

KfK 5123 B
Dezember 1992

**Repression der
Promotoraktivität des
Protoonkogens c-jun durch die
Transkriptionsfaktoren
Fos und Jun**

K.-K. Park
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5123 B

**Repression der Promotoraktivität des
Protoonkogens c-jun
durch die Transkriptionsfaktoren
Fos und Jun**

Kun-Koo Park

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Das c-jun Proto-Onkogen kodiert für ein Protein, das eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP1 ist. AP1 spielt für die Regulation von Proliferation bzw. Differenzierung und in der "SOS"-Antwort eine zentrale Rolle. Die Promotor-Aktivität des c-jun Gens wird durch eine Reihe von Agenzien, wie Serum oder UV-Strahlung, angeschaltet und kurz danach wieder abgeschaltet. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Abschaltung der Transkription des c-jun Gens untersucht.

Sowohl die basale als auch die durch Serum bzw. UV-Strahlung induzierte Aktivität des c-jun Promotors werden durch Fos (der zweiten Untereinheit des AP1-Komplexes) bzw. Jun reprimiert. In Übereinstimmung mit diesem Resultat führt die Reduktion der Jun- oder Fos-Synthese durch "anti sense" Sequenzen zu einer Induktion des c-jun Promotors. Für die Repression ist daher Neusynthese von Jun bzw. Fos erforderlich.

Kotransfektionsanalysen von c-jun Promotor-Mutanten und Fos/Jun-Expressionsvektoren zeigten, daß für die Repression des cjun-Promotors das URE2 (-191 ATTACCTCATCC -180; Start der Transkription = +1) verantwortlich ist. Das URE2 vermittelt zusammen mit dem URE1 sowohl die UV- als auch die Seruminduktion. Für die Repression durch Fos/Jun ist es alleine ausreichend.

Experimente zur Identifizierung der an der Repression des c-jun Promotors beteiligten Proteinabschnitte (Domänen) von Fos bzw. Jun ergaben folgende Ergebnisse: Von beiden Proteinen wird jeweils nur die Leuzin-Zipper Domäne für die Repression benötigt. Die DNA-Bindung durch die basische Domäne und die Transaktivierungsdomäne sind an der Repression nicht beteiligt. Für das Jun Protein wurde gezeigt, daß sowohl Bildung von Homodimeren als auch von Jun/Fos-Heterodimeren für die Repression nicht benötigt werden.

Als Mechanismus wird postuliert, daß ein am URE2 bindender Transkriptionsfaktor durch Interaktion mit dem Protein Fos oder Jun inaktiviert wird.

Abstract

Repression of promoter-activity of proto-oncogene c-jun by the transcription factors Fos and Jun

The c-jun proto-oncogene encodes a protein, which is one of the components of the transcription factor AP-1. AP-1 plays a very important role in regulation of proliferation, differentiation and in the "SOS"-response. The promoter-activity of c-jun gene is induced by a series of agents such as serum or UV-irradiation, and it is rapidly repressed thereafter. In this work, the mechanism underlying the transcriptional repression of the c-jun gene was investigated.

Serum or UV-irradiation induced activity of the c-jun gene was repressed by overexpression of Fos (the second component of the AP-1 complex) or by Jun. In agreement with this, the c-jun promoter was induced by blocking the synthesis of c-jun or c-fos with anti-sense mRNA sequences. Thus, for the repression, new protein synthesis of Jun or Fos is required.

Transfectional analyses of c-jun promoter mutants and Fos/Jun-expression vectors showed that the sequence (-191 ATTACCTCATCC -180; beginning of transcription = +1) URE2 is responsible for the repression. The URE2 together with URE1 (-72/-63) are involved in the induction of c-jun by UV-irradiation as well as by serum. In contrast, the URE2 alone is responsible for the Fos/Jun mediated repression.

