigen Reporterplasmids -73/-42 tkCAT in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert. In Spur 1 und 4 wurde das Reporterkonstrukt mit oder ohne 0,5µg Expressionsvektor in Abwesenheit des Expressionsvektors für vJun/GHFI transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Zugabe von RSV-0 auf 10µg konstant gehalten. Die Zahlen am unteren Rand beziehen sich auf die prozentualen Umsatzraten von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen (Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 15% Abweichung zeigten). (B) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit je 2µg RSV-CAT in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit steigender Mengen (1; 2,5; 5µg) eines Expressionsvektors für vJun/GHFI transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA betrug je 10µg und wurde durch Zugabe entsprechender Mengen RSV-0 konstant gehalten. Die Zahlen am unteren Rand beziehen sich auf die prozentualen Umsatzraten von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen (Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 5% Abweichung zeigten).

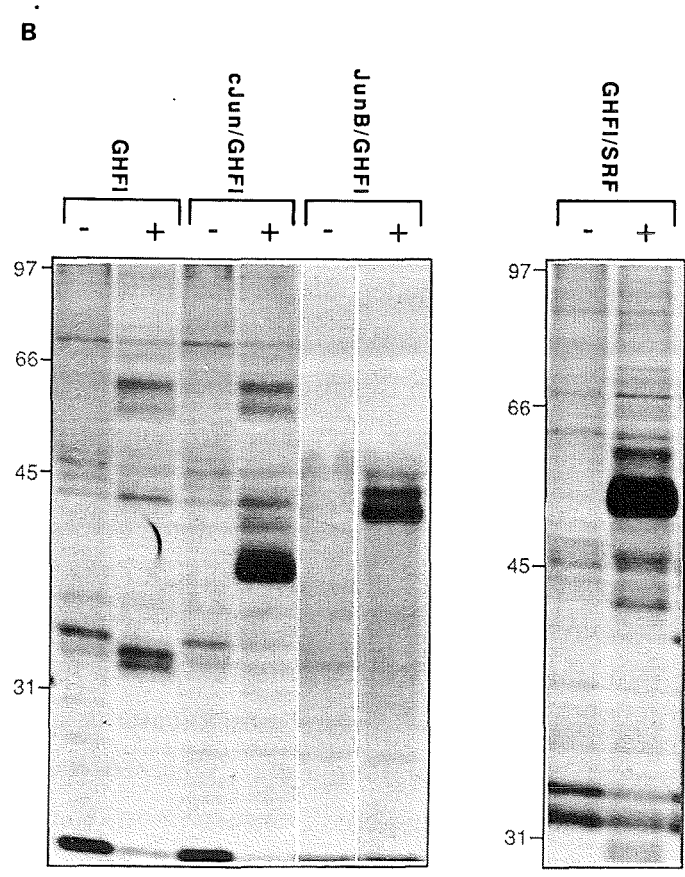
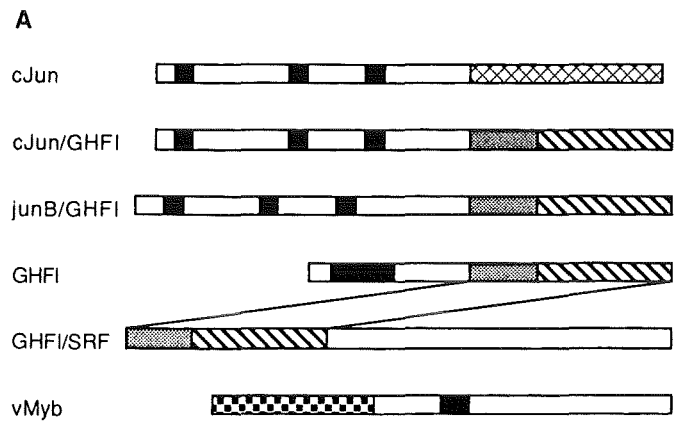
Diese Ergebnisse zeigen, daß die TADs von cJun und vJun um die Bindung an denselben Faktor konkurrieren, der für die Übertragung der transaktivierenden Eigenschaften von Transkriptionsfaktor zur basalen Transkriptionsmaschinerie eine wichtige Rolle spielt. Der hemmende Effekt von vJun/GHFI auf cJun-abhängige Transaktivierung kann nicht durch Konkurrenz um einen basalen Transkriptionsfaktor erklärt werden, da die basale Transaktivierung des -73/+63 CollCAT Reporterplasmids nur zu etwa 30%, die Aktivität

des -73/-42 tkCAT Konstrukts überhaupt nicht beeinflusst wird. Ebenso ist die Aktivität des RSV-Promotors (Rous Sarcoma Virus; Gorman et al., 1982a), unter deren Kontrolle der cJun-Expressionsvektor steht, nicht gehemmt. Transiente Transfektion konstanter Mengen eines RSV-CAT Konstrukts in Anwesenheit steigender Mengen des Expressionsvektors, der für vJun/GHFI kodiert, führt sogar zu einer 2-fachen Aktivierung des RSV-LTR (long terminal repeat) (Abb. 12b).

cJun und JunB konkurrieren um die Bindung an denselben Koaktivator

JunB besitzt innerhalb seiner TADs (TADI-III) einen hohen Homologiegrad zu cJun und vJun (Ryder et al., 1988). Daraus ergibt sich die Frage, ob JunB einen ähnlichen Transaktivierungsmechanismus wie cJun und vJun besitzt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die TAD von JunB (Ryder et al., 1988) cJun-abhängige Transaktivierung hemmen kann. Wird die TAD von JunB an die DNA-Bindungsdomäne von GHFI fusioniert, ist das exprimierte Protein in der Lage, ein GHFI-abhängiges Reporterplasmid zu transaktivieren (Chiu et al., 1989). JunB/GHFI wird in F9-Zellen nach transienter Transfektion stark exprimiert. Dies kann durch Immunpräzipitation des exogen exprimierten Proteins aus metabolisch ³⁵S-Methionin markierten Zellen mit einem GHFI-Antiserum gezeigt werden (Abb. 13b). Transiente Transfektion steigender Mengen eines Expressionsvektors, der für JunB/GHFI kodiert, in Anwesenheit eines cJun Expressionsvektors hemmen die Jun-abhängige Transaktivierung des -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids (Abb. 13c). Dieser Effekt ist dosisabhängig. Je größer die Menge des transfizierten Expressionsvektors für JunB/GHFI, desto stärker ist die Hemmung cJun-abhängiger Transaktivierung (Abb. 13c). Dies bedeutet, daß cJun und JunB zumindest eine gemeinsame Komponente verwenden, die für Transaktivierung notwendig ist. Die basale Transaktivierung wird durch JunB/GHFI nur wenig beeinflusst und läßt sich wie für vJun/GHFI durch die strukturellen Eigenschaften der JunB-TAD im GHFI-Kontext erklären. Sehr ähnliche Ergebnisse werden für cJun/GHFI erhalten. Dieses Fusionsprotein kann einen GHFI-abhängigen Promotor aktivieren (Abb. 16c; Chiu et al., 1989). Nach transienter Transfektion des Expressionsvektors, der für cJun/GHFI kodiert, wird das Protein effizient in F9-Zellen exprimiert (Abb. 13b). cJun-abhängige Transaktivierung wird durch die TAD von cJun stärker gehemmt als durch die JunB-TAD (Abb. 13c). Dies ist nicht überraschend, da die JunB-TAD fusioniert an die DNA-Bindungsdomäne von GHFI ein schwächerer Transaktivator ist als cJun/GHFI (Chiu et al., 1989). Dieses Verhalten läßt sich durch eine höhere Affinität der cJun-TAD zu seinem Koaktivator erklären. Ein stärkerer Transaktivator kann dadurch auch stärker kompetitiv hemmen. Die basale Transaktivierung des -73/+63 CollCAT-

Reporterplasmids wird durch cJun/GHFI nicht gehemmt wie durch vJun/GHFI und JunB/GHFI (vergleiche Abb. 11c und 13c). Der Grund für diese Unterschiede ist unklar. Eventuell ist die Sekundärstruktur von cJun/GHFI anders als von vJun/GHFI und JunB/GHFI, und die Bindung durch andere Transkriptionsfaktoren, die für die basale Transaktivierung des -73/+63 CollCAT-Indikatorplasmids verantwortlich sind, wird nicht negativ beeinflusst.



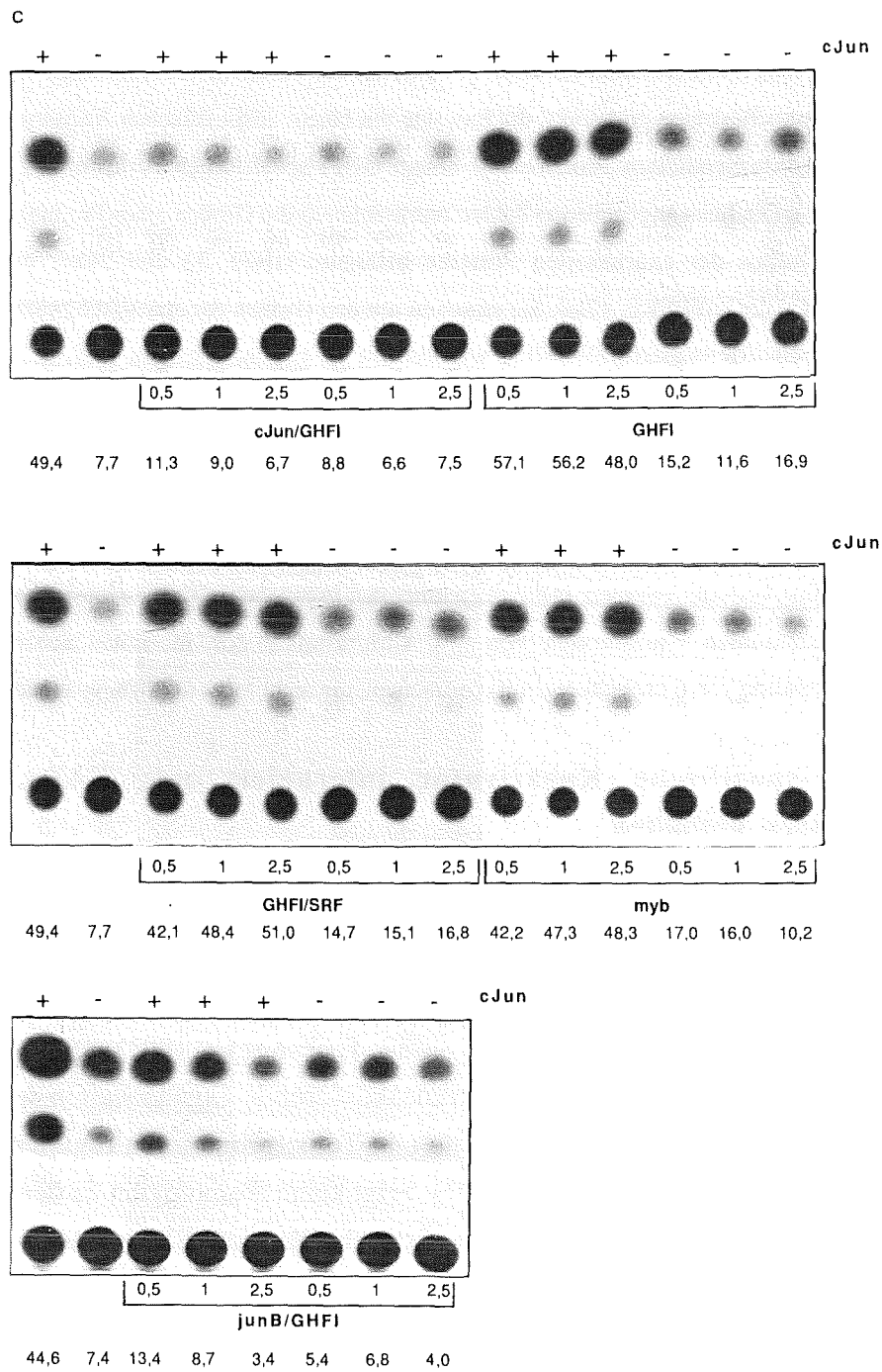


Abb. 13: Selektive Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung durch andere Transkriptionsfaktoren. (A) Schematische Darstellung von cJun, cJun/GHFI, JunB/GHFI, GHFI, GHFI/SRF und vMYB. Schwarze Regionen, TADs der verschiedenen Transkriptionsfaktoren; kreuzschraffierte Region, cJun DNA-Bindungsdomäne; gepunktete Regionen, POU-Domäne von GHFI; schraffierte Regionen,

Homeobox-Domäne von GHFI; gestreifte Region, SRF-TAD; karierte Region, vMYB DNA-Bindungsdomäne; (B) 15µg der oben angegebenen Expressionsvektoren wurden in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert und die Zellen für 2h in ³⁵S-Methionin-haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte präpariert, die Extrakte mit einem unspezifischen Antiserum vorgereinigt (-) und die exogen exprimierte Proteine mit einem GHFI-spezifischen Antiserum aus den Extrakten präzipitiert (+). Die links angegebenen Zahlen repräsentieren die Größen eines Proteinmarkers in kd. Die erwarteten Größen der exprimierten Proteine betragen: GHFI, 33 und 34kd; cJun/GHFI, 40kd; JunB/GHFI, 43kd; GHFI/SRF, 47kd. Sie stimmen mit den Größen der spezifisch präzipitierten Proteine überein. (C) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit steigenden Mengen (0,5; 1; 2,5µg) der unten angegebenen Expressionsvektoren in Anwesenheit oder Abwesenheit eines cJun Expressionsvektors (0,5µg) zusammen mit 5µg des Jun-abhängigen Reporterplasmids -73/+63 CollCAT transfiziert. Außerdem wurde das Reporterplasmid in Anwesenheit und Abwesenheit eines Jun Expressionsvektors ohne weitere Expressionsvektoren transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Zugabe von RSV-0 auf 10µg konstant gehalten. Die Zahlen unter den angegebenen Expressionsvektoren beziehen sich auf die prozentualen Umsatzraten von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen (Durchschnittswerte von 6 unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 20% voneinander abwichen).

Der Jun-spezifische Koaktivator interagiert mit TADs, die saure Aminosäuren enthalten

Transkriptionsfaktoren lassen sich anhand ihrer TAD in verschiedene Klassen einteilen. Die TAD von GHFI ist reich an Serin und Threonin (Theill et al., 1989). Sp1 enthält Glutamin-reiche Regionen innerhalb seiner TAD (Courey et al., 1988). CTF besitzt Prolin-reiche Regionen (Mermoud et al., 1989; Tanese et al., 1991). SRF (serum response factor; Norman et al., 1988), dessen transaktivierende Eigenschaften wie die von Jun durch Wachstumsfaktoren, Karzinogene und Tumorpromotoren reguliert werden kann (Büscher et al., 1988; König et al., 1991), zeigt keine Homologien zu den TADs anderer bekannter Transkriptionsfaktoren. Der Östrogenrezeptor (ER) enthält zwei TADs, die unabhängig voneinander agieren (Tora et al., 1989). Die TADs des ER's sind nicht näher untersucht, enthalten jedoch keine sauren Aminosäuren. Im Gegensatz dazu sind die TADs des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 (Keegan et al., 1986) und des Herpes Simplex Virus Transaktivators VP16 (Campbell et al., 1984; Dalrymple et al., 1985) durch saure Aminosäuren charakterisiert (Triezenberg et al., 1988; Chasman et al., 1989). Dies gilt auch für die TAD des Transkriptionsfaktors vMYB (Klempnauer et al., 1983; Weston und Bishop, 1989).

Da cJun, JunB und vJun ähnliche Transaktivierungsmechanismen besitzen und durch saure Aminosäuren ihre transaktivierenden Eigenschaften vermitteln, ergab sich die

Frage, ob die Anwesenheit saurer Aminosäuren mit dem Transaktivierungsmechanismus korreliert. So wäre es möglich, daß andere Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls eine "saure TAD" besitzen, mit dem Jun-spezifischen Koaktivator interagieren. Um dies zu untersuchen wurden die TADs von GHFI, SRF, ER, GAL4, VP16 und vMYB im *in vivo* Konkurrenzsystem auf Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung getestet. Um Effekte der SRF DNA-Bindungsdomäne auf die Jun-TAD auszuschließen, wurde diese gegen die DNA-Bindungsdomäne von GHFI ausgetauscht (Abb. 13a). Die DNA-Bindungsdomäne von SRF interagiert mit dem Faktor p62/TCF (ternary complex factor; Hipskind et al., 1991), der selbst transaktivierende Eigenschaften besitzt. Dadurch könnte bei Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung nicht unterschieden werden, ob die Hemmung durch die TAD von SRF oder p62/TCF hervorgerufen wird. ER-GAL4, welches die DNA-Bindungsdomäne des ER und die TAD von GAL4 enthält (Webster et al., 1988), und ebenso vMYB werden nach transienter Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren in F9-Zellen exprimiert, wie nach metabolischer Markierung der Zellen mit ³⁵S-Methionin und Immunpräzipitation der Proteine mit spezifischen Antisera demonstriert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Transiente Transfektion der Expressionsvektoren, die für GHFI und GHFI/SRF kodieren, werden ebenfalls nach transienter Transfektion in F9-Zellen stark exprimiert, wie nach Immunpräzipitation aus Zellextrakten metabolisch ³⁵S-Methionin markierter Zellen mit einem GHFI-spezifischen Antiserum gezeigt werden konnte (Abb. 13b). Transiente Transfektion von GHFI und GHFI/SRF in Anwesenheit eines GHFI-abhängigen Reporterplasmids (GH-CAT; Theill et al., 1989) führt zu einer starken Aktivierung des GH-Promotors (Theill et al., 1989; Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, daß die Proteine in F9-Zellen funktionell sind. vMYB ist ebenso in F9-Zellen funktionell. Transiente Transfektion eines vMYB Expressionsvektors (RSV-vMYB) in Anwesenheit eines vMYB-abhängigen Reporterplasmids (Burk et al., 1991) führt zu einer 7-fachen Aktivierung (Abb. 15). Außerdem besitzen der ER (Green et al., 1986) und das chimäre Protein ER-GAL4 (Webster et al., 1988) transaktivierende Eigenschaften. Expressionsvektoren, die für ER und ER-GAL4 kodieren, sind nach Transfektion in höhere Zellen in der Lage, ein ER-abhängiges Reporterplasmid (Klein-Hitpaß et al., 1986) zu aktivieren (Green et al., 1986; Webster et al., 1988). Starke Transaktivierung wird auch für GAL4-VP16 erhalten, wenn Zellen mit einem Expressionsvektor, der für GAL4-VP16 kodiert, und GAL4-abhängigen Reporterplasmiden transfiziert werden (Sadowski et al., 1988).

Kotransfektion steigender Mengen der Expressionsvektoren, die für GHFI und GHFI/SRF kodieren, können cJun-abhängige Transaktivierung nicht hemmen (Abb. 13c). Aufgrund einer schwachen GHFI-Bindungsstelle innerhalb des -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids führt Überexpression von GHFI und GHFI/SRF sogar zu einer

leichten Induktion der basalen Transaktivierung (Abb. 13c). Dieses Ergebnis zeigt, daß weder die TAD von GHFI noch von SRF effizient mit dem Jun-spezifischen Koaktivator interagieren kann. Im Gegensatz dazu kann sowohl die TAD von GAL4 als auch die TAD von VP16 vJun-abhängige Transaktivierung hemmen. Die basale Transaktivierung wird durch die Expression dieser Proteine nicht signifikant beeinflußt (Abb. 14b). Der ER hat weder auf die durch cJun induzierte noch auf die basale Transaktivierung deutliche Effekte (Abb. 14b).

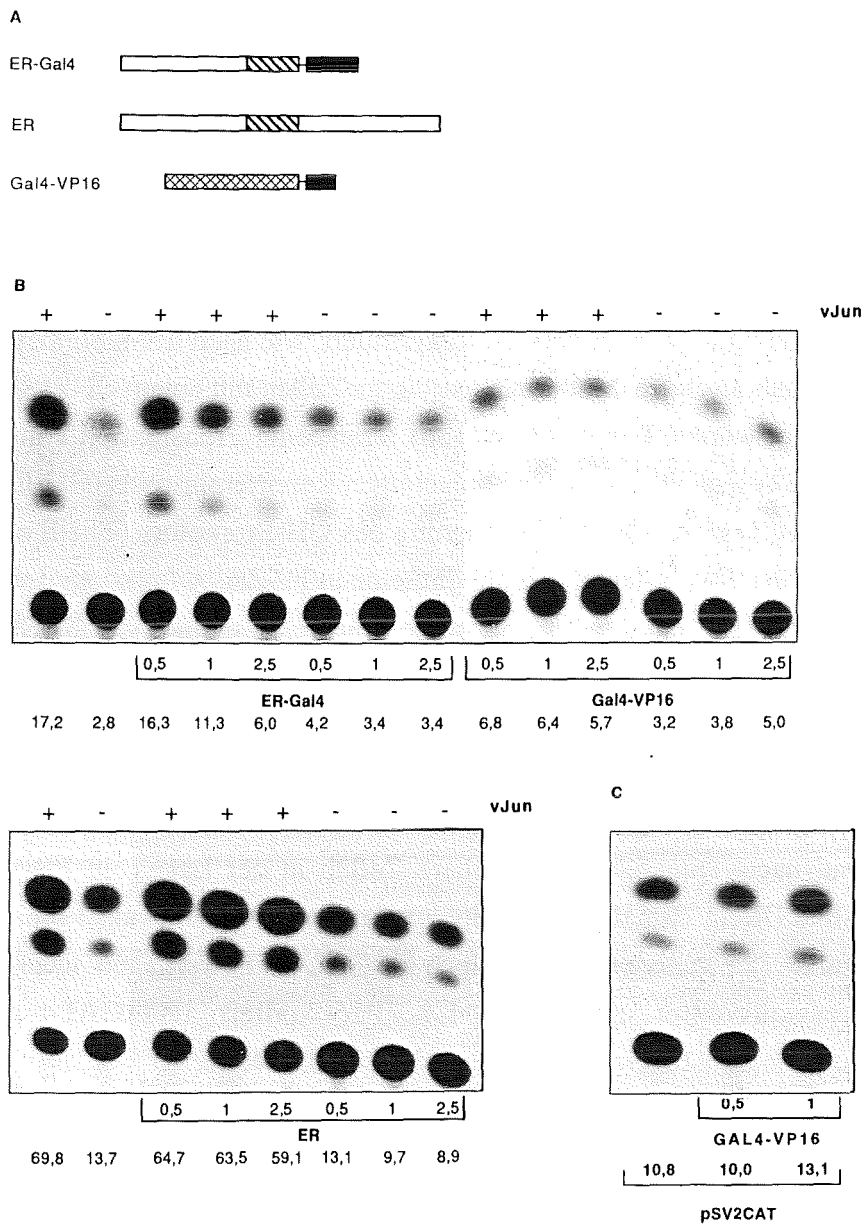


Abb. 14: Expression der TAD von GAL4 und VP16 interferiert mit Jun-abhängiger Transaktivierung. (A) Schematische Darstellung von ER-GAL4, ER und GAL4-VP16. Gepunktete Region, A/B Region des ER, welche TAD-1 entspricht; weiße Region, E/F Region des ER, welche TAD-2 entspricht; kreuzschraffierte Region, GAL4 DNA-Bindungsdomäne; schraffierte Region, DNA-Bindungsdomäne des ER's; schwarze Regionen, TADs von GAL4 und VP16; (B) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit steigenden Mengen (0; 0,5; 1; 2,5µg) der am unteren Rand angegebenen Expressionsvektoren in Anwesenheit oder Abwesenheit eines vJun Expressionsvektors (0,5µg) zusammen mit 5µg des Jun-abhängigen Reporterplasmids -73/+63 CollCAT transfiziert. Da alle Expressionsvektoren unter der Kontrolle des SV40-Promotors stehen, wurde die Menge an DNA pro Transfektion durch einen leeren SV40 Expressionsvektor (pSV) auf 10µg aufgefüllt. Die Zahlen unter den Abbildungen geben die prozentualen Umsatzraten von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen an (Durchschnittswerte von 6 unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 15% voneinander abwichen). (C) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit 2µg pSV2CAT mit steigenden Mengen (0; 0,5; 1µg) eines GAL4-VP16 Expressionsvektors transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Zugabe von pSV auf 10µg pro Transfektion konstant gehalten. Die Zahlen unter der Abbildung geben die Umsatzrate von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen an (Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 10% voneinander abwichen).

Da die Expressionsvektoren für GAL4-VP16, ER-GAL4 und den ER unter der Kontrolle des SV40 Promotor/Enhancers (Serfling et al., 1985) stehen, wurde ein vJun-Expressionsvektor verwendet, der ebenfalls unter der Kontrolle dieser Elemente steht. Dies schließt aus, daß sich verschiedene Expressionssysteme gegenseitig beeinflussen. Um eine Inaktivierung des SV40 Promotor/Enhancers durch die verschiedenen Kompetitoren auszuschließen, wurden konstante Mengen eines SV-CAT-Konstrukts (Gorman et al., 1982a) mit steigenden Mengen eines Expressionsvektors, der für GAL4-VP16 kodiert, in F9-Zellen transfiziert. Wie in Abb. 14c gezeigt, bleibt die Aktivität des SV40 Promotor/Enhancers auch in Anwesenheit steigender Mengen eines Expressionsvektors, der für GAL-VP16 kodiert, konstant.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß Jun, GAL4 und VP16 gemeinsame Faktoren für die Transaktivierung verwenden. Dies korreliert mit der Eigenschaft dieser Transkriptionsfaktoren, daß ihre TADs durch saure Aminosäuren charakterisiert sind. Transkriptionsfaktoren wie GHFI, SRF und der ER, die einen anderen Typ von TAD besitzen, hemmen Jun-abhängige Transaktivierung nicht.

vMYB kann Jun-abhängige Transaktivierung nicht hemmen (Abb. 13c). Dieses Ergebnis war überraschend, da vMYB ebenfalls durch eine "saure TAD" charakterisiert ist (Weston und Bishop, 1989). Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: zum einen könnte es sein, daß vMYB mit anderen Proteinen interagiert,

um zu transaktivieren, zum anderen wäre es möglich, daß die Affinität des Jun-spezifischen Koaktivators viel stärker zu Jun als zu vMYB ist. Dadurch könnte Jun-abhängige Transaktivierung durch vMYB unter diesen experimentellen Bedingungen nicht negativ beeinflußt werden.

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde ein *in vivo* Konkurrenzexperiment durchgeführt, in dem vMYB als Transaktivator und die cJun-TAD als Kompetitor verwendet wurde. Transiente Transfektion eines MYB-abhängigen Reporterplasmids (Burk et al., 1991) mit einem Expressionsvektor für vMYB in F9-Zellen führt zu einer 7-fachen Aktivierung (Abb. 15). Gleichzeitige Transfektion steigender Mengen eines cJun/GHFI Expressionsvektors hemmt teilweise vMYB-abhängige Transaktivierung. Dies ist schon bei Transfektion geringer Mengen des Expressionsvektors, der für cJun/GHFI kodiert, der Fall (Abb. 15). Die Transfektion höherer Mengen des cJun/GHFI Expressionsvektors hat keinen stärkeren Hemmeffekt auf vMYB-abhängige Transaktivierung (Abb. 15).

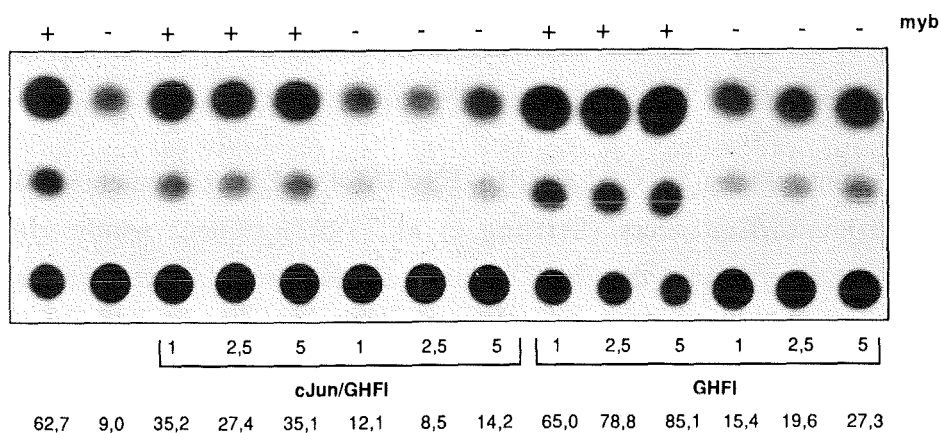


Abb. 15: cJun hemmt teilweise vMYB-abhängige Transaktivierung. Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit steigenden Mengen (0; 0,5; 1; 2,5µg) der unten angegebenen Expressionsvektoren und 5µg eines vMYB-abhängigen Reporterplasmids in Anwesenheit oder Abwesenheit (je 5µg) eines Expressionsvektors, der für vMYB kodiert, transfiziert. Die Gesamtmenge an DNA pro Transfektion betrug 15µg und wurde durch Auffüllen mit entsprechenden Mengen von RSV-0 konstant gehalten. Die unten angegebenen Zahlen beziehen sich auf die prozentuale Umsatzrate von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen (Durchschnittswerte von 5 unabhängigen Experimenten, die eine Abweichung von nicht mehr als 16% aufwiesen).

Dies bedeutet, daß eine für die Transaktivierung von vMYB wichtige Komponente auch von Jun verwendet wird. Aufgrund der inkompletten Hemmung scheint vMYB jedoch

noch andere Faktoren für eine vollständige Transaktivierung zu benötigen. Da schon niedrige transfizierte Mengen des cJun/GHFI Expressionsvektors zu einer Hemmung vMYB-abhängiger Transaktivierung führen, scheint die Affinität von Jun zu dem gemeinsam verwendeten Koaktivator erheblich stärker zu sein. Transfektion des cJun/GHFI Expressionsvektors in steigender Konzentration haben auf die basale Transaktivierung keine Wirkung (Abb. 15). Dieses Ergebnis wurde in einem ähnlichen Experiment auch schon für das -73/-42 tkCAT-Indikatorplasmid erhalten, welches wie das vMYB-abhängige Reporterplasmid den TK-Promotor besitzt (vergleiche Abb. 12). Im Gegensatz zu cJun/GHFI kann die TAD von GHFI vMYB-abhängige Transaktivierung nicht hemmen (Abb. 15). Die Transfektion steigender Mengen des Expressionsvektors, der für GHFI kodiert, führt zu einer schwachen Induktion der basalen und der durch vMYB-induzierten Transaktivierung (Abb. 15). Dies rührt wahrscheinlich von einer schwachen GHFI-Bindungsstelle innerhalb der Vektorsequenzen des MYB-Reporterplasmids her.

Serin 63/73 und eine weitere Region in der cJun-TAD beeinflussen die Affinität von Jun an seinen Koaktivator

Die Phosphorylierung von Serin 63/73 innerhalb der TAD führt zur transkriptionellen Aktivierung von Jun (Franklin et al., 1992; Radler-Pohl et al., 1993). Diese Aktivierung könnte dadurch zustande kommen, daß nach Phosphorylierung der Jun-TAD die Assoziation zwischen Jun und dem Jun-spezifischen Koaktivator verstärkt wird. Um eine Phosphorylierung zu verhindern und damit eine mögliche Assoziation zu schwächen, wurden die Serine im cJun/GHFI-Hybrid in Leuzine mutiert (Abb. 16a). Das mutierte Protein sollte anschließend im *in vivo* Wettbewerbssystem getestet werden. Transiente Transfektion dieses Konstrukts (cJunS63/73/GHFI) und Immunpräzipitation des exprimierten Proteins aus Gesamtzellextrakten metabolisch ³⁵S-Methionin markierter F9-Zellen zeigte jedoch, daß dieses instabil ist (Abb. 16b). Sehr wahrscheinlich wird das exprimierte Protein durch endogene Proteasen rasch degradiert. Um dieses Problem zu umgehen und den Einfluß von Serin 63/73 trotzdem untersuchen zu können, wurde das Jun-Protein vom Huhn verwendet (ccJun). Der Grund hierfür lag in der Tatsache, daß eine vJun/GHFI-Mutante, in der die Serine an Position 63 und 73 in Alanine mutiert sind, nach transienter Transfektion des entsprechenden Expressionsvektors stabil ist (siehe unten). Da sich das Hühner cJun (ccJun) und vJun innerhalb der TAD nur in der δ -Domäne unterscheiden, war es wahrscheinlich, daß der Austausch der entsprechenden Serine im Hühner cJun gegen Alanine die Stabilität des mutierten Proteins nicht beeinflußt. Die TAD von ccJun sowie die TAD der Mutante wurden an die DNA-

Bindungsdomäne von GHFI fusioniert (ccJun/GHFI und ccJunS63/73/GHFI; Abb. 16a). Beide Proteine werden nach transients Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren in gleichem Maße exprimiert, wie nach Immunpräzipitation mit einem Jun-spezifischen Antiserum aus Gesamtzellextrakten metabolisch ³⁵S-Methionin markierter F9-Zellen gezeigt werden konnte (Abb. 16b).