Experiments to identify Jun/Fos-domains which are involved in the repression of the c-jun promoter yielded the following results. Only the leucine zipper domain of both proteins is involved in the repression of c-jun gene. The basic domain-mediated DNA binding and transactivation domains are not required for the repression. Jun/Jun homodimers and Jun/Fos heterodimers are also not involved in the repression. As a mechanism of repression it has been suggested that a transcription factor, which binds to the URE2, could be inactivated by interaction with Fos or Jun.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

Abstract

INHALTSVERZEICHNIS.....	i
-------------------------	---

Abkürzungen.....	v
------------------	---

EINLEITUNG.....	1
-----------------	---

MATERIAL.....	9
---------------	---

Chemikalien und Arbeitsmittel.....	9
Radiochemikalien.....	11
Bakterien und Zellen.....	11
Kulturmedien.....	11
UV-Bestrahlungsquelle.....	12
Plasmid-Konstruktionen.....	12

METHODEN.....	15
---------------	----

1. Behandlung von Nukleinsäuren.....	15
Spektrophotometrische Konzentrations-Bestimmung von Nukleinsäuren.....	15
Phenol/Chloroform-Extraktion.....	15
Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....	16
2. Plasmid-DNA-Präparation.....	16
Bakterien-Wachstum und Amplifikation.....	16
Präparation großer Mengen Plasmid-DNA.....	16
Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA.....	17
3. Klonierungstechniken.....	18
Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	18
Entfernung endständiger Phosphatgruppen.....	18
Auffüllen von 5'Überhängen.....	19
Ligation von DNA-Fragmenten.....	19

4. Markierung von DNA mit Radionukleotiden.....	20
"random priming" Markierung.....	20
Gelfiltration über Biogel P60.....	20
5. DNA-Gelelektrophorese.....	21
Agarose-Gelelektrophorese.....	21
Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele.....	21
6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	22
7. Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	23
8. Sequenzierung von DNA.....	23
9. Transformation von Bakterien.....	24
Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation.....	24
Transformation von kompetenten Bakterien.....	25
Herstellung von Selektiv-Agarplatten.....	25
10. Isolierung von polyA ⁺ -mRNA aus eukaryontischen Zellen.....	25
11. Northern-Blot und Hybridisierung.....	26
12. Zellen kultivieren, einfrieren und auftauen.....	27
13. Transfektion und Behandlung von Zellen mit Induktoren.....	28
Transiente Transfektion.....	28
Stabile Transfektion.....	28
14. Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen	29
15. Proteinbestimmung nach Lowry.....	29
16. CAT-Assay.....	29
17. "nuclear run-on" Transkriptions-Analyse.....	30
Präparation der Zellkerne.....	31
Präparation der ³² P-markierten Transkripte.....	31

Immobilisierung von DNA-Fragmenten an Nitrozellulose.....	3 2
Vorhybridisierung; Hybridisierung; Waschen.....	3 2
ERGEBNISSE.....	3 5
1. Transiente Expression des endogenen c-jun Gens.....	3 5
1.1. Die Abschaltung der Serum-vermittelten Expression des cjun Gens erfolgt durch Hemmung der Transkription.....	3 5
1.2. UV-Bestrahlung führt ebenfalls zur transienten mRNA Akkumulation des endogenen c-jun Gens.....	3 7
2. Fos reprimiert die Induktion des c-jun Gens.....	3 8
3. An- bzw. Abschaltung klonierter c-jun Promotor- Chimärengene.....	4 1
3.1. Induktion klonierter c-jun Promotor-Konstrukte.....	4 1
3.2. Die Transkription klonierter c-jun Promotor Konstrukte ist transient.....	4 3
4. Welche cis-Elemente im c-jun Promotor sind für die Repression verantwortlich?.....	4 5
4.1. Transrepression durch Überexpression des cFos Proteins.....	4 5
4.2. Autorepression durch Überexpression des cJun Proteins.....	4 8
5. fos oder jun "anti sense" Sequenzen erhöhen die junCAT-Aktivität.....	5 1
6. Identifizierung des NREs ("negative responsive element") im jun-Promotor.....	5 5
6.1. Das NRE ist zwischen Position -196 und -167 lokalisiert.....	5 5
6.2. Mutationen im URE2 verhindern die Fos-vermittelte Repression.....	5 6

6.2.1. Serum- bzw. UV-vermittelte Autorepression durch Jun erfolgt ebenfalls über das URE2.....	58
6.3. Ein isoliertes URE2 vermittelt Hemmung durch Fos bzw. Jun.....	60
7. Identifizierung der reprimierenden Domäne von Fos bzw. Jun.....	63
7.1. Die Leuzin-Zipper Domäne des Fos Proteins ist notwendig und ausreichend für die Repression des c-jun Promotors.....	65
7.2. Die Leuzin-Zipper Domäne des cJun Proteins ist ausreichend für die Autorepression des c-jun Promotors.....	67