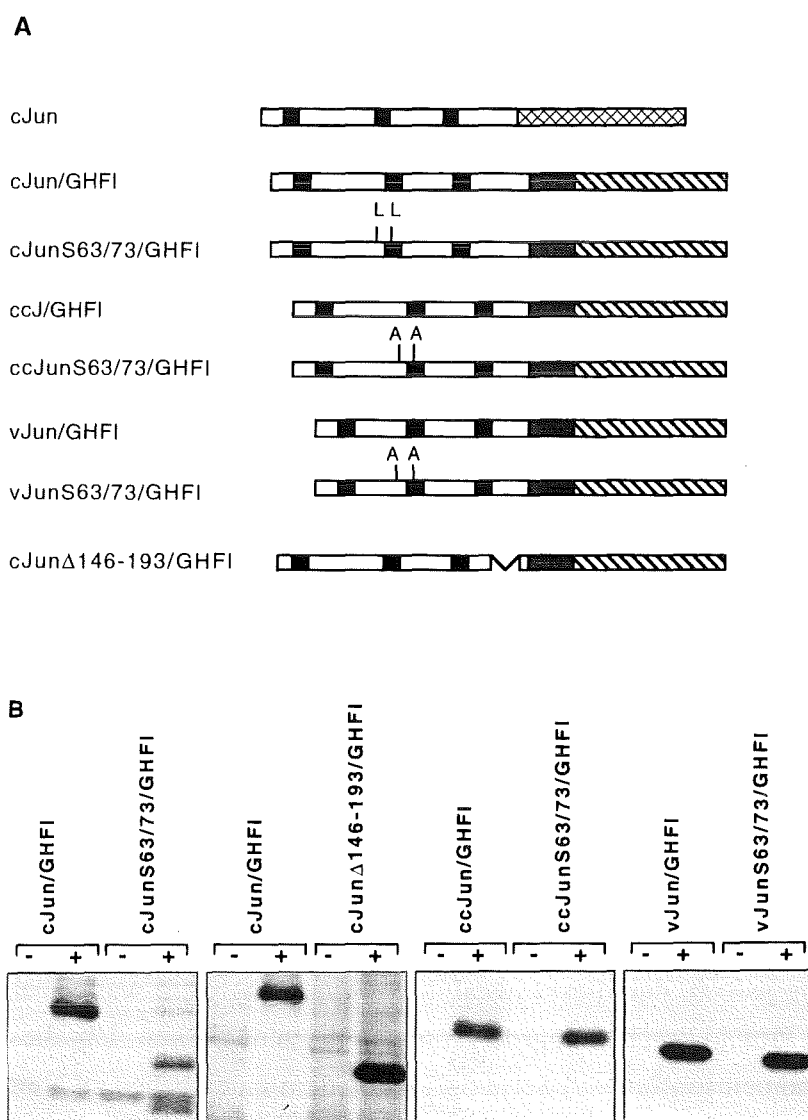
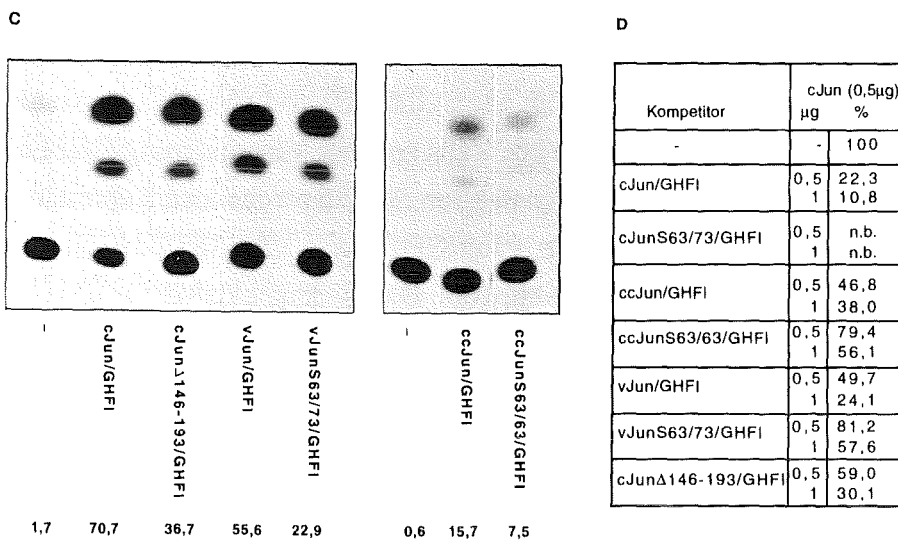


Abb. 16: Serin 63/73 und eine weitere Region in cJun beeinflussen die Kompetition cJun-abhängiger Transaktivierung. (A) Schematische Darstellung von cJun, cJun/GHFI und vJun/GHFI-Hybriden. Schwarze Regionen, TADs von cJun und vJun; kreuzschraffierte Region, cJun DNA-Bindungsdomäne; gepunktete Regionen, POU-Domäne von GHFI; schraffierte Regionen, Homeobox-Domäne von GHFI; weiße Regionen, restliches Protein. Aminosäuren, die als Phosphat-Akzeptorstellen



dienen (Serin 63/73) und in den Mutanten ausgetauscht sind, sind markiert. L, Leuzin; A, Alanin. (B) Nicht-differenzierte F9-Zellen wurden mit je 15µg der oben angegebenen Expressionsvektoren transfiziert und für 2h in ³⁵S-Methionin-haltigem Medium kultiviert. Nach Präparation von Gesamtzellextrakten wurde mit einem unspezifischen Antiserum vorgereinigt (-) und nachfolgend die exogen exprimierte Proteine mit einem Jun-spezifischen Antikörper präzipitiert (+). (C) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit oder ohne 1µg der unten angegebenen Expressionsvektoren zusammen mit je 5µg des Jun-abhängigen -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids transfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA entsprach 10µg und wurde durch Auffüllen mit RSV-0 konstant gehalten. Die Zahlen am unteren Bildrand zeigen die prozentualen Umsatzrate von ¹⁴C-Chloramphenicol in seine acetylierten Formen. (D) Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit steigenden Mengen (0; 0,5; 1µg) der in der linken Spalte angegebenen Expressionsvektoren in Anwesenheit oder Abwesenheit eines cJun Expressionsvektors (0,5µg) zusammen mit je 5µg des Jun-abhängigen -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde mit entsprechenden Mengen von RSV-0 jeweils auf 10µg aufgefüllt. Die Zahlen in der rechten Spalte zeigen den prozentualen Anteil der Aktivierung in Anwesenheit der Kompetitoren verglichen mit der Aktivierung durch Jun ohne Kompetitoren (100%) (Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten, die nicht mehr als 10% voneinander abwichen). n. b., nicht bestimmbar.

Um zu demonstrieren, daß die exprimierte Proteine funktionell aktiv sind, wurden steigende Mengen der Expressionsvektoren, die für ccJun/GHFI und ccJunS63/73 kodieren, zusammen mit einem GHFI-abhängigen CAT-Reporterplasmid (GH-CAT) in F9-Zellen transfiziert. Es zeigte sich, daß beide Proteine das Reporterplasmid transaktivieren können (Abb. 16c). Wie erwartet ist ccJun/GHFI ein stärkerer Transaktivator als ccJunS63/73/GHFI, da aufgrund der fehlenden Serine eine spontane

Phosphorylierung und damit eine Aktivierung nicht mehr möglich ist. Die Aktivität von ccJunS63/73/GHFI ist, verglichen mit dem Wildtyp-Protein, um etwa 50% reduziert. Um die Funktion der δ -Domäne im ccJunS63/73/GHFI-Kontext zu untersuchen, wurden die Serine innerhalb der vJun-TAD im vJun/GHFI-Hybrid ebenfalls in Alanine mutiert (Abb. 16a). Diese Mutationen führen ebenfalls zu einer Verminderung GHFI-abhängiger Transaktivierung nach transienter Transfektion der entsprechenden Expressionsvektoren in F9-Zellen um 50% (Abb. 16c). vJun/GHFI und vJunS63/73/GHFI werden in vergleichbaren Mengen exprimiert (Abb. 16b). Dies bedeutet, daß die in cJun vorhandene δ -Domäne im cJunS63/73/GHFI-Kontext zumindest in F9-Zellen keine Funktion in Hinblick auf die transaktivierenden Eigenschaften hat.

Im *in vivo* Kompetitionssystem führt die Kotransfektion äquimolarer Mengen der Expressionsvektoren, die für ccJun/GHFI und cJun kodieren, in Gegenwart eines Jun-abhängigen Reporterplasmids (-73/+63 CollCAT) zu einer Hemmung der Transaktivierung durch cJun auf 46% (Abb. 16d). Eine weitere Erhöhung auf einen zweifachen Überschuß des Expressionsvektors für ccJun/GHFI verstärkt diesen Effekt (38%). Dasselbe Experiment mit ccJunS63/73/GHFI hemmt cJun-abhängige Transaktivierung erheblich schwächer. Mit äquimolaren Mengen von ccJunS63/73/GHFI wird die Aktivierung durch cJun auf 79%, mit zweifachem Überschuß auf 56% reduziert (Abb. 16d). Ähnliche Ergebnisse werden mit vJun/GHFI, beziehungsweise vJunS63/73/GHFI erhalten. Äquimolare Mengen von vJun/GHFI repräsentieren Jun-abhängige Transaktivierung auf 49%, dagegen reduziert vJunS63/73/GHFI die Aktivierung durch cJun nur auf 81% (Abb. 16d). Eine zweifache Erhöhung der Menge der Kompetitoren führt bei vJun/GHFI zu einer Hemmung auf 24%, bei der Serinmutante nur auf 58% (Abb. 16d). Dies bedeutet, daß die Phosphorylierung von Serin 63/73 eine wichtige Rolle für die Interaktion mit dem Jun-spezifischen Koaktivator spielt. Interessanterweise ist cJun/GHFI ein stärkerer Kompetitor als vJun/GHFI (Abb. 16d; vergleiche auch Abb. 11c und 13c). Wenn die Expressionsvektoren für cJun/GHFI und cJun in F9-Zellen kotransfiziert werden, so wird die Induktion des -73/+63 CollCAT-Indikatorplasmids auf 22%, bei identischer Menge des Expressionsvektors, der für vJun/GHFI kodiert, auf 49% gehemmt (Abb. 16d). Das vJun/GHFI-Hybrid unterscheidet sich aus klonierungstechnischen Gründen von cJun/GHFI in einer 47 Aminosäuren Deletion, die der Region der Aminosäuren 146-193 in cJun entspricht. Um zu prüfen, ob die geringere Hemmung durch vJun/GHFI auf diese Region zurückzuführen ist, wurde sie in cJun/GHFI deletiert (cJun Δ 146-193/GHFI; Abb. 16a). Das Hybrid wird nach transienter Transfektion in F9-Zellen sogar stärker exprimiert als cJun/GHFI (Abb. 16b). Transiente Transfektion des Expressionsvektors für cJun Δ 146-193/GHFI in Gegenwart eines GHFI-abhängigen Reporterplasmids (GH-CAT) führt

zwar zu dessen Aktivierung, sie ist jedoch um 50% reduziert, verglichen mit der Aktivierung durch cJun/GHFI (Abb. 16c). Einen weiteren Beweis, daß diese Region für die Transaktivierung eine wichtige Rolle spielt, konnte im *in vivo* Kompetitionssystem demonstriert werden. Transiente Transfektion des Expressionsvektors, der für cJun Δ 146-193/GHFI kodiert, zusammen mit einem cJun Expressionsvektor in äquimolaren Mengen reduziert die Aktivierung des -73/+63 CollCAT-Reporterplasmids auf lediglich 59%, unter denselben experimentellen Bedingungen mit cJun/GHFI wird cJun-abhängige Transaktivierung auf 22% reduziert (Abb. 15d). Eine zweifache Erhöhung des Expressionsvektors, der für cJun Δ 146-193/GHFI kodiert, führt zu einer Hemmung auf 30%, mit einem Expressionsvektor für cJun/GHFI auf 11% (Abb. 16d). Dies läßt den Schluß zu, daß diese Region ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Interaktion zwischen Jun und seinem spezifischen Koaktivator spielt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ist, daß ein cJun-Protein, das zwischen den Aminosäuren 146-221 deletiert ist, eine um etwa 25% reduzierte Transaktivierungsaktivität aufweist (Angel et al., 1989). Hingegen ist eine Mutante, der nur die Aminosäuren 194-223 fehlen, in ihrer Transaktivierung nicht beeinflusst (Angel et al., 1989). Dadurch läßt sich eine transaktivierende Region den Aminosäuren 146-194 zuordnen. Allerdings ist diese Region nur bei Anwesenheit der drei anderen aktivierenden Domänen funktionell, da die Deletion von TADI-III zum kompletten Verlust der Transaktivierung führt (Angel et al., 1989).

p52/54 interagiert mit der Jun-TAD

Während die beschriebenen Experimente nur ein indirekter Beweis für die Existenz eines Jun-spezifischen Koaktivators sind, wurde versucht, eine direkte Interaktion zwischen der Jun-TAD und anderen Proteinen zu zeigen. Da vJun/GHFI Jun-abhängige Transaktivierung hemmen kann, Deletionsmutanten innerhalb der vJun-TAD diese Eigenschaft jedoch nicht mehr besitzen, kann angenommen werden, daß eine Assoziation des Jun-spezifischen Koaktivators nur in Anwesenheit der kompletten Jun-TAD möglich ist. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, nach transienter Transfektion der Expressionsvektoren für vJun/GHFI oder den entsprechenden Deletionsmutanten (Δ 6-12, Δ 6-58, Δ 6-91; vergleiche Abb. 11a) in F9-Zellen die exogen exprimierten Proteine nach metabolischer Markierung mit ^{35}S -Methionin mit einem GHFI-spezifischen Antiserum aus Gesamtzellextrakten zu präzipitieren und zu analysieren, ob mit vJun/GHFI Proteine durch Assoziation an die vJun-TAD kopräzipitiert werden, die bei den Deletionsmutanten nicht detektiert werden können. Wie in Abb. 17a gezeigt, können mit vJun/GHFI drei Proteine kopräzipitiert werden, die ein Molekulargewicht von 52, 53 und 54kd (p52/54)

besitzen. Dies ist ebenso möglich, wenn vJun/GHFI mit einem Jun-spezifischen Antiserum präzipitiert wird (Abb. 17b). Im Gegensatz dazu wird p52/54 mit den vJun/GHFI-Mutanten, denen Teile der TAD fehlen, nicht kopräzipitiert. Dies bedeutet zum einen, daß p52/54 nicht mit dem GHFI-Anteil interagiert, da alle Hybride denselben Aminosäurebereich aus GHFI besitzen. Zum anderen hängt die Kopräzipitation von p52/54 von der Anwesenheit der kompletten vJun-TAD ab. Daß vJun/GHFI mit p52/54 interagieren kann, korreliert mit seiner Eigenschaft, cJun-abhängige Transaktivierung hemmen zu können. Mutanten, denen Teile der vJun-TAD fehlen, haben keinen Einfluß auf cJun-abhängige Transaktivierung (Abb. 11c). Dies läßt den Schluß zu, daß p52/54 der limitierende Faktor für Jun-abhängige Transaktivierung sein könnte.

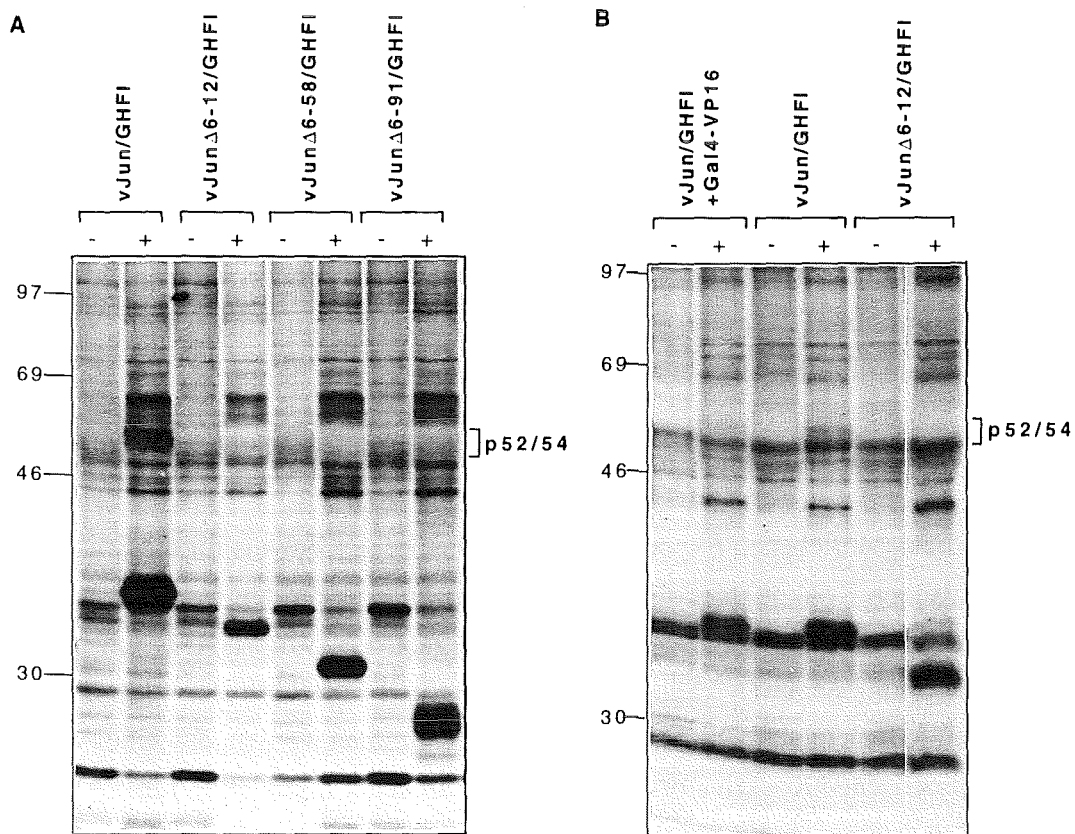


Abb. 17: Kopräzipitation von p52/54 mit der vJun-TAD. (A) Je 15µg der oben angegebenen Expressionsvektoren wurden in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert, die Zellen für 2h in ³⁵S-Methionin-haltigem Medium kultiviert und Gesamtzellextrakte präpariert. Die Extrakte wurden mit einem unspezifischen Antiserum vorgereinigt (-). Anschließend wurden die vJun/GHFI-Hybride mit einem GHFI-spezifischen Antiserum aus den Extrakten präzipitiert (+). Die Position von p52/54 ist an der rechten Seite angegeben. Die Zahlen links stellen die Größen eines Proteinmarkers in kd dar. (B) 10µg des

Expressionsvektors für vJun/GHFI wurde in Anwesenheit oder Abwesenheit eines GAL4-VP16 Expressionsvektors (5µg) in undifferenzierte F9-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde ein Expressionsvektor für vJunΔ6-12/GHFI (15µg) transfiziert. Die Gesamtmenge an DNA pro Transfektion betrug 15µg und wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an pSV konstant gehalten. Anschließend wurden die Zellen für 2h metabolisch mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert, Gesamtzellextrakte präpariert und die Extrakte mit einem unspezifischen Antiserum vorgereinigt (-). Danach wurden die vJun/GHFI-Hybride mit einem Jun-spezifischen Antiserum aus den Extrakten präzipitiert (+). Die Position von p52/54 ist auf der rechten Seite angegeben. Die Zahlen auf der linken Seite entsprechen den Größen eines Proteinmarkers in kd.