DISKUSSION.....	73
------------------------	-----------

LITERATURVERZEICHNIS.....	81
----------------------------------	-----------

Dankadressen

LEBENS LAUF

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP1	Aktivierender Proteinkomplex 1
APS	Ammoniumpersulfat
b p	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenikol-Acetyltransferase
cFos	zelluläres Fos-Protein
c-fos	zelluläres fos-Gen
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)
cJun	zelluläres Jun-Protein
c-jun	zelluläres jun-Gen
cpm	counts per minute
CRE	auf cyclisches AMP reagierender Enhancer
CREB	CRE-bindendes Protein
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotid-triphosphate
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DEX	Dexamethason
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA(DNS)	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotidphosphate
DTT	Dithiothreitol
E260	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure Dinatrium salz
FBJ-MuSV	Finkel Biskis Jinkins-Murine Sarcoma Virus
FCS	Fätales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
G418	Geneticin-Sulfat
GRE	Glucocorticoid-Rezeptor Erkennungssequenz
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
k b	Kilobasen

LTR	Long Terminal Repeat
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
NP-40	Nonidat P-40
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
min	Minuten
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolyA ⁺ -RNA	Polyadenylierte RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	auf Serum Reagierendes Element
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloroessigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tk	Thymidinkinase
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRE	TPA-reguliertes Element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TTP	Thymidin-triphosphat
UV	Ultraviolette Strahlung
U/μl	Enzymeinheiten pro μl
URE1	UV-reguliertes DNA-Element 1 des c-jun Gens
URE2	UV-reguliertes DNA-Element 2 des c-jun Gens
vFos	virales Fos-Protein
vJun	virales Jun-Protein
v-fos	virales fos-Gen
v-jun	virales jun-Gen

EINLEITUNG

Mit der Entdeckung der **Onkogene** wurde ein ganz neues Gebiet der molekularen Krebsforschung eingeleitet, das wesentlich unser Verständnis von Mechanismen, die zur Transformation einer normalen Zelle führen, beeinflußt (Heldin und Westmark, 1984; Kingston et al., 1985; Ryder et al., 1988a). Ursprünglich wurden Onkogene als das transformierende Prinzip von Retroviren nachgewiesen (Bishop, 1991; Weiss et al., 1984). Es zeigte sich, daß die retroviralen Onkogene von zellulären "Proto-Onkogenen" abstammen. Diesen Proto-Onkogenen kommt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Zelldifferenzierung und Proliferation zu. Wenn diese Proto-Onkogene durch Mutationen (z. B. durch Punktmutation, chromosomale Translokation, Amplifikation, "Rearrangement" oder Insertion) zum falschen Zeitpunkt und/oder in veränderten Mengen synthetisiert werden, kommt es zur Fehlsteuerung von Differenzierung und/oder Proliferation und die Zellen werden transformiert.

Ein Hauptkennzeichen von transformierten Zellen sind Veränderungen in den Kontrollmechanismen, die die Teilung der normalen Zelle regulieren. Sie teilen sich rascher und zeigen meistens eine Hemmung von Differenzierungsprozessen. Auch Regulationsmechanismen, die zur Kontaktinhibition führen, sind in transformierten Zellen außer Kraft gesetzt. Darüber hinaus benötigen sie weniger Protein-Wachstumsfaktoren. Die Frage nach den Mechanismen, die zur Transformation, d. h. zur Entartung von Zellen führen, ist unmittelbar mit der Frage nach den Steuermechanismen, die die Proliferation tierischer Zellen regulieren, verknüpft. Es ist daher nicht verwunderlich, daß in den letzten Jahren wichtige Impulse für unser Verständnis der Wachstumskontrolle von der Tumorforschung eingebracht wurden.

Die von den verschiedenen **Proto-Onkogenen** kodierten Proteine sind in verschiedenen Zell-Kompartimenten lokalisiert: z.B. sis (extrazellulär), ras, src (an der Membrane), raf, mos (im Cytoplasma), jun, fos, myc (im Kern). Besonders aufschlußreich für ein funktionelles Verständnis der Wirkungsweise der Proteine der Proto-Onkogene sind die sich abzeichnenden Zusammenhänge zwischen Proto-Onkogenprodukten und Signalen des Zellwachstums (Cantley et al., 1991). Die zellulären Proto-Onkogene stellen ein Netzwerk von **Signalketten** dar, die für die Wachstumskontrolle eine zentrale Rolle spielen (Herrlich und Ponta, 1989; Hunter, 1991; Kingston, et al., 1985; Vogt und Bos, 1989).