Um auszuschließen, daß es sich bei p52/54 um eine modifizierte Form von vJun/GHFI handelt, wurde der Expressionsvektor, der für vJun/GHFI kodiert, in F9-Zellen transfiziert, diese metabolisch mit ³⁵S-Methionin markiert und die präparierten Extrakte vor der Immunpräzipitation denaturiert. Die Denaturierung der Extrakte führt zu einem Verlust der Assoziation von p52/54 an die vJun-TAD (Daten nicht gezeigt).

Da VP16 in der Lage ist, vJun-abhängige Transaktivierung zu hemmen (Abb. 14b), war es offensichtlich zu fragen, ob diese Hemmung durch kompetitive Bindung von VP16 an p52/54 hervorgerufen wird. Um diese Frage zu klären, wurde der vJun/GHFI Expressionsvektor in Anwesenheit oder Abwesenheit des GAL4-VP16 Expressionsvektors in F9-Zellen transfiziert, die Zellen metabolisch mit ³⁵S-Methionin markiert und das vJun/GHFI-Protein mit einem Jun-spezifischen Antiserum aus Gesamtzellextrakten präzipitiert. Koexpression von VP16 verhindert zu 80% eine Bindung der vJun-TAD an p52/54, verglichen mit der Immunpräzipitation, in der nur vJun/GHFI transfiziert wurde (Abb. 17b). Dieses Ergebnis wurde nach Ausschneiden der spezifisch präzipitierten Banden aus dem Gel und Messung der Radioaktivität erhalten. Obwohl nicht ganz auszuschließen ist, daß GAL4-VP16 die Expression von p52/54 inhibiert, implizieren die erhaltenen Ergebnisse, daß die vJun-TAD und VP16 um die Bindung an p52/54 konkurrieren. Dies korreliert nicht nur mit der Hemmung vJun-abhängiger Transaktivierung durch VP16, sondern auch mit der Tatsache, daß sehr niedrige Konzentrationen von VP16 dafür ausreichen. Ein Verhältnis von 3:1 der transfizierten Expressionsvektoren für vJun/GHFI und VP16 bewirkt, daß p52/54 nur noch zu 20% an die TAD von Jun bindet, die restlichen 80% werden durch VP16 rekrutiert.

Versuche zur Klonierung von p52/54

Um ein Protein hinsichtlich seiner strukturellen und biochemischen Eigenschaften untersuchen zu können, muß das dafür kodierende Gen identifiziert werden. Um das für

p52/54 kodierende Gen zu identifizieren, sollte die Interaktion zwischen p52/54 und der vJun-TAD in einem *in vitro* System ausgenutzt werden. Hierfür werden Proteine, die von einer cDNA-Phagenbibliothek kodiert werden, auf Filter übertragen und mit einem bakteriell exprimierten Protein inkubiert. Das bakteriell exprimierte Protein bindet spezifisch an Proteine, die sich auf dem Filter befinden. Um die Interaktion zwischen bakteriell exprimiertem Protein und den Proteinen auf dem Filter detektieren zu können, wird das bakterielle Protein zuvor mit Biotin markiert. Biotin hat eine sehr starke Affinität zu Streptavidin, einem 60kd Protein aus *Streptomyces avidinii*. Streptavidin besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei jede Untereinheit eine Bindungsstelle für Biotin besitzt (Pierce, ImmunoTechnology Handbook, D-33). Durch Verwendung von an Streptavidin gekoppelter alkalischer Phosphatase kann nach Bindung von Streptavidin an Biotin die alkalische Phosphatase für eine Farbreaktion verwendet werden. Sie setzt einen gelben Farbstoff (4-Nitrotetrazolium-chloridblau) enzymatisch in einen blauen Farbstoff um. (Der gesamte entstandene Komplex ist in Abb. 18 schematisch dargestellt). Auf diese Weise können interagierende Proteine identifiziert und die dafür kodierenden Gene kloniert werden.

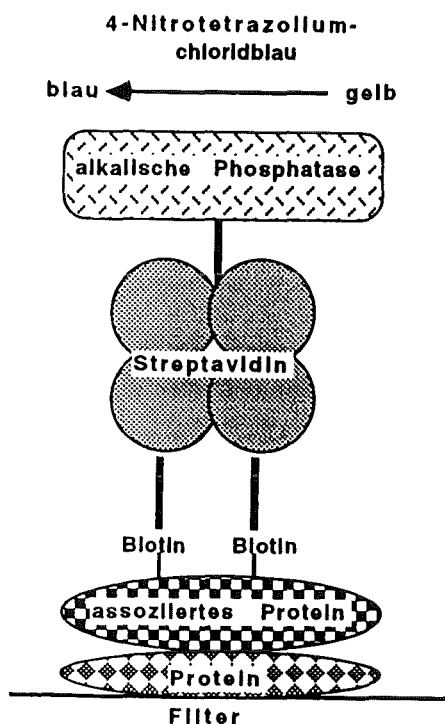


Abb. 18: Schematische Darstellung der Detektion von Protein-Protein Interaktionen mit biotinylierten Proteinen.

Mit dieser Methode ist ein Protein identifiziert worden, welches an die "Leuzin-Zipper"-Struktur des Jun-Proteins bindet (CRE-BP1; Macgregor et al., 1990). Um das Gen, welches für p52/54 kodiert, zu klonieren, wurden zunächst die Bedingungen ermittelt, die eine Klonierung von Genen mit Hilfe der Interaktion durch den "Leuzin-Zipper" erlauben. Die cJun DNA-Bindungsdomäne und die vJun-TAD wurden als bakterielle Glutathion-S-Transferase (GST; 3X)-Fusionsproteine (Smith und Johnson, 1988) exprimiert und aus dem bakteriellen

Rohextrakt über eine Glutathionsäule gereinigt (3X-Jun-DBD, 3X-Jun-TAD; Abb. 19b). Da nur lösliches Protein an die Glutathionsäule bindet, sind die gereinigten Proteine in einem nativen Zustand und müssen nicht durch Denaturierungs- und

Renaturierungsschritte wieder in einen nativen Zustand überführt werden. Beide Proteine sind im bakteriellen System gut exprimierbar. Die Ausbeute beträgt für 3X-Jun-DBD etwa 100µg pro 200ml Bakterienkultur, für 3X-Jun-TAD etwa 350µg pro 200ml Bakterienkultur. Die gereinigten Proteine besitzen nur noch geringe Mengen an bakteriellen Kontaminanten (Abb. 19b). Allerdings treten vor allem bei 3X-Jun-DBD Degradationsprodukte auf, die aber für das durchzuführende Experiment keine Rolle spielen. Bei diesen Abbauprodukten kann es sich nur um Proteine handeln, die im Jun-Anteil teilweise degradiert sind, da eine Reinigung der Fusionsproteine über eine Glutathionsäule nur dann möglich ist, wenn der GST-Anteil vollständig vorhanden ist.

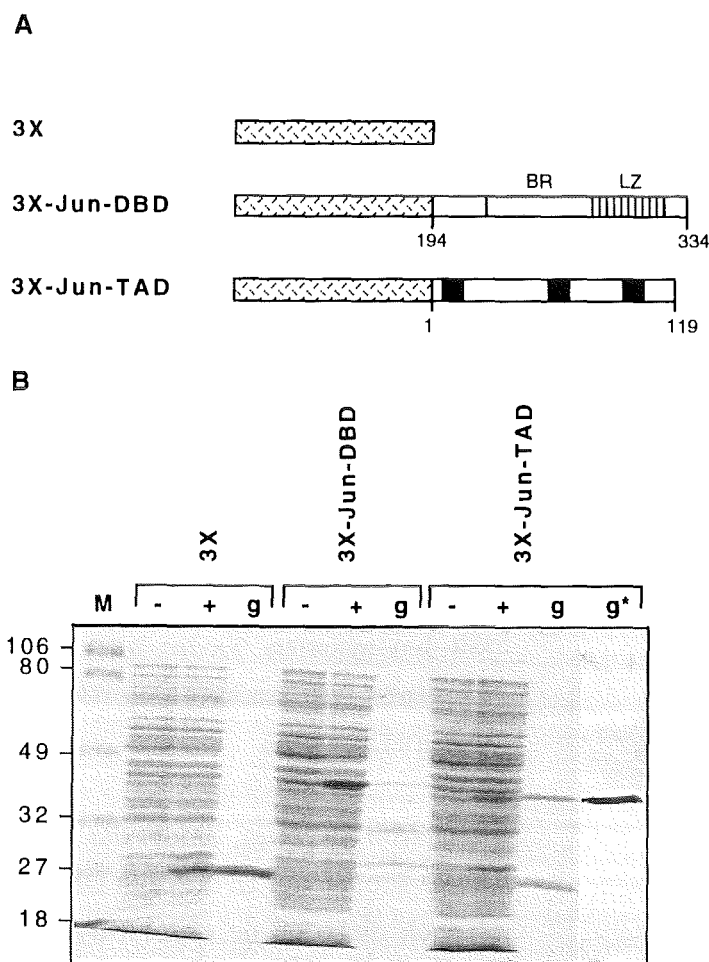


Abb. 19: Expression und Reinigung von 3X-Jun-Fusionsproteinen. (A) Schematische Darstellung von 3X und der 3X-Jun-Hybride. Gestrichelte Regionen, 3X-Anteil (Glutathion-S-Transferase); gepunktete Region, basische Region (BR) der cJun DNA-Bindungsdomäne; schraffierte Region, "Leuzin-Zipper" (LZ) der cJun DNA-Bindungsdomäne; schwarze Regionen, transaktivierende Domänen innerhalb der vJun-TAD;

weiße Regionen, restliche Aminosäuresequenzen von cJun und vJun. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen innerhalb der Jun-Proteine. (B) Je 1 ml einer mit IPTG induzierten (+) oder nicht induzierten (-) Bakterienkultur wurden nach Sedimentation der Bakterien in 100µl Protein-Ladepuffer aufgekocht, davon 10µl auf ein 10% Proteingel geladen und nach elektrophoretischer Auftrennung mit Coomassie-Blau gefärbt. Die exprimierten Proteine sind oben angegeben. Auf den Spuren, die mit g bezeichnet sind, sind jeweils 3µg gereinigtes Protein aufgetragen. Die erwartete Größe der einzelnen Proteine ist 26kd für 3X, 44kd für 3X-Jun-DBD und 42kd für 3X-Jun-TAD. Proteinbanden unterhalb der erwarteten Größe sind Degradationsprodukte der jeweiligen Proteine und besitzen Deletionen am C-Terminus, Proteinbanden oberhalb der erwarteten Größen sind Kontaminationen durch bakterielle Proteine. g* zeigt eine zweite, unabhängige Präparation von 3X-Jun-TAD. Hier wurden 500ng des gereinigten Proteins aufgetragen und das Gel mit Silbernitrat gefärbt. Bei dieser Präparation sind keine Abbauprodukte zu erkennen. M, Proteinstandards. Die Größen der Proteinstandards sind am linken Bildrand in kd angegeben.

Identische Mengen von 3X-Jun-DBD und 3X-Jun-TAD wurden auf ein denaturierendes Proteingel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Nach Inkubation mit biotinyliertem 3X-Jun-DBD wurden Protein-Protein Interaktionen mit der beschriebenen Methode sichtbar gemacht (Streptavidin-alkalische Phosphatase).

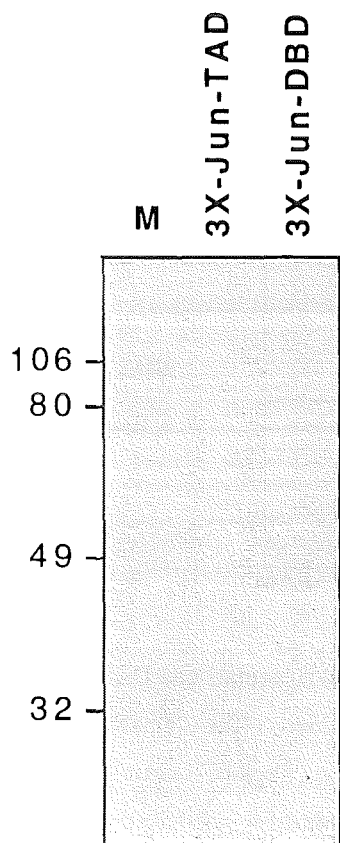


Abb. 20: Detektion der cJun DNA-Bindungsdomäne durch Protein-Protein Interaktion mit biotinyliertem 3X-Jun-DBD Protein. Identische Mengen (je 200ng) der oben angegebenen Proteine wurden auf ein 10% Proteingel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit biotinyliertem 3X-Jun-DBD Protein inkubiert. M, vorgefärbte Proteinstandards. Die Größen der Proteinstandards sind in kd angegeben.

Wie Abb. 20 zeigt, bindet das biotinylierte 3X-Jun-DBD-Protein nur an die cJun DNA-Bindungsdomäne, jedoch nicht an die vJun-TAD oder den 3X-Anteil. Dies bedeutet, daß die Dimerisierung der Jun DNA-Bindungsdomäne *in vitro* nachvollzogen werden kann und das System eine sehr hohe Spezifität besitzt. Außerdem bindet das biotinylierte 3X-Jun-DBD-Protein nur an die komplette DNA-Bindungsdomäne. Abbauprodukte, denen Teile des "Leuzin-Zippers"

fehlen, können nicht mehr dimerisieren (vergleiche Abb. 19b).

Um das Gen zu klonieren, welches für p52/54 kodiert, wurden 1,5 Millionen Phagen einer cDNA-Bibliothek aus Jurkat-Zellen (menschliche T-Zelllinie) auf 50 große Petrischalen ($\varnothing 15\text{cm}$) ausplattiert. Nach Inkubation mit biotinyliertem 3X-Jun-TAD und nachfolgender Detektion durch die alkalische Phosphatasereaktion, konnten 11 Phagenklone identifiziert werden, die mit 3X-Jun-TAD interagieren (Daten nicht gezeigt). Diese wurden von den verschiedenen Platten isoliert, erneut ausplattiert und derselben Prozedur nochmals unterzogen.

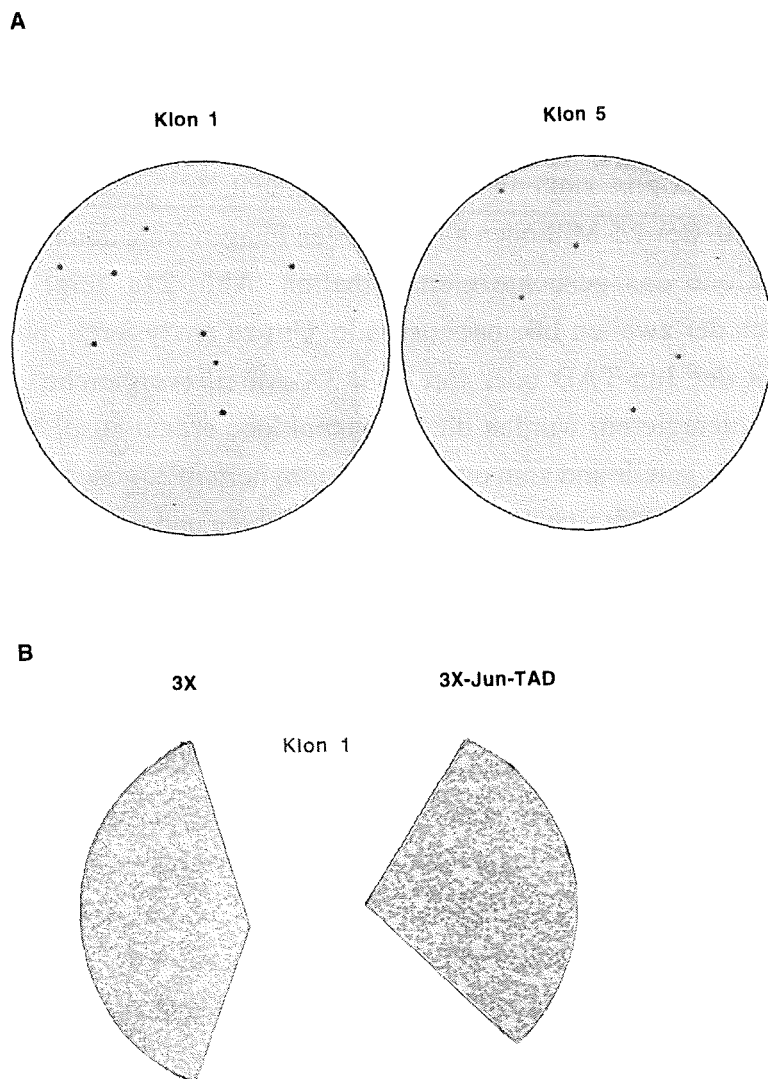


Abb. 21: Protein-Protein Interaktion der Jun-TAD mit Proteinen, die von einer Phagenbibliothek exprimiert sind. (A) Die beiden oberen Filter zeigen die Interaktion der biotinylierten Jun-TAD mit Proteinen, die von zwei unabhängigen Phagen exprimiert werden (Klone 1 und 5). Positive Signale

erscheinen als kleine Kreise, da die Proteine nur in frisch von Phagen infizierten Bakterien exprimiert werden. Die Phagenklone stammen aus der zweiten Hybridisierungsrunde. Es wurden etwa 200 Phagen pro Petrischale ausplattiert. Nicht interagierende Proteine zeigen kein Signal. (B) Die Proteine, die von den jeweiligen Phagen exprimiert werden, wurden auf Filter übertragen, die Filter geteilt und entweder mit biotinyliertem 3X oder 3X-Jun-TAD Protein inkubiert (ein Phagenklon ist repräsentativ gezeigt). Positive Signale erscheinen als kleine Kreise.