Die Signalketten werden durch die Interaktion eines Wachstumsfaktors mit seinem Rezeptor ausgelöst (Rozengurt, 1986). Z. B. bindet der Wachstumsfaktor PDGF ("Platelet Derived Growth Factor") an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche. Durch diese Bindung wird die Kinase-Aktivität dieses Rezeptors reguliert (Ullrich und Schlessinger, 1990). Es kommt zur Synthese eines Diacylglycerols, zur Arachidonsäurefreisetzung und schließlich zur Aktivierung von Proteinkinase C (PKC). Das Signal von der PKC wird anschließend über das Zytoplasma weitergeleitet. Der Tumorpromotor TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) aktiviert direkt die PKC (Nishizuka, 1984; Blumberg, 1988). Die Informationen extrazellulär ankommender Stimuli werden schließlich bis in den Zellkern weitergeleitet. Bei solchen Signal-Übertragungen spielen Enzymaktivitäten eine zentrale Rolle. Als solche Enzymaktivitäten wurden z. B. GTPasen, Serin-Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen identifiziert. Eine Reihe von Proto-Onkogenen kodieren für Proteine mit solchen Enzymaktivitäten (zur Übersicht: Cantley et al., 1991). Die extranukleären Signale führen schließlich in entsprechende Aktivierung und Repression von Transkriptionsfaktoren im Zellkern und damit zu Veränderungen im Genexpressionsprogramm (Schönthal et al., 1988a; Herrlich und Ponta, 1989; Gutman und Wasylyk, 1991; Herschman, 1989). Interessanterweise sind manche der Proto-Onkogene selbst **Transkriptionsfaktoren** und eröffnen somit einen direkten

Zugang zu kritischen Regulationsvorgängen der für Zellproliferation wichtige Genen (Kingston et al., 1985; Lewin, 1991). Zwei solche Proto-Onkogene sind fos und jun.

Als Beispiel für ein solche Signalübertragung ist es gelungen, eine kausale Verbindung zwischen extranuklearen Signalen (ausgelöst durch Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren oder durch Überexpression von extranuklear lokalisierten Onkoproteinen) und dem Anschalten spezifischer Gene über das kernlokalisierte Fos-Onkoprotein, einen Transkriptionsfaktor, herzustellen. Z. B. wird der Kollagenasepromotor durch Überexpression von Fos-Protein aber auch durch die extranukleär lokalisierten Proteine Ras, Mos, bzw. Sarc induziert (Schönthal et al., 1988b; Gauthier-Rouviere et al., 1990). Diese Transaktivierung wird durch dieselbe cis-wirkende Nukleotidsequenz (TRE: TPA-reguliertes Element) vermittelt (Schönthal et al., 1988b). Dies sind Evidenzen dafür, daß die verschiedenen (Proto-)Onkogene über die Aktivierung von nukleären Proto-Onkogenen die Expression anderer zellulärer Gene beeinflussen.

Auch DNA-schädigende Agenzien sind Stimulatoren der Genexpression. Dazu gehört UV-Strahlung (Stein et al., 1989; Krämer et al., 1990; Herrlich et al., 1992). Der durch UV-Strahlung induzierte DNA-Schaden ist das primäre Ereignis für die Auslösung der Genexpression. Obwohl die durch UV-Strahlung bedingte DNA-Schädigung und die davon ausgelöste Genexpression im Kern stattfinden, läuft das Signal zwischen beiden über das Zytoplasma (Herrlich et al., 1992). Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Interessant ist die Möglichkeit, daß die durch UV-Strahlung ausgelösten Signalwege in eukaryontischen Zellen mit den Wachstumssignalwege einmünden (Krämer, 1991; Herrlich et al., 1992; Schorpp et al., 1984). Dabei könnten der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und das Zytokin Interleukin-1 (IL1) eine Rolle spielen, da eine Interaktion dieser

Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren in der UV-Antwort involviert zu sein scheint (Krämer, 1991). Die UV-Strahlung und bFGF/IL1 induzieren gleiche Gene über die gleichen cis-wirkenden Sequenzen.

Die Regulation der Genexpression erfolgt hauptsächlich durch Regulation des Initiationsschrittes der Transkription. Die transkriptionelle Initiation der für eukaryontische Proteine kodierenden Gene ist ein Prozess, für den eine Vielzahl von Faktoren und die RNA-Polymerase II (PolIII) erforderlich sind. An spezifische Sequenzen bindende Faktoren (Transkriptionfaktoren) können die Transkriptionsinitiation verstärken (zur Übersicht: Mitchell und Tjian, 1989). Der generelle Faktor TFIID bindet an die TATA-Box und fördert eine spezifischen Komplexbildung mit der Pol II in der Nähe des Transkriptionstarts. Die TATA-Box allein scheint für die Komplex-Bildung ausreichend zu sein und vermittelt die Basalaktivität der Transkription.

Die Regulation der Genexpression erfolgt durch Modifikationen bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren und/oder Neusynthese und damit durch Mengenzunahme von Transkriptionsfaktoren.

(1) Modifikation: Viele Transkriptionsfaktoren werden glykosyliert oder phosphoryliert. Der Transkriptionsfaktor SP1 ist z. B. nach Aktivierung glykosyliert (Jackson und Tjian, 1989). Die Proteine Jun bzw. Fos werden durch folgende Agenzien phosphoryliert oder dephosphoryliert: Serum (Barber und Verma, 1987), TPA (Boyle et al., 1991; Gebel, 1992), UV-Strahlung (Gebel, 1992), Ras-Onkogene (Binetruy et al., 1991; Smeal et al., 1991), MAP-Kinase ("mitogen-activated protein-serin kinase") (Pulverer et al., 1991). Das Fos ist auch ein glykosyliertes Protein, die Bedeutung dieser Modifikation ist noch unklar. Der Transkriptionsfaktor "Serum Response Factor" (SRF) (Prywes et al., 1988) ist ebenfalls phosphoryliert und dann an der Regulation des c-fos Gens beteiligt. Der Transkriptionsfaktor CREB ("cAMP response element binding- protein") wirkt als

Aktivator oder Repressor je nach seinem Phosphorylierungszustand (Lamph et al., 1990).

(2) Neusynthese: Die Menge eines Transkriptionsfaktors in einer Zelle wird einerseits durch seine Degradation und andererseits durch Neusynthese kontrolliert. Daher werden viele für Transkriptionsfaktoren kodierende Gene durch Stimulation induziert, um mehr Protein zu produzieren. Dies trifft z. B. für das c-fos- und c-jun-Gen zu (Greenberg und Ziff, 1984; Ryseck et al., 1988). Sie können dann z. B. durch das Ubiquitin-System degradiert werden (Ciechanover et al., 1991). Natürlich müssen sie zunächst durch Modifikation vorhandener Transkriptionsfaktoren induziert werden dann erfolgt eventuell Autorepression wie für das fos Gen gezeigt (König et al., 1989)

Die Gene, die nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren schnell induziert werden (innerhalb 30 Minuten), kodieren in vielen Fällen für Transkriptionsfaktoren (Schuermann et al., 1991a; Herschman, 1989). Man nennt diese Gene "immediate early genes" oder "primary response genes". Dazu gehören c-jun, c-fos, egr1 (zif268, Krox24) bzw. egr2 (Krox20), junB, fosB, fra1 u. a.. Anschließend regulieren die neusynthetisierten Proteine die zeitlich spätere Expression der "secondary response genes". Die Induktion der "primary response genes" scheint bei der Beschleunigung der Proliferation eine Rolle zu spielen. Zumindest wurde gezeigt, daß Jun und Fos für die Proliferation von Fibroblasten erforderlich sind (Kovary und Bravo, 1991b).

Das c-jun Gen spielt weiterhin in folgenden physiologischen Prozessen eine Rolle. (1) Transformation (Castellazzi et al., 1990; Bos et al., 1990; Ginsberg et al., 1991; Lloyd et al., 1991; Alani et al., 1991; Morgan et al., 1992; Schönthal et al., 1992; Havarstein et al., 1992), (2) Zellzyklus (Ryseck et al., 1988; Morello et al., 1990; Boldogh et al., 1990; Carter et al., 1991; Kovary und Bravo, 1991a; Kovary und Bravo, 1991b; Redner et al., 1992), (3) Differenzierung (de Groot et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990a; Grossi et al., 1991; Kitabayashi et al., 1992; Su et al., 1991), (4) DNA-Replikation

(Wasylik et al., 1990; Murakami et al., 1991), (5) "SOS"-Antwort (Devary et al., 1991; Sherman et al., 1990; Stein et al., 1989; Stein et al., 1992; Xanthoudakis, et al., 1992), (6) Neuronale Funktionen (Sonnenberg et al., 1989; Mellström et al., 1991).