Nach der zweiten Inkubationsrunde mit biotinyliertem 3X-Jun-TAD blieben von den anfangs 11 Phagenklonen 9 übrig, die eine Interaktion zeigten. Die Anzahl der isolierten Klone entspricht den Erwartungen. Eine mRNA, die in einer Zelle schwach exprimiert wird, ist laut Statistik unter 50000 RNA-Spezies einmal repräsentiert. Da es sich bei der cDNA-Bibliothek zwar um eine gerichtete Expressionsbank handelt, das heißt die cDNA ist in der korrekten Orientierung zwischen die Phagen-Arme integriert, es jedoch drei verschiedene Leseraster gibt, sinkt die Wahrscheinlichkeit, den gesuchten Phagenklon zu finden auf 1:150000. Bei 1,5 Millionen ausplattierten Phagen wäre demnach zu erwarten, daß 10 Phagenklone das gesuchte Gen enthalten. Abb. 21a zeigt zwei typische Phagenklone nach der zweiten Inkubationsrunde. Um zu analysieren, ob die isolierten Phagenklone mit der Jun-TAD oder mit dem 3X-Anteil (vergleiche Abb. 19a) des Fusionsproteins interagieren, wurden die 9 Phagenklone erneut ausplattiert, auf Filter übertragen, die Filter geteilt und zum einen mit biotinyliertem 3X oder mit 3X-Jun-TAD inkubiert. Der 3X-Anteil läßt sich sehr effizient exprimieren und reinigen (Abb. 19b). Die Ausbeute beträgt etwa 1mg pro 200ml Bakterienkultur. Es zeigte sich, daß alle von den Phagenklonen exprimierten Proteine sowohl mit 3X als auch mit 3X-Jun-TAD ein positives Signal ergeben (Abb. 21b; ein Phagenklon ist repräsentativ gezeigt). Das bedeutet, daß alle identifizierten Proteine, die von den Phagenklonen exprimiert werden, mit 3X interagieren. Eine Interaktion mit der Jun-TAD kann nicht völlig ausgeschlossen werden, da aufgrund der Interaktion von 3X mit den von den Phagenklonen exprimierten Proteinen bereits ein sehr starkes Signal beobachtet wird, welches das von der Jun-TAD hervorgerufene Signal überdecken könnte. Daß jedoch 9 verschiedene Proteine jeweils mit 3X und der Jun-TAD interagieren, ist äußerst unwahrscheinlich. Eine weitere Analyse ergab, daß es sich, zumindest auf Restriktionsverdauebene nach Isolierung der Phagen-DNA, um drei Gruppen von Genen handelt, die vier-, drei- und zweimal repräsentiert sind. Die Klone wurden teilweise sequenziert und zum einen als Pyruvat-Carboxylase und zum anderen als ein Gen identifiziert, welches 92% Homologie zur Maus-AcetylCoA-Carboxylase besitzt. Das dritte isolierte Gen ist bisher unbekannt. Obwohl die Interaktion zwischen Proteinen auf der Basis dieser Methode prinzipiell funktioniert, was durch die Dimerisierung der Jun-DBD und der Identifikation identischer

Klone, die an 3X binden, demonstriert werden konnte, ist sie für die Klonierung von Jun-TAD-assoziierten Proteinen anscheinend nicht geeignet.

DISKUSSION

Transkriptionsfaktoren müssen aufgrund ihrer zentralen Stellung in der Regulation der Genexpression selbst ebenfalls streng reguliert werden. Beim Transkriptionsfaktor Jun ist dies auf zwei Ebenen möglich: zum einen durch Kontrolle der Expressionsrate des Jun-Proteins (Angel et al., 1988b), zum anderen durch post-translationale Modifikationen. Bei post-translationalen Modifikationen des Jun-Proteins sind vor allem die DNA-Bindungsdomäne und die TAD betroffen. Die Aktivität der DNA-Bindungsdomäne kann durch Phosphorylierung (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992), Interaktion mit anderen Proteinen (Halazonetis et al., 1988) und einen postulierten Redox-Mechanismus (Abate et al., 1990) in seiner Aktivität moduliert werden, die Aktivität der TAD durch Phosphorylierung (Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991).

Die Frage nach der physiologischen Relevanz des bisher nur *in vitro* demonstrierten Redox-Mechanismus wurde durch transiente Transfektionen in F9-Zellen untersucht. Es wurden Jun-Mutanten verwendet, die *in vitro* unter oxidativen Bedingungen nicht mehr regulierbar sind. Damit Jun seine transaktivierenden Eigenschaften ausüben kann, sind DNA-Bindung und die Interaktion mit Faktoren notwendig, die die Jun-TAD mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie verbinden. Welche Regionen innerhalb der Jun-TAD mit diesen Faktoren interagieren, wie die Interaktion mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie reguliert wird und ob andere Transkriptionsfaktoren dieselben Transaktivierungsmechanismen besitzen wie Jun, wurde mit Hilfe eines *in vivo* Kompetitionssystems untersucht. Um Faktoren zu identifizieren, die mit der Jun-TAD assoziiert sind, wurden Präzipitationen von exogen exprimierten Jun-Proteinen durchgeführt. Proteine, die an die Jun-TAD binden, werden kopräzipitiert und können dadurch identifiziert werden. Die Resultate werden im folgenden diskutiert.

Mutation von Cys-252 verhindert die Bindung von Jun an DNA

Die DNA-Bindung von Jun kann durch Phosphorylierung und einen Redox-Mechanismus, zumindest *in vitro*, reguliert werden. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Regulationsmöglichkeiten ist in Abb. 22 gezeigt. An der Phosphorylierung sind die Proteinkinasen GSK3 und CKII beteiligt (Boyle et al., 1991, Lin et al., 1992), an der Redox-Regulation Ref-1 (Xanthoudakis und Curran, 1992). Die Aminosäure, die von Ref-1 modifiziert wird, befindet sich an Position 252 innerhalb der DNA-Bindungsdomäne des Jun-Proteins. Der Austausch von Cys-252 gegen Serin hebt die transaktivierenden Eigenschaften von Jun vollständig auf.

ccJun-DNA-Bindungsdomäne

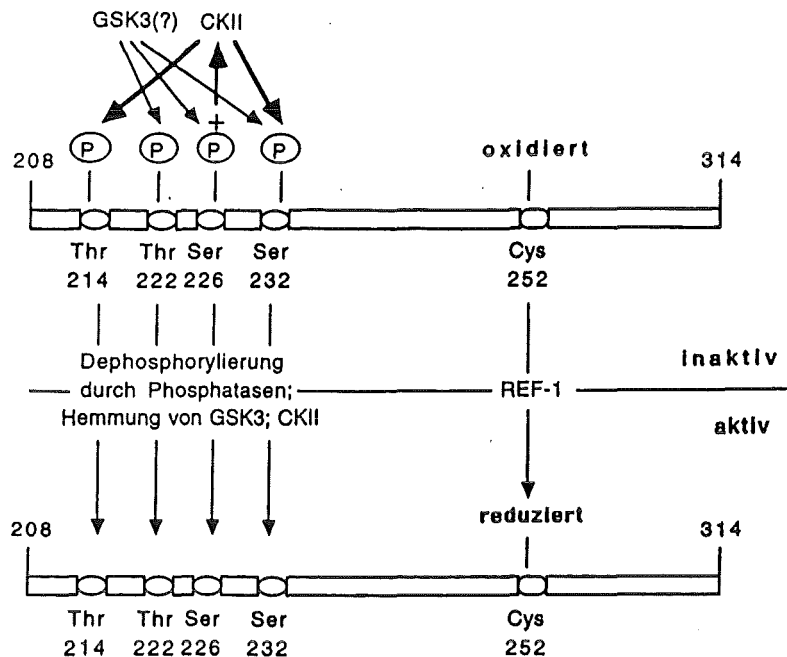


Abb. 22: Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Regulation der ccJun DNA-Bindungsdomäne. GSK3, Glykogen-Synthase-Kinase 3; CKII, Kaseinkinase II; REF-1, Redox-Faktor 1; Ser, Serin; Thr, Threonin; Cys, Cystein. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren innerhalb des Hühner cJun-Proteins. P, Phosphatrest. Mögliche Phosphorylierungsstellen sind gekennzeichnet. Die Erkennungsstellen der Kinasen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. "+", welches sich über dem Phosphatrest in Position 226 befindet, kennzeichnet die erste Phosphorylierungsstelle der Phosphorylierungskaskade.

In "Gel-Retardations"-Experimenten zeigte sich, daß diese Mutante weder unter reduzierenden noch unter oxidierenden Bedingungen an DNA binden kann. Damit kann die fehlende Transaktivierungsfähigkeit erklärt werden. Der Grund hierfür könnte eine Strukturänderung der DNA-Bindungsdomäne sein, die eine Assoziation an DNA nicht mehr erlaubt. Im Gegensatz dazu zeigen Abate et al., 1990, daß eine ähnliche Mutante, in der ebenfalls Cys-252 gegen Serin ausgetauscht ist, *in vitro* sowohl unter reduzierenden als auch oxidierenden Bedingungen an DNA bindet. Der Grund für dieses konträre Verhalten hinsichtlich der Cys-252 Mutante ist sehr wahrscheinlich damit zu erklären, daß in Abate et al., 1990 nicht das komplette Jun-Protein verwendet wurde, sondern eine Mutante, die lediglich die minimale DNA-Bindungsdomäne (basische Region und "Leuzin-Zipper") des Jun-Proteins enthält. Es ist möglich, daß die N-terminale Hälfte von Jun einen wichtigen Einfluß auf die Tertiärstruktur der DNA-Bindungsdomäne hat.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß durch Austausch der Jun-TAD gegen funktionell homologe Regionen des Fos-Proteins die DNA-Bindungsaktivität von Jun stark vermindert wird (Cohen und Curran, 1990).

Der Mechanismus, wie Reduktion und Oxidation von Cys-252 die Bindungsaktivität von cJun moduliert, ist bisher nicht geklärt. Oxidation von Cysteinen innerhalb eines Proteins können zur Ausbildung von intramolekularen Cysteinbrücken führen, was eine Konformationsänderung innerhalb des Jun-Proteins zur Folge haben könnte. An Position 303 des cJun-Proteins befindet sich ein weiterer Cysteinrest, dessen Austausch gegen eine andere Aminosäure jedoch weder einen Einfluß auf die DNA-Bindung unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen (Abb. 7; Abate et al., 1990) noch auf die Transaktivierungsfähigkeit (Abb. 5c) des cJun-Proteins hat. Weitere Cysteine sind jedoch in der von Abate et al., 1990 verwendeten Region des cJun-Proteins nicht vorhanden, was eine Redox-Regulation hervorgerufen durch intramolekulare Cysteinbrückenbildung unwahrscheinlich macht. Andererseits besitzt auch das Fos-Protein an einer ähnlichen Position wie Jun einen Cysteinrest, wodurch eine intermolekulare Cysteinbrückenbildung denkbar wäre. Die DNA-Bindungsaktivität von Fos ist *in vitro* ebenfalls durch oxidierende Agenzien hemmbar (Abate et al., 1990). Da Jun und Fos über den "Leuzin-Zipper" interagieren, würde eine intermolekulare Cysteinbrückenbildung eine weitere Interaktionsstelle zwischen Fos und Jun darstellen. Dies könnte zu einer Konformationsänderung der Jun-Fos Heterodimere führen und damit zur Hemmung der DNA-Bindung.

Teilweise Wiederherstellung der cJun Cys-252 DNA-Bindungsaktivität durch Dimerisierung mit Fos

cJun Cys-252 kann zwar selbst nicht mehr an DNA binden, die Bindungsaktivität wird jedoch in Anwesenheit von Fos *in vitro* teilweise wiederhergestellt (Abb. 8b). Dies erklärt auch, warum die fehlende Transaktivierungsfähigkeit von cJun Cys-252 durch Fos teilweise rekonstituiert wird (Abb. 8a). Für die Bindung von Jun und Fos an DNA ist eine Heterodimerisierung via des "Leuzin-Zippers" notwendig (Kouzarides und Ziff, 1988). Für die nur teilweise Wiederherstellung der DNA-Bindung und der transaktivierenden Eigenschaften gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es könnte sein, daß die Mutation in Cys-252 zu einer Schwächung der Interaktion zwischen Jun und Fos führt. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da in diesem Falle auch Homodimere zwischen cJun Cys-252 eine schwache Bindungsaktivität besitzen müßten. Eine andere Möglichkeit ist, daß die DNA-Bindungsdomäne von cJun Cys-252 in der Weise strukturell verändert ist, daß eine Homo- oder Heterodimerisierung zwar noch möglich ist, aber keine Bindung

der cJun Cys-252 Homodimere. Nach der Heterodimerisierung könnte allerdings Fos DNA-Bindung vermitteln. Da nur ein Partner des Heterodimers, nämlich Fos, an DNA bindet, ist die Bindung geschwächt, aber nicht vollständig aufgehoben.

Mutation in Ser-226 kompensiert die Mutation in Cys-252

Ser-226 ist eine Phosphorylierungsstelle für GSK3 *in vitro*. Die Phosphorylierung von Ser-226 löst eine Kaskade aus, was Phosphorylierungen in den Aminosäuren Thr-214, Thr-222 und Ser-232 zur Folge hat (Abb. 22). An diesen Modifikationen ist außer GSK3 (Boyle et al., 1991) CKII *in vivo* (Lin et al., 1992) beteiligt. Die Phosphorylierungen dieser Aminosäuren haben eine Hemmung der DNA-Bindung zur Folge (Boyle et al., 1991). In vJun ist Ser-226 in Phenylalanin mutiert, wodurch eine Regulation der Bindung durch Phosphorylierung verhindert wird. Dieser Aminosäureaustausch spielt jedoch nicht nur eine Rolle für die phosphorylierungs-unabhängige DNA-Bindung von vJun, sondern sie ist auch eine Vorbedingung für die Redox-unabhängige DNA-Bindung. Die Mutation in Cys-252 könnte zu einer strukturellen Veränderung führen, die die Funktionalität des Proteins nicht mehr gewährleistet. Diese Strukturänderung könnte durch den Aminosäureaustausch von Serin nach Phenylalanin revertiert werden und die Funktionalität wiederherstellen.

Haben Ser-226 und Cys-252 in der Tumorentstehung eine physiologische Relevanz?

Das Hühner cJun (Nishimura und Vogt, 1988) unterscheidet sich von seinem viralen Gegenstück, vJun (Maki et al., 1987), in 3 Aminosäureaustauschen innerhalb der DNA-Bindungsdomäne und einer 27 Aminosäuren Deletion innerhalb der TAD. vJun, dessen Träger das ASV17 (Avian Sarcoma Virus 17; Maki et al., 1987) ist, wurde als onkogener Effektor in Hühner-Fibrosarkomen entdeckt (Cavaliere et al., 1985). Die Induktion von Sarkomen ist auf vJun beschränkt, cJun ist dazu nicht in der Lage. Hühnerfibroblasten werden von vJun effektiv transformiert, cJun hingegen fördert zwar das Wachstum der Fibroblasten, induziert jedoch nicht deren Tumorgenität (Morgan et al., 1993). Weiterhin wurde Jun als Replikationsfaktor identifiziert. Die Überexpression von Jun führt in Zellen zu einer erhöhten DNA-Synthese (Murakami et al., 1990; Morgan et al., 1993), wobei vJun ein stärkerer Induktor als cJun ist (Morgan et al., 1993). Dies zeigt, daß nur wenige Aminosäureaustausche genügen, um die Eigenschaften eines Proteins völlig zu verändern.

Die Aminosäureaustausche in den Positionen 226 und 252 wurden in bisher allen ASV17 Isolaten innerhalb des vJun-Proteins gefunden. Im Gegensatz dazu ist der dritte

Aminosäureaustausch in Position 185 nur in einigen Fällen entdeckt worden (Peter Vogt, persönliche Mitteilung). Dem Aminosäureaustausch in Position 185 konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Er scheint aufgrund des unregelmäßigen Vorkommens keine wichtige Bedeutung zu haben. Auf der anderen Seite scheinen die Aminosäuren in Position 226 und 252 essentiell zu sein, um ASV17 einen Selektionsvorteil zu bieten. Daß bisher keine ASV17 Isolate gefunden wurden, die innerhalb des Jun-Proteins nur in Position 252 mutiert sind, ist offensichtlich, da die Funktionalität des Proteins nicht mehr gewährleistet ist. Allerdings wurden jedoch auch keine viralen Jun-Proteine gefunden, die nur in Position 226 mutiert sind. Zum einen reicht diese Mutation alleine möglicherweise nicht aus, um ASV17 einen Selektionsvorteil zu bieten, zum anderen ist allerdings die Vorbedingung gegeben, durch Mutation im Kodon, welches für Cys-252 kodiert, auch die Unabhängigkeit von der Redox-Regulation zu erwerben. Dies könnte für eine schrittweise Evolution des vJun-Proteins sprechen, wobei zuerst die Unabhängigkeit von der Regulation durch Phosphorylierung, dann die Unabhängigkeit von der Redox-Regulation erfolgte.

Überraschenderweise hat cJun Cys-252 in Hühnerfibroblasten ein starkes Transformationspotential (Morgan et al., 1993), was aufgrund seiner schwachen DNA-Bindungsaktivität unerwartet ist. Eine Möglichkeit könnte sein, daß die Mutante durch eine strukturelle Veränderung innerhalb der DNA-Bindungsdomäne an eine andere DNA-Sequenz bindet und damit andere Zielgene aktiviert. Eine andere Erklärung wäre, daß aufgrund der strukturellen Änderungen das mutierte Protein in der Lage ist, mit zellulären Proteinen zu interagieren, die einen hemmenden Effekt auf die Zellzykluskontrolle besitzen. Diese würden dadurch dem zellulären System entzogen. Beide Möglichkeiten könnten Zelltransformation zur Folge haben.

Da sich vJun und cJun nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden, vJun jedoch zumindest in Hühnern ein stark tumorigenes Potential besitzt, wäre es denkbar, daß Mutationen in den entsprechenden Positionen im menschlichen cJun-Protein ebenfalls zur Tumorentstehung führen könnten. Durch die Mutationen in Ser-226 und Cys-252 wird die Aktivität von cJun erhöht. Dies korreliert mit der Tatsache, daß in vielen bisher untersuchten Tumoren keine erhöhte Jun-Expression gefunden wurde. Eine groß angelegte Untersuchung von menschlichem Tumormaterial in Hinblick auf die beschriebenen Mutationen könnte eventuell eine Korrelation zwischen cJun und der Tumorentstehung im Menschen demonstrieren.

Identifikation von p52/54 als Jun-TAD assoziiertes Protein

In einem *in vivo* Wettbewerbssystem konnte gezeigt werden, daß Jun-abhängige Transaktivierung nicht durch direkte Interaktion auf die basale Transkriptionsmaschinerie vermittelt wird, sondern daß zumindest ein zusätzlicher Faktor benötigt wird. Mit p52/54 konnte erstmals ein Protein identifiziert werden, das mit der Jun-TAD direkt interagiert. Deletionen innerhalb der Jun-TAD führen zum Verlust der Interaktion mit p52/54. Die Assoziation der Jun-TAD und der Deletionsmutanten an p52/54 korreliert mit der Fähigkeit, Jun-abhängige Transaktivierung in einem *in vivo* Wettbewerbssystem hemmen zu können. Nur bei Anwesenheit der gesamten Jun-TAD ist sowohl eine Interaktion mit p52/54 als auch eine Hemmung Jun-abhängiger Transaktivierung möglich. Mit welchen Koaktivatoren ein Transkriptionsfaktor interagiert, hängt von der Aminosäurezusammensetzung seiner TADs ab. Transkriptionsfaktoren wie Jun, GAL4, vMYB und VP16, die eine TAD aus sauren Aminosäuren besitzen, benötigen zumindest einen gemeinsamen zusätzlichen Faktor für Transaktivierung. Hingegen interagieren Transkriptionsfaktoren wie Sp1, CTF, SRF und der ER, die durch einen anderen Typ von TAD charakterisiert sind, mit anderen Faktoren.

VP16 ist nicht nur in der Lage, Jun-abhängige Transaktivierung zu hemmen, sondern kompetiert auch mit der Jun-TAD um die Bindung an p52/54. Andererseits könnte VP16 die Expression von p52/54 verhindern, wodurch ebenfalls eine Assoziation der Jun-TAD an p52/54 verhindert würde. Dies wäre möglich, wenn VP16 dem zellulären System Faktoren entziehen würde, die für die Expression von p52/54 benötigt werden. Da jedoch Jun-TAD Deletionsmutanten p52/54 nicht mehr binden können und deren *in vivo* Wettbewerbsverhalten sowie deren Transaktivierungseigenschaften mit der fehlenden Assoziation mit p52/54 korrelieren, ist diese Erklärung unwahrscheinlich. Interessanterweise wurde für VP16 eine direkte Interaktion mit TBP und TFIIB *in vitro* gefunden (Stringer et al., 1990; Ptashne und Gann, 1990; Lin und Green, 1991; Roberts et al., 1993). Da TBP und TFIIB essentiell sowohl für die basale als auch die aktivierte Transkription sind, wäre zu erwarten, daß VP16 in *in vivo* Wettbewerbsexperimenten die basale Transaktivierung hemmt. VP16 hat jedoch keinen Effekt auf die basale Transaktivierung. Außerdem konnte *in vivo* bisher keine Assoziation beispielsweise durch Kopräzipitation von VP16 und TBP oder TFIIB bewiesen werden. Allerdings gibt es Hinweise, daß TFIIB *in vivo* an VP16-abhängiger Transaktivierung zumindest beteiligt ist. Mutationen in TFIIB können VP16-abhängige Transaktivierung in Hefe modulieren (Dr. Leonard Guarente, persönliche Mitteilung). Ob diese Mutationen die Assoziation von TFIIB an VP16 ändern, oder ob TFIIB-interagierende Proteine, die an VP16-abhängiger Transaktivierung beteiligt sind, beeinflußt werden, ist unbekannt. Daß

VP16 *in vivo* die basale Transaktivierung nicht hemmt, spricht für eine indirekte Interaktion zwischen VP16 und TFIIB.

Obwohl sich die TADs von cJun und vJun in *in vivo* Konkurrenzexperimenten sehr ähnlich verhalten, konnte p52/54 überraschenderweise nur mit der vJun-TAD kopräzipitiert werden. Möglicherweise unterscheidet sich die Tertiärstruktur der cJun-TAD von der der vJun-TAD aufgrund der δ -Domäne. Da die δ -Domäne 27 AS umfaßt, könnte die Faltung in cJun erheblich kondensierter und damit gespannter sein als in vJun, um mit p52/54 zu interagieren. Dadurch könnte sich während der Immunpräzipitation und den nachfolgenden Reinigungsschritten diese Struktur in cJun leichter auflösen und damit eine Interaktion mit p52/54 nicht mehr gewährleisten sein.

Die Integration von p52/54 in den Transkriptionskomplex

Für basale Transkription sind die Faktoren TFIIA, TFIIB, TBP, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TFII-I und die RNA Polymerase II essentiell (Sawadogo und Sentenac, 1990; Zawel und Reinberg, 1992). Diese Faktoren werden schrittweise in einen Komplex integriert, wobei zunächst TBP an die TATA-Box bindet und nachfolgend TFIIB und die anderen Faktoren eingefügt werden (Buratowski et al., 1989). Dieser Komplex wird durch Koaktivatoren (TAFs) und Transkriptionsfaktoren stabilisiert, was zur Aktivierung der Transkription führt. Wie p52/54 in diesen Komplex integriert ist, ist bisher nicht bekannt. Es wäre zum einen möglich, daß p52/54 direkt mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert, zum anderen wäre auch eine Interaktion mit anderen TAFs und damit eine indirekte Interaktion denkbar. Ein Überblick ist in Abb. 23 schematisch dargestellt. Für Sp1-abhängige Transaktivierung konnte gezeigt werden, daß nicht nur TAF110 (Hoey et al., 1993) sondern auch TAF250 notwendig ist (Abb. 23; Ruppert et al., 1993; Weinzierl et al., 1993). Daß p52/54 über TAF110 mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert, ist unwahrscheinlich, da Sp1 durch die Jun-TAD in *in vivo* Konkurrenzexperimenten nicht gehemmt werden kann. Dasselbe gilt für eine Interaktion mit TAF250.

Da Jun/GHFI Hybride, die die Jun-TAD besitzen, Jun-abhängige Transaktivierung effizient hemmen können, jedoch nicht wie Jun homodimerisieren, ist für eine Interaktion mit der Jun-TAD keine Dimerisierung notwendig. Außerdem setzt die Interaktion mit p52/54 keine DNA-Bindung voraus, weil cJun/GHFI im *in vivo* Konkurrenzsystem nicht an das Jun-abhängige Reporterplasmid binden kann. Es könnte daher sein, daß Jun p52/54 bereits als Monomer in Lösung bindet und p52/54 erst nach Dimerisierung und DNA-Bindung in den Transkriptionskomplex integriert wird.

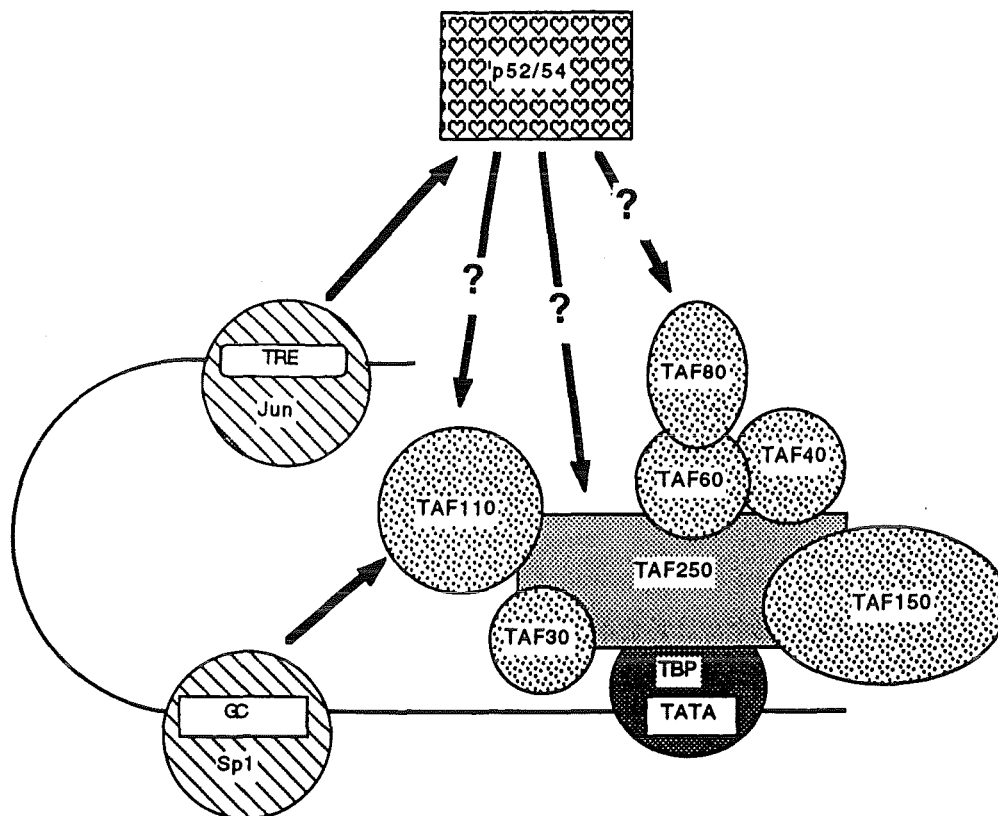


Abb. 23: Schematische Darstellung der Transaktivierung durch Jun und Sp1. TRE, TPA response element; GC, DNA-Bindungsstelle für Sp1; TAF, "TATA-associated factor". Die Zahlen geben das Molekulargewicht der TAFs in kd an. Interaktionen zwischen den einzelnen Faktoren sind mit Pfeilen versehen. Bisher nicht geklärte Interaktionen sind zusätzlich mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Die Umsetzung der Jun-TAD Aktivierung durch Phosphorylierung in eine erhöhte Genexpression

Externe Stimuli wie UV, TPA (Radler-Pohl et al., 1993), Wachstumsfaktoren und Cytokine (Sachsenmaier, persönliche Mitteilung; Krämer, 1991) führen zur Phosphorylierung von Serin 63/73 innerhalb der Jun-TAD und damit zu einer gesteigerten Aktivität des Jun-Proteins. Dies hat eine stärkere Induktion Jun-abhängiger Zielgene zur Folge. Die Aktivierung von Jun ist mehrstufiger Prozeß, in den membranständige Rezeptoren (Christoph Sachsenmaier, persönliche Mitteilung), Src, Ras, Raf, MAP-Kinase-Kinase und die MAP-Kinase involviert sind (Radler-Pohl et al., 1993; Marshall, 1993). Die an der Aktivierung der Jun-TAD beteiligten Faktoren sind in Abb. 24 schematisch dargestellt.

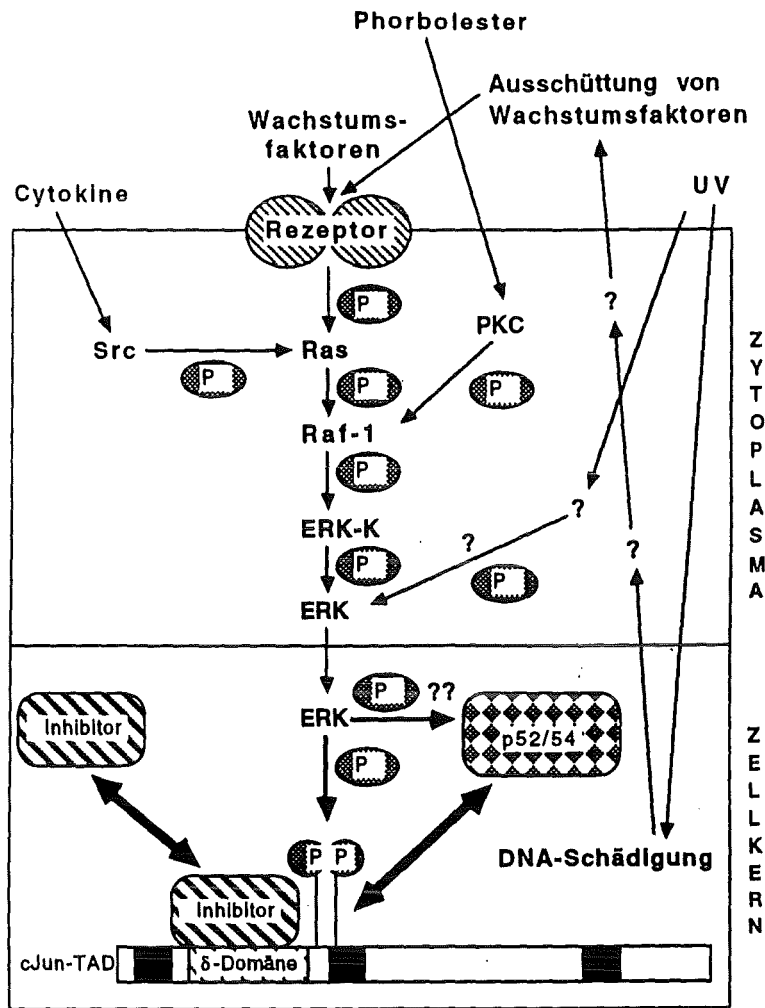


Abb. 24: Schematische Darstellung der Phosphorylierungskaskade und der möglichen beteiligten Faktoren, die zur Aktivierung Jun-abhängiger Transaktivierung führen. P, Phosphat; PKC, Proteinkinase C; Schwarze Regionen, transaktivierende Bereiche der cJun-TAD; weiße Regionen, restliche Aminosäurebereiche der cJun-TAD. Mögliche Interaktionen sind mit Pfeilen oder Doppelpfeilen gekennzeichnet. Bisher nicht eindeutig geklärte Vorgänge oder nicht identifizierte beteiligte Komponenten sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Wenn innerhalb des Jun-Proteins die Aminosäuren 63 und 73 mutiert sind, ist eine Aktivierung nicht mehr möglich (Smeal et al., 1991; Radler-Pohl et al., 1993). Eine Mutante, in der Serin 63 und 73 mutiert sind, besitzt jedoch eine 50%ige Transaktivierungsfähigkeit Jun-abhängiger Promotoren verglichen mit dem Wildtyp. Außerdem wird auch Jun-abhängige Transaktivierung durch die gleichzeitige Expression der Jun-TAD mit mutierten Phosphorylierungsstellen schwächer gehemmt. Dies könnte

bedeuten, daß auch im nicht-induzierten Zustand eine teilweise Phosphorylierung der Jun-TAD auftritt, da sonst zu erwarten gewesen wäre, daß Mutante und Wildtyp im nicht induzierten Zustand zu gleichen Teilen transaktivieren (Abb. 16c). Es konnte gezeigt werden, daß die exogen in F9-Zellen exprimierte Jun-TAD einen sehr hohen Grad an spontaner Phosphorylierung in Serin 63/73 besitzt (Sachsenmaier, unveröffentlicht). Dies kann die höhere Transaktivierungsrate des Wildtyps im Gegensatz zur Serin-Doppelmutante erklären.