Fos/Jun sind Transkriptionsfaktoren. Man kennt eine Reihe von Genen, die durch Jun/Fos induziert werden. Als positiv reagierende Gene wurden z. B. das Kollagenase-Gen (Schönthal et al., 1988b; Chiu et al., 1988), das Gen des HIV ("Human Immundeficiency Virus") (Stein, 1990) und das Proenkephalin-Gen (Sonnenberg et al., 1989) identifiziert. Fos wirkt nicht alleine sondern nur als Heterodimer mit Jun (AP1 = Aktivierendes Protein 1) (Angel et al., 1988a; Bohman et al., 1987; Curran und Franza, 1988; Franza et al., 1988; Rauscher III et al., 1988a; Gebel et al., 1989). Das Jun-Protein bildet entweder ein Homodimer oder Heterodimere, wobei der "Leuzin Zipper" Anteil eine entscheidende Rolle spielt (Kouzarides et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988a; Gentz et al., 1989; Halazonetis et al., 1988; Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989b; O'Shea et al., 1992; Ransone et al., 1989; Rauscher III et al., 1988c; Turner und Tjian, 1989; Schuermann et al., 1991b). Das Dimer bindet mit Hilfe der basischen Domänen der beiden Proteinanteile z.B. an das TRE (TGAGTCA) der Kollagenase (Rauscher III et al., 1988b; Abate et al., 1990a; Nakabeppu et al., 1988; Nakabeppu und Nathans, 1989; Neuberger et al., 1989; O'Neil et al., 1990; Vinson et al., 1989). Beide Proteine besitzen Transaktivierungsdomänen (Angel et al., 1989; Hirai et al., 1990; Abate et al., 1990b; Gebel, 1992). Nicht nur vermehrte Synthese sondern auch Modifikation von AP1 ist an der Aktivierung von Genen beteiligt. TPA Behandlung führt zur Dephosphorylierung von Serin bzw. Threonin in der Nähe der DNA-Bindedomäne von Jun. Die dadurch verursachte Verstärkung der Bindung erhöht die Aktivierungsfähigkeit (Boyle et al., 1991). Die cJun-Aktivität wird auch direkt durch Phosphorylierung der Transaktivierungsdomäne mit MAP-Kinase (Pulverer et al., 1991) bzw. indirekt durch das Ras-Onkoprotein (Smeal et al., 1991; Binetruy et al., 1991) erhöht.

Die Regulation der c-fos Genexpression ist eingehend untersucht worden. Es wird hauptsächlich durch den "Serum Response Factor" (SRF) über das "Serum Response Element" (SRE) induziert. Als Regulatorgen muß c-Fos dann wieder inaktiviert werden. Dies geschieht auf verschiedenen Ebene. Das Protein selbst und seine mRNA werden sehr schnell degradiert (Rahmsdorf et al., 1987) und sein Promotor wird bald nach Induktion wieder reprimiert. Die Abschaltung benötigt Proteinsynthese: in Gegenwart von proteinsynthesehemmenden Substanzen findet man keine Abschaltung der Transkription (König et al., 1989) sondern sogar eine Superinduktion (Edwards und Mahadevan, 1992). Die Abschaltung wird durch die Überexpression von Jun oder Fos hervorgerufen, also durch Autorepression reguliert (Schönthal et al., 1989; Sassone-Corsi, et al., 1988b; Lucibello et al., 1989). Weiterhin wurde gezeigt, daß das SRE des c-fos Promotors sowohl für die Induktion (Lucibello et al., 1989) als auch für die Fos- bzw. Jun-vermittelte Repression des c-fos Promotors verantwortlich ist (König et al., 1989).

Das c-jun Gen (Haluska et al., 1988) ist wie c-fos ein transient reguliertes Gen. Es wird durch eine Reihe von Agenzien angeschaltet: Serum (Ryder und Nathans, 1988b; Ryseck et al., 1988), EGF (Quantin et al., 1988; Bartel et al., 1989), PDGF (Ryder und Nathans, 1988b), NGF (Wu et al., 1989), TPA (Angel et al., 1988b; Lamph et al., 1988), UV-Strahlung (Stein et al., 1992; Devary et al., 1991), ionisierende Strahlen (Sherman et al., 1990), Insulin (Mohn et al., 1990), Interleukin 1 (Fagarasan et al., 1990), Angiotensin II (Naftilan et al., 1990), TNFa (Brenner et al., 1989), TGFβ (Pertovaara, et al., 1989), Retinolsäure (Kitabayashi et al., 1992), AdE1A (de Groot et al., 1991; van Dam et al., 1990), das Cytomegalovirus (Boldogh et al., 1990) sowie "Okadaic Acid" (Thevenin et al., 1991).