Die Frage ist nun, wie die Phosphorylierung von Serin 63/73 in eine erhöhte Transaktivierung umgesetzt wird? Im *in vivo* Wettbewerbssystem ist eine Jun-TAD Mutante, in der die Phosphorylierungsstellen mutiert sind, in seiner Aktivität um 50% gehemmt. Dies könnte bedeuten, daß durch die fehlenden Phosphorylierungsstellen die Interaktion mit p52/54 gehemmt ist und dadurch die Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie geschwächt wird. Im Falle einer nicht mutierten Jun-TAD könnte dies bedeuten, daß nach Phosphorylierung der Jun-TAD der N-Terminus seine sterische Konfiguration ändert und dadurch eine stärkere Interaktion zu p52/54 erlaubt. Dies könnte eine Stabilisierung des Transkriptionskomplexes zur Folge haben und dadurch eine stärkere Transaktivierung erlauben. Zum anderen wäre es möglich, daß durch die Konfigurationsänderung nach Phosphorylierung der postulierte Inhibitor, der an die δ -Domäne bindet (Baichwal et al., 1990), freigesetzt wird. Dies würde die Region für p52/54 zugänglich machen.

Andererseits könnte p52/54 ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert und seine Affinität zur Jun-TAD dadurch erhöht werden. Dies könnte zu einer Konkurrenz mit dem an der δ -Domäne bindenden Inhibitor führen und zu einer erhöhten Bindung von p52/54. Ein Hinweis, daß p52/54 ein Phosphoprotein sein könnte, ist die Tatsache, daß mit der Jun-TAD drei Proteinbanden kopräzipitiert werden, die ein sehr ähnliches Molekulargewicht besitzen (52, 53 und 54kd; siehe Abb. 17a). Dabei könnte es sich entweder um drei unterschiedliche Proteine handeln, jedoch wahrscheinlicher um modifizierte Formen eines Proteins. Solch geringe Größenunterschiede resultieren meistens aus Modifikationen. Phosphorylierungen führen nur zu sehr geringen Divergenzen im Laufverhalten von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen, wohingegen Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen oder Ubiquitinierungen zu größeren Unterschieden führen. Da die p52/54 Proteine im Polyacrylamid-Gel nur etwa 1kd voneinander entfernt laufen, wäre es möglich, daß diese Proteine phosphorylierte Formen eines Proteins sind.

Möglichkeiten zur Klonierung von p52/54

Um ein Protein hinsichtlich seiner strukturellen und biochemischen Eigenschaften näher charakterisieren zu können, muß das dafür kodierende Gen identifiziert werden. Eine Methode, um Gene zu klonieren, deren Produkte an der durch Transkriptionsfaktoren aktivierten Transkription eine Rolle spielen, ist deren quantitative Reinigung. Um beteiligte Faktoren zunächst zu charakterisieren, werden Proteinextrakte aus Zellkernen für eine bestimmte Aktivität depletiert. Dies wurde bereits für aktivierende Faktoren des Transkriptionsfaktors Sp1 erfolgreich durchgeführt (Tanese et al., 1991). Dabei wurden Kernextrakte über eine TBP (TATA-binding protein)-Antikörpersäule gegeben. Dadurch wird nicht nur TBP aus den Extrakten entfernt, sondern auch alle Proteine, die durch Protein-Protein Interaktion an TBP binden (TBP-assoziierte Faktoren, TAFs; Dynlacht et al., 1991). Die auf diese Weise verarmten Kernextrakte konnten weder basale noch Sp1-abhängige Transkription in einem *in vitro* Transkriptionssystem stimulieren (Tanese et al., 1991). In einem *in vitro* rekonstituierten Transkriptionssystem, welches alle basalen Transkriptionsfaktoren, inklusive TBP, enthält, konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von TAF110 für Sp1-abhängige Transkription eine essentielle Rolle spielt (Hoey et al., 1993). Dieses Protein wurde quantitativ gereinigt, um einerseits Antikörper zu gewinnen und andererseits um das Protein teilweise zu sequenzieren. Die Antikörper wurden nachfolgend dazu benutzt, um in einer Expressionsbibliothek nach dem entsprechenden Gen zu suchen, welches für das gegen den Antikörper gerichtete Protein kodiert. Mit der vom sequenzierten Protein abgeleiteten Nukleotidsequenz wurden cDNA-Banken abgesucht, um damit das komplette Gen zu isolieren. Auf diese Weise wurde das Gen, welches für TAF110 kodiert, kloniert (Hoey et al., 1993).

Die Ausgangsmenge an Drosophila-Embryonen, um eine für die Klonierung von TAF110 ausreichende Menge an Kernextrakt zu gewinnen, betrug 1kg. Da p52/54 in F9-Zellen identifiziert wurde, würde zunächst versucht werden, das Protein aus diesen Zellen quantitativ zu reinigen. Um eine für die Sequenzierung ausreichende Menge an p52/54 zu präparieren, würden etwa 40000 große Kulturschalen (ø15cm) F9-Zellen benötigt. Dafür müßte eine Zelllinie hergestellt werden, die stabil mit vJun/GHFI transfiziert ist, um p52/54 aus jeder Zelle zu präzipitieren. Die Herstellung einer solchen Zelllinie wurde versucht, führte aber, wenn vJun/GHFI konstitutiv exprimiert wurde, zur Differenzierung der F9-Zellen (Daten nicht gezeigt), wodurch die Zellen nach einiger Zeit das Wachstum einstellen. Um dies zu vermeiden, wurde vJun/GHFI hinter den induzierbaren Methallothionein-Promotor kloniert (MT vJun/GHFI) und erneut stabile Zelllinien hergestellt. MT vJun/GHFI war zwar stabil integriert, wie auf DNA-Ebene demonstriert werden konnte (Southern-Blot), wurde jedoch nicht exprimiert (Daten nicht

gezeigt). Diese Schwierigkeiten und der immense Materialaufwand machen eine Klonierung von p52/54 auf diese Weise beinahe undurchführbar.

Die Identifizierung des Gens, welches für p52/54 kodiert, mittels direkter Protein-Protein durch Hybridisierung einer Expressions-cDNA-Bibliothek mit einem bakteriell exprimierten Protein, welches die Jun-TAD enthält, war nicht möglich, obwohl die Methode prinzipiell funktioniert (siehe Seite 81-87). Die Gründe hierfür liegen sehr wahrscheinlich in der Tertiärstruktur des 3X-Fusionsproteins. Eventuell kann sich die Jun-TAD im 3X-Fusionsprotein nicht korrekt falten. Andererseits ist es möglich, daß für die Assoziation zwischen p52/54 und der Jun-TAD eine Phosphorylierung von p52/54 nötig ist. Da in einer Expressionsbank die von einer cDNA kodierten Proteine bakteriell exprimiert werden, findet diese Modifikation nicht statt, da exogen in Bakterien exprimierte Proteine nicht phosphoryliert werden.

Vor kurzem konnte mit Hilfe eines Hefesystems ein Gen kloniert werden, dessen Genprodukt VP16-abhängige Transaktivierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verstärken kann (Berger et al., 1992). Dieses Gen wird als ADA2 (alteration/deficiency in activation) bezeichnet. Da VP16 und Jun sowohl in Hefe als auch in höheren Zellen starke Transaktivatoren sind und VP16 und Jun in höheren Zellen um die Bindung an p52/54 kompetieren, könnte ADA2 das homologe Protein in Hefe zu p52/54 darstellen. Um zu überprüfen, ob ADA2 in höheren Zellen eine ähnliche Funktion ausübt wie in Hefe, wurde ein Expressionsvektor für ADA2 (RSV-ADA2) zusammen mit einem Expressionsvektor für Jun und einem Jun-abhängigen Reporterplasmid (-73/+63 CollCAT; Angel, 1987) in F9-Zellen transfiziert. Dies führte zu einer Steigerung Jun-abhängiger Transaktivierung (2-3 fach), jedoch wurde auch die basale Transaktivierung, hervorgerufen durch das Reporterplasmid alleine, um den gleichen Faktor transaktiviert (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß ADA2 in höheren Zellen transaktivierende Eigenschaften besitzt, diese jedoch nicht spezifisch für Jun sind. Außerdem wurde versucht, mit einer ADA2-Probe ein homologes Gen in einer menschlichen cDNA-Bibliothek zu finden. Auch bei niedrigsten Stringenzbedingungen war ein homologes Gen nicht zu identifizieren. Die erhaltenen Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, daß ADA2 funktionell homolog zu p52/54 ist. Eventuell besitzt ADA2 modifizierende Eigenschaften, die VP16-spezifisch sind und dadurch zu einer Aktivierung von VP16 führen. Eine direkte Interaktion zwischen ADA2 und VP16 konnte mittlerweile demonstriert werden (Leonard Guarente, persönliche Mitteilung).

Eine elegante Methode bietet die Klonierung assoziierter Proteine im Hefesystem. Dies hat jedoch zur Voraussetzung, daß ein Hefesystem bereits vorhanden ist, da eine Etablierung dieses Systems einen immensen Zeitaufwand bedeutet. Die verwendete Methode wird als "two hybrid system" bezeichnet (Chien et al., 1991). Sie basiert auf

dem Prinzip, daß der Hefetranskriptionsfaktor GAL4 (Keegan et al., 1986), funktionell in eine DNA-Bindungsfunktion und eine Transaktivierungsfunktion separiert werden kann (Triezenberg et al., 1988). Ein Schema des "two hybrid systems" ist in Abb. 25 gezeigt. Die beiden verwendeten Hybride im "two hybrid system" bestehen zum einen aus der GAL4 DNA-Bindungsdomäne fusioniert an ein Protein "X" und der GAL4-TAD fusioniert an ein Protein "Y". Dabei ist "X" das Protein, zu dem assoziierte Proteine gefunden werden sollen und "Y" jedes Protein, welches von einer cDNA kodiert wird. Durch Interaktion zwischen "X" und "Y" wird die Expression der β -Galaktosidase induziert, die X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzt. Dadurch können Proteine gefunden werden, die mit "X" interagieren. Aus den β -Galaktosidase-aktiven Hefestämmen kann anschließend die entsprechende cDNA isoliert und näher charakterisiert werden.

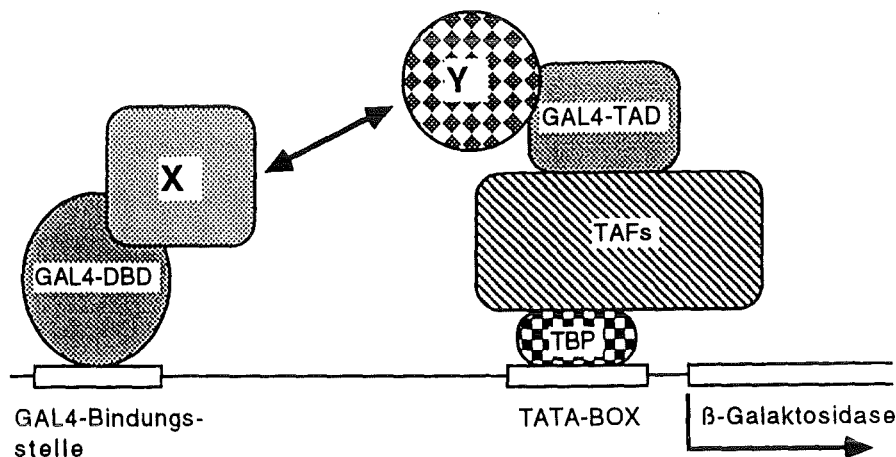


Abb. 25: Schematische Darstellung des "two hybrid system". X, Protein, für das ein interagierendes Protein gesucht wird; Y, Proteine, die den Expressionsprodukten einer cDNA entspricht; GAL4-DBD, GAL4 DNA-Bindungsdomäne; GAL4-TAD, GAL4 Transaktivierungsdomäne; TAFs, "TATA associated factors"; TBP, "TATA-binding protein";

Da die Jun-TAD selbst transaktivierende Eigenschaften besitzt, kann ein GAL4-Jun Hybrid (würde GAL4-"X" entsprechen; Abb. 25) nicht verwendet werden, da dieses Hybrid selbst die β -Galaktosidase-Expression induzieren würde. Um das System trotzdem verwenden zu können, gäbe es die Möglichkeit, die von der cDNA kodierten Proteine als GAL-"X" Hybride zu exprimieren und die Jun-TAD als "Y"-GAL4 Hybrid. Da "X" auch für Proteine kodieren kann, die selbst transaktivierende Eigenschaften besitzen, muß Jun-GAL4 (entspricht "Y"-GAL4) durch einen induzierbaren Promotor

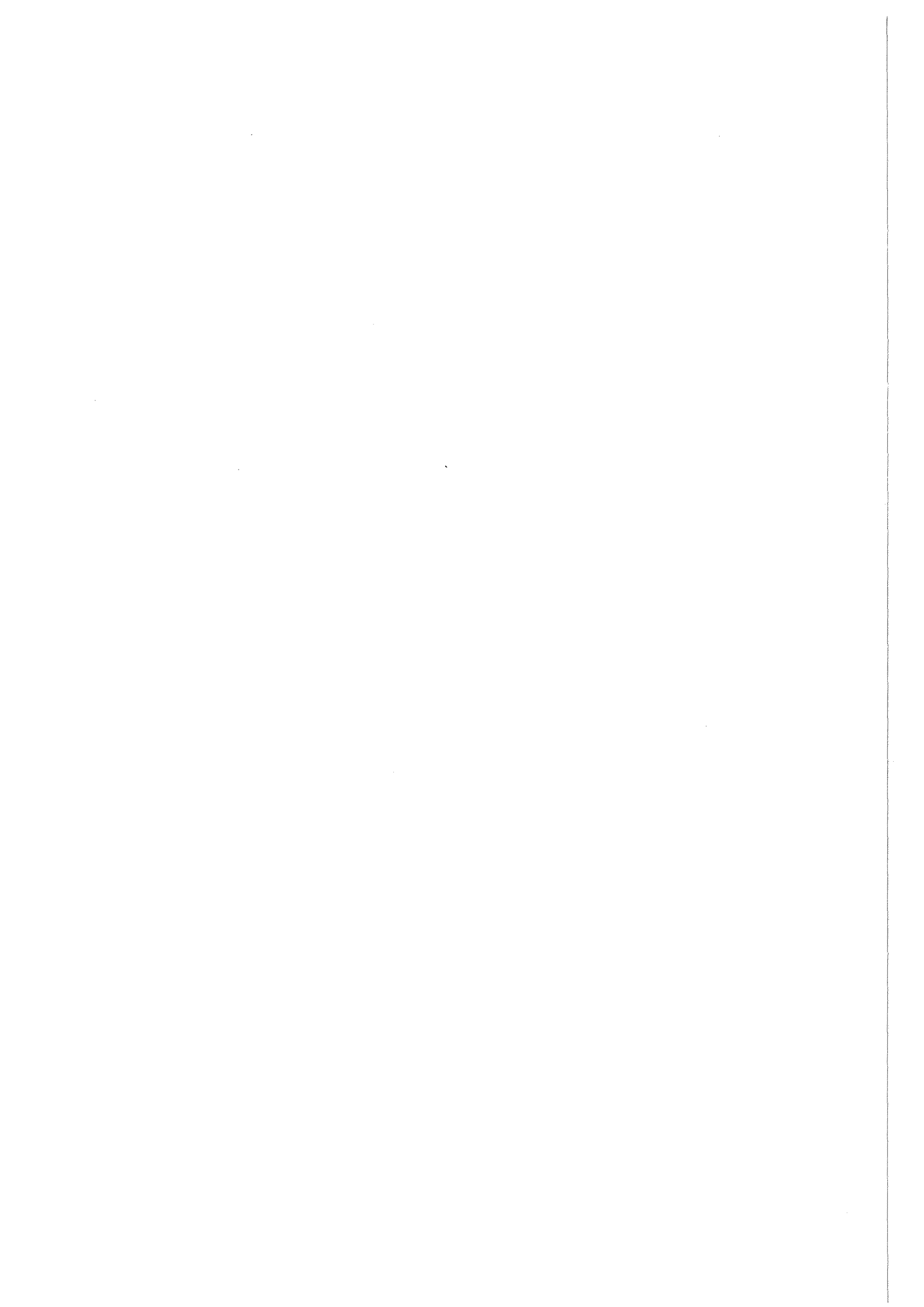
(zum Beispiel durch einen Galaktose-induzierbaren Promotor) exprimiert werden. Nach der Plattierung der Hefen in Replikas zum einen auf galaktosehaltigem Medium zum anderen auf galaktosefreiem Medium, können Hefestämme identifiziert werden, die durch die Interaktion zwischen "X" und "Y" β -Galaktosidase exprimieren. Um weiterhin zu differenzieren, ob die GAL4-TAD oder die Jun-TAD für die Interaktion mit "X" verantwortlich ist (beide TADs haben transaktivierende Eigenschaften), können Hybride verwendet werden, die jeweils zwei TADs von GAL4 oder von Jun besitzen. Nur diejenigen Hefestämme, die eine Transaktivierung der β -Galaktosidase durch die Jun-TADs zeigen, sind spezifisch für Jun-abhängige Transaktivierung. Mit dieser Methode könnte nicht nur das Gen, welches für p52/54 kodiert, kloniert werden, sondern jedes Gen, dessen Produkt mit der TAD von Jun assoziiert ist. Mit der Nutzung des Hefesystem wäre es möglich, innerhalb kurzer Zeit Licht in die komplexen Wege Jun-abhängiger Transaktivierung und deren Regulation zu bringen.