Im c-jun Promotor wurden zwei Sequenzen gefunden, die für die durch UV-Strahlung bewirkten Induktion des c-jun Gens wichtig sind. Diese beiden Sequenzen werden als URE1 ("UV responsive element 1") bzw. URE2 bezeichnet (Stein et al., 1992). Das URE1 hat Homologie zu einer AP1-Bindestelle (Angel et al., 1988b). Bei der Induktion dieses Gens scheint eine Protein-Kinase oder ein anderes modifizierendes System beteiligt zu sein, wobei keine Protein-Synthese erforderlich ist (Zwiller et al., 1991; Thevenin et al., 1991).

ZIELSETZUNG

Die Mechanismen der Expression der Kern-Protoonkogene stehen im Mittelpunkt der Tumorforschung. Zur Zeit gibt es ein vorrangiges Interesse für Mechanismen der Repression des c-jun Promotors. Aber man weiß relativ wenig darüber, wie der Promotor des c-jun Proto-Onkogens abgeschaltet wird. Zielsetzung meiner Arbeit war es, den Mechanismus der **Repression** des jun-Gens zu studieren. Ich konzentrierte mich dabei auf die folgenden Kernpunkte:

- Identifizierung des Repressors (Unterliegt das cjun-Gen, ähnlich dem c-fos-Gen, Autorepression?)
- Welches sind die DNA-Sequenzmotive des c-jun Promotors, die für die Repression verantwortlich sind.
- Welche Proteindomänen sind seitens des Repressors für das Abschalten verantwortlich.

MATERIAL

Chemikalien und Arbeitsmittel

Acetyl-Coenzym A, Li-Salz	Pharmacia, Freiburg u. Sigma, München
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose TypII, TypVII	Sigma, München
Alkalische Phosphatase (20U/ μ l)	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad Laboratories, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	"
Bacto-Trypton	"
Bakterienplatten (9cm)	Greiner, Nürtingen
Biogel P60	Bio Rad Laboratories, München
BSA	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilversheim
Dexamethason	Sigma, Nürtingen
Dithiothreitol	BRL Inc., Neu-Isenburg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
desoxy-Nukleotidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
didesoxy-	"
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Buchs Schweiz
DMEM	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5U/ μ l)	Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt
Emulsifier Safe	Packard Instrument Comp., Illin.
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merk, Darmstadt
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	BRL inc., Neu-Isenburg
G418	Gibco, Karlsruhe
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München
HEPES	Sigma, München
Kanamycinsulfat	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Macherey und Nagel, Düren
Lachs-Spermien DNA, TypIII	Sigma, München

Lamda DNA	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Boehringer, Mannheim
"Prime it" labelling-Kit	Stratagene, California
Nacs-Prepac-Säulen	BRL inc., Neu-Isenburg
Nitrozellulose-Filter	Schleicher und Schüll, Dassel
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio-Rad, München
Oligo-dT Zellulose Typ VII	Collaborativ Research, Frankfurt
Nonidet P-40	Bio Rad Laboratories, München
Nukleosidtriphosphat	Boehringer, Mannheim
PEG	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
PIPES	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Serva, Heidelberg
Poly (dIdC)	Pharmacia, Freiburg
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Bio-Rad, München
TPA	Sigma, München
Tris	Sigma, Deisenhofen
Whatmann® 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Proteinase K (Lyophilisat) (aus <i>Tritirachium album</i>)	Merk, Darmstadt
Restriktions-Endonukleasen	Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt
	Boeringer, Mannheim
	BRL Inc., Neu-Isenburg
	Pharmacia, Freiburg
	Promega Biotec, Heidelberg
	Boehringer, Mannheim
	Genofit, Heidelberg
RNase A (100mg/ml)	Sigma, München
RQ1-DNase (1U/µl, RNase frei)	Wacker Chemie, München
Salmon-Sperm-DNA TypIII, Na-Salz	Promega Biotec, Heidelberg
Silan	Bio Labs, schwalbach b. Frankfurt
T4-DNA-Lygase (2U/µl)	USB, Cleveland, USA
T4-Polynukleotid-Kinase (10U/µl)	Boehringer, Mannheim
T7-Sequenase-Kit	Fluka, Buchs schweiz
transfer-RNA (aus Kalbsleber)	Bender und Hobein, Karlsruhe
Transformations-Chemikalien	
Whatman 3MM-Papier	
Zellkulturflaschen (80 cm ² , 175 cm ²)	Greiner, Nürtingen
Zellkulturschalen (9cm)	Greiner, Nürtingen