Ist p52/54 an der Tumorentstehung beteiligt?

Transkriptionsfaktoren spielen bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle. vJun ist nach Überexpression in Hühnerfibroblasten tumorigen. Überexpression von cJun führt hingegen nur zu einem verstärkten Wachstum der Zellen (Morgan et al., 1993), könnte jedoch das erste Ereignis in der Entstehung eines malignen Tumors darstellen. Eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung könnte auch p52/54 spielen. Da die Transaktivierungsmechanismen verschiedener Transkriptionsfaktoren ähnlich sind, wie in *in vivo* Kompetitionsexperimenten demonstriert werden konnte, würde die Überexpression von Koaktivatoren nicht nur die Aktivierung der Zielgene eines spezifischen Transkriptionsfaktors beeinflussen, sondern die Zielgene aller Transkriptionsfaktoren, die über denselben Mechanismus induziert werden. Dies könnte unabhängig vom Aktivitätsstatus der einzelnen Transkriptionsfaktoren sein, da die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors genauso über Modifikationen von p52/54 reguliert werden könnte. Andererseits könnte auch die Zellspezifität eines in der Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktors über Expression oder Modifikation des dazugehörigen Koaktivators reguliert werden. Bereits in der Zelle vorhandene Transkriptionsfaktoren wären bei fehlender Expression oder nicht entsprechender Modifikation von p52/54 inaktiv. Auch die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren kann zu einer malignen Entartung einer Zelle führen, wenn bestimmte Gene, die für negative regulatorische Funktionen verantwortlich sind, nicht aktiviert werden können. Eine Gewebe-unspezifische Expression von p52/54 würde in der Aktivierung bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren in der Zelle resultieren. Dies würde eine

unphysiologische Aktivierung von Genen zur Folge haben, was ebenfalls zur Zelltransformation führen könnte.

Koaktivatoren stellen eine neue Ebene der Genregulation dar. Sie sind das Bindeglied zwischen Aktivierung von Zielgenen durch Transkriptionsfaktoren und deren letztendliche Transkription durch Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie. Da die Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie für eine Zelle essentiell und für die Aktivierung jedes Zielgenes notwendig, ist eine Regulation auf dieser Ebene nicht möglich. Dies würde lediglich zu einer allgemeinen Veränderung der Aktivität einer ganzen Zelle führen und keinerlei Spezifität vermitteln. Koaktivatoren hingegen erfüllen ein entscheidendes Kriterium einer möglichen regulatorischen Ebene: die Spezifität für bestimmte Transkriptionsfaktoren. Es wäre nicht überraschend, wenn Koaktivatoren mit derselben Vielzahl von Regulationsmechanismen in ihrer Aktivität moduliert werden könnten wie Transkriptionsfaktoren, denn sie stellen die letzte regulatorische Instanz der Genexpression dar.



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 c-Jun amino-terminal protein kinase requires serin/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* **24**: 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., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**: 875-885.
- Angel, P., Smeal, T., Meek, J. und Karin, M. (1989). Jun and v-Jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol.* **1**: 35-43.
- Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988). I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* **242**: 540-546.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1991). Molecular aspects of cellular regulation, hormonal control of gene transcription. P. Cohen and J.G. Foulkes, ED. (Elsevier/North Holland: Biomedical press) 409-432.
- Baichwal, V. R. und Tjian, R. (1990). Control of cJun activity by interaction of a cell-specific inhibitor with regulatory domain δ : differences between v- and c-Jun. *Cell* **63**: 815-825.
- Baichwal, V. R., Park, A. und Tjian, R. (1991). v-Src and EJ Ras alleviate repression of c-Jun by a cell-specific inhibitor. *Nature* **352**: 165-168.

- Baichwal, V. R., Park, A. und Tjian, R. (1992). The cell-type-specific activator region of c-Jun juxtaposes constitutive and negatively regulated domains. *Genes Dev.* **6**: 1493-1502.
- 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., Tapscott, S. J., Weintraub, H. und Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: A direct physical interaction. *Cell* **68**: 507-519.
- Berger, S. L., Cress, W. D., Cress, A., Triezenberg, S. J. und Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* **61**: 1199-1208.
- Berger, S. L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G. A., Agapite, J., Regier, J. L., Triezenberg, S. J. und Guarente, L. (1992). Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* **70**: 251-265.
- Binétry, B., Smeal, T. und Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**: 122-127.
- Bodner, M., Castrillo, J.-L., Theill L. E., Deerinck, T., Ellisman, M. und Karin, M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55**: 505-518.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. und Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-Jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**: 1386-1392.
- Bohmann, D. und Tjian, R. (1989). Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: differential activity of c- and v-Jun. *Cell* **59**: 709-717.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H. K., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M. und Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* **64**: 573-584.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. und Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**: 549-561.
- Burk, O. und Klempnauer, K. H. (1991). Estrogen-dependent alterations in differentiation state of myeloid cells caused by v-myb/estrogen receptor fusion protein. *EMBO J.* **10**: 3713-3719.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988). Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal

- transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**: 301-311.
- Campbell, M. E. M., Palfreyman, J. W. und Preston, C. M. (1984). Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for the stimulation of immediate early genes. *J. Mol. Biol.* **180**: 1-19.
- Cavalieri, 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.
- Chasman, D. I., Leatherwood, J., Carey, M., Ptashne, M. und Kornberg, R. D. (1989). Activation of yeast RNA polymerase II transcription by herpes virus VP16 and GAL4 derivatives in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4746-4749.
- Chien, C., Bartel, P. L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9578-9582.
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. und Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**: 541-552.
- 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.
- Cohen, D. R., Ferreira, P. C. P., Gentz, R., Franza Jr., B. R. und Curran, T. (1989). The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.* **3**: 173-184.
- Cohen, D. R. und Curran, T. (1990). Analysis of dimerization and DNA binding functions in Fos and Jun by domain-swapping: involvement of residues outside the leucine zipper/basic region. *Oncogene* **5**: 929-939.
- Courey, A. J. und Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**: 887-898.
- Dalrymple, M. A., McGeoch, D. J., Davison, A. J. und Preston, C. M. (1985). DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early transcription. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2347-2365.
- 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.

- Deng, T. und Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive dimers. *Genes Dev.* **7**: 479-490.
- 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.
- Distel, R. J., Ro, H.-S., Rosen, B. S., Groves, D. L. und Spiegelman, B. M. (1987). Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell* **49**: 835-844.
- Dynlacht, B. D., Hoey, T. und Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**: 563-576.
- 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.* **89**: 7247-7251.
- Franza, B. R., Rauscher, F. J., Josephs, S. F. und Curran, T. (1988). The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* **239**: 1150-1153.
- Gebel, S. (1992). Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren cFos und c-Jun: Ein Schlüssel zum Verständnis der schnellen Induktion von Genen. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Gentz, R., Rauscher III, F. J., Abate, C. und Curran, T. (1989). Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* **243**: 1695-1699.
- Gill, G. und Ptashne, M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* **334**: 721-724.
- Gonzalez, G. A. und Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serin 133. *Cell* **59**: 675-680.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. und Howard, B. H. (1982a). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 6777-6781.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982b). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.

- 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.
- Green, S. und Chambon, P. (1986). A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* **324**: 315-317.
- 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., Liu, F., Coukos, W. J. und Green, M. R. (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* **3**: 2083-2090.
- Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. und Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* **55**: 917-924.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of E.coli. DNA cloning (D.M. Glover, Ed.) *IRL Press, Oxford* **1**: 109-135.
- Hipskind, R.A., Rao, V. N., Mueller, C. G. F., Reddy, E. S. P. und Nordheim, A. (1991). Ets-related protein ELK-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62^{TCF}. *Nature* **354**: 531-534
- Hirai, S.-I., Ryseck, R.-P., Mechta, F., Bravo, R. und Yaniv, M. (1989). Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* **8**: 1433-1439.
- Hoey, T., Weinzierl, R. O. J., Gill, G., Chen, J.-L., Dynlacht, B. D. und Tjian, R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* **72**: 247-260.
- Hoffmann, A., Sinn, E., Wang, Y. T. J., Roy, A., Horikoshi, M. und Roeder, R. G. (1990). Highly conserved core domain and unique N-terminal region with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID). *Nature* **346**: 387-390.
- Hurst, H. C. und Jones, C. J. (1987). Identification of factors that interact with the E1A-inducible adenovirus E3 promoter. *Genes Dev.* **1**: 1132-1146.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**: 1189-1204.

- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J. und Tjian, R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48**: 79-89.
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. und Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA corresponding to transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **61**: 1209-1215.
- Kakidani, H. und Ptashne, M. (1988). GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* **52**: 161-167.
- Keegan, L., Gill, G. und Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704.
- Klein-Hitpaß, L., Schorpp, M., Wagner, U. und Ryffel, G. U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* **46**: 1053-1061.
- Klempnauer, K. H., Gonda, T. J. und Bishop, J. M. (1983). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**: 453-463.
- König, H. (1991). Cell-type specific multiprotein complex formation over the *c-fos* serum response element *in vivo*: ternary complex formation is not required for the induction of *c-fos*. *Nucl. Acid. Res.* **19**: 3607-3611.
- Kouzarides, J. T. und Ziff, E. (1988). Role of the leucine zipper in the *fos-jun* interaction. *Nature* **336**: 646-651.
- Krämer, M. (1991). Das Cytokin Inetrleukin- α und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor: Zwei neue Komponenten der UV-induzierten Signalkette in Säugerzellen. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Kryszke, M.-H., Piette, J. und Yaniv, M. (1987). Induction of a factor that binds to the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* **328**: 254-256.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.
- Lin, Y.-S., Maldonado, E., Reinberg, D. und Green, M. R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* **353**: 569-571.

- Lin, Y.-S. und Green, M. R. (1991). Mechanism of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell* **64**: 971-981.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. und Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **70**: 777-789.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**: 113-119.
- Macgregor, P. F., Abate, C. und Curran, T. (1990). Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1. *Oncogene* **5**: 451-458.
- 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.* **84**: 2848-2852.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marshall, M. S. (1993). The effector interactions of p21^{ras}. *TIBS* **18**: 250-254.
- Matsui, M., Tokuhara, M., Konuma, Y., Nomura, N. und Ishizaki, R. (1990). Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* **5**: 249-255.
- McKnight, S. L., Gavis, E. R. und Kingsbury, R. (1981). Analysis of transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: identification of an upstream control region. *Cell* **25**: 385-398.
- McKnight, S. L., Kingsbury, R. C., Spence, A. und Smith, M. (1984). The distal transcription signals of the Herpesvirus tk gene share a common hexanucleotide control sequence. *Cell* **37**: 253-262.
- Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J. und Tijan, R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* **58**: 741-753.
- Mitchell, P. J. und Tijan, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. und Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 6682-6686.
- Morgan, I. M., Asano, M., Havarstein, L. S., Ishikawa, H., Hiiragi, T., Ito, Y. und Vogt, P. K. (1993). Amino acid substitutions modulate the effect of Jun on transformation, transcriptional activation and DNA replication. *Oncogene* **8**: 1135-1140

- Murakami, Y., Asano, M., Satake, M. und Y, I. (1990). A tumor promoting phorbol ester, TPA, enhances polyomavirus DNA replication by activating the function of the viral enhancer. *Oncogene* **5**: 5-13.
- Nakabeppu, Y. , K. und Nathans, D. (1988). DNA-binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell* **55**: 907-915.
- Nakabeppu, Y. und Nathans, D. (1989). The basic region of Fos mediates specific DNA binding. *EMBO J.* **8**: 3833-3841.
- NIGMS (1992/93). Catalogue of cell lines.
- Nishimura, T. und Vogt, P. K. (1988). The avian cellular homolog of the oncogene Jun. *Oncogene* **3**: 659-663.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. und Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**: 989-1003.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R. und Kim, P. S. (1989a). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**: 538-542.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford III, W. F. und Kim, P. S. (1989b). Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* **245**: 646-648.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R. und Kim, P. S. (1992). Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* **68**: 699-708.
- Peterson, M. G., Tanese, N., Pugh, B. F. und Tjian, R. (1990). Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding proteins. *Science* **248**: 1625-1630.
- Picard, D. und Schaffner, W. (1984). A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin kappa gene. *Nature* **307**: 80-82.
- Pierce (1992). ImmunoTechnology handbook. D-33.
- Ptashne, M. (1986). A genetic switch: Gene control and phage λ . MA: Blackwell Scientific Publications and Cell Press, San Francisco and Cambridge
- Pugh, B. F. und Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* **61**: 1187-1197.
- Pugh, B. F. und Tjian, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* **5**: 1935-1945.
- 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.
- Ransone, L. J., Visvader, J., Sassone-Corsi, P. und Verma, I. M. (1989). Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. *Genes Dev.* **3**: 770-781.
- Rauscher III, F. J., Cohen, D. R., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. und Franza Jr., B. R. (1988a). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**: 1010-1016.
- Rauscher III, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. und Spiegelman, B. M. (1988b). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* **52**: 471-480.
- Risse, G., Jooss, K., Neuberg, M., Brüller, H.-J. und Müller, R. (1989). Asymmetrical recognition of the palindromic AP-1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. *EMBO J.* **8**: 3825-3832.
- Ruppert, S., Wang, E. H. und Tjian, R. (1993). Cloning and expression of human TAF_{II}250: A TBP-associated factor implicated in cell-cycle regulation. *Nature* **362**: 175-179.
- Ryder, K., Lau, L. F. und Nathans, D. (1988). A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 1487-1491.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E. und Nathans, D. (1989). JunD: A third member of the Jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1500-1503.
- 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.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. und Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**: 563-564.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W. W., Kamps, M. und Verma, I. M. (1988). Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* **54**: 553-560.
- Sawadogo, M. und Sentenac, A. (1990). RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 711-754.
- Schmitz, H. L. und Baeuerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NFκB. *EMBO J.* **10**: 3805-3817.

- Schreck, R., Rieber, P. und Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**: 2247-2258.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N. Verma, I. M. und Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**: 1217-1226.
- Schürmann, M., Hunter, J. B., Hennig, G. und Müller, R. (1991). Non-leucine residues in the leucine repeats of Fos and Jun contribute to the stability and determine the specificity of dimerization. *Nucl. Acids. Res.* **19**: 739-746.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-928.
- Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *TIG* **1**: 224-230.
- Smeal, T., Angel, P., Meek, J. und Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun : Jun and Jun : Fos complexes. *Genes Dev.* **3**: 2091-2100.
- Smeal, T., Binétruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. und Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**: 494-496.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stringer, K. F., Ingles, C. J. und Greenblatt, J. (1990). Direct and selective binding of an acidic transcriptional domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* **345**: 783-786.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubenoff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 60-89.
- Tanese, N., Pugh, B. F. und Tjian, R. (1991). Coactivators for a proline activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes Dev.* **5**: 2212-2224.
- Tasset, D., Tora, L., Fromental, C., Scheer, E. und Chambon, P. (1990). Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* **62**: 1177-1187.

- Theill, L. E., Castrillo, J.-L., Wu, D. und Karin, M. (1989). Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. *Nature* **342**: 945-948.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. und Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* **59**: 477-487.
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. und McKnight, S. L. (1988). Functional dissection of VP16, the transactivator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* **2**: 718-729.
- Turner, R. und Tjian, R. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**: 1689-1694.
- van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. und Verma, I. M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell* **32**: 1241-1255.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. und van der Eb, A. J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-Jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* **12**: 479-487.
- Vinson, C. R., LaMarco, K. L., Johnson, P. F., Landschulz, W. H. und McKnight, S. L. (1988). In situ detection of sequence-specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes Dev.* **2**: 801-806.
- Vogt, P. K., Bos, T. J. und Doolittle, R. F. (1987). Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 3316-3319.
- Vogt, P. K. und Bos, T. J. (1990). Jun: Oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* **55**: 1-35.
- Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M. und Chambon, P. (1988). The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**: 169-178.
- Weinzierl, R. O. J., Dynlacht, B. D. und Tjian, R. (1993). Largest subunit of Drosophila transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator. *Nature* **362**: 511-517.
- Weston, K. und Bishop, J. M. (1989). Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell* **58**: 85-93.

- Xanthoudakis, S. und Curran, T. (1992). Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* **11**: 653-665.
- Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. und Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**: 1205-1215.
- Zawel, L. and Reinberg, D. (1992). Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 488-495.
- Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R.-P., Schuermann, M., Müller, R. und Bravo, R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* **8**: 805-813.