Radiochemikalien

D-threo-(dichloracetyl-1-¹⁴C)-

Chloramphenicol (7.4 MBq/ml, 2.11 GBq/mmol)

α -³²P-dCTP (370MBq/ml, 110 TBq/mmol)

α -³²P-UTP (370MBq/ml, >15 TBq/mmol)

γ -³²P-ATP (370MBq/ml, >185 GBq/mmol)

α -³⁵S-dATP (296 MBq/ml, >22 TBq/mmol)

wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen.

Bakterien und Zellen

E. coli DH5: F⁻, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, λ ⁻,
recA1, gyrA96, relA1.

Hela tk⁻: Menschliche Cervix-Karzinoma-Zelle.

NIH3T3: Embryonale Maus-Fibroblasten Zell-Linie.

Kulturmedien

L-Broth:

0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 1.0% NaCl, 1.0% Bacto-Tryton

SOB:

0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10mM NaCl,
2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

SOC:

SOB mit 20 mM Glucose

Bakterien-Selektionsmedium:

L-Broth mit 100 mg/ml Ampicillin

L-Broth mit 50 mg/ml Kanamycin

Einfrier-Medium (Bakterien):

90% L-Broth, 10% DMSO

Kulturmedium für Hela tk⁻, NIH3T3:

DMEM mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin

Einfrier-Medium (Zellkultur):
80% Medium, 10% FCS, 10% DMSO

UV-Bestrahlungsquelle:

Es wurde eine 15W Hg-Lampe der Wellenlänge 254 nm (halbmaximale Bandbreite 2.3 nm) benutzt. Die Leistung der Lampe in 32 cm Abstand beträgt 2.8W/m².

Plasmid-Konstruktionen

Alle hier benutzten c-junCAT-Konstrukte wurden in den Vektor pBLCAT5 kloniert. pBLCAT5 (erhalten von C. Jonat, Jonat et al., 1990) entstand aus pBLCAT3 (Luckow und Schütz, 1987) durch Entfernen eines UV- und Phorbolster-Induktion vermittelnden Elementes zwischen den *Eco*O 109- und *Nde*I-Schnittstellen (Jonat et al., 1990). pBLCAT4 entstand aus pBLCAT2 (Luckow und Schütz, 1987) durch Entfernen desselben Elementes zwischen den *Eco* O 109- und *Nde*I-Schnittstellen. Die Vektoren pBLCAT5, pBLCAT4 unterscheiden sich lediglich durch den inserierten Promotor. pBLCAT5 hat keinen Promotor, pBLCAT4 enthält den *Herpes simplex Virus* Thymidinkinse (tk) Promotor.

Die meisten c-junCAT-Konstrukte sind schon beschrieben (Angel et al., 1988b; Stein et al., 1992). Die CAT-Konstrukte, (-1600/+170)junCAT, (-1600/+170,mURE2)junCAT, (-1600/+170,mURE1,2)junCAT, (-283/+170)junCAT, (-196/+170)junCAT, (-167/+170)junCAT, (-132/+170)junCAT, (-79/+170)junCAT, (-18/+170)junCAT sowie URE1tkCAT und URE2tkCAT wurden von B. Stein, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. Die genaue Klonierung ist bei Stein et al., 1992 beschrieben. Das Konstrukt (-132/+170,mURE1)junCAT wurde von P. Angel, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt (Angel et al., 1988b).

Zur Herstellung von (-1600/+170,mURE1)junCAT wurde das StuI-Fragment aus (-1600/+740)junCAT (StuI schneidet im Vektor und bei Position -79) in das StuI-geschnittene Vektorfragment von (-132/+170,mURE1)junCAT ligiert und die Orientierung überprüft. Zur Herstellung von (-450/+170) junCAT wurde das NcoI Fragment aus (-1600/+170)junCAT in das NcoI-geschnittene Vektorfragment von (-450/+170)junCAT (erhalten von R. Offringa, unveröffentlicht) ligiert und die Orientierung bestimmt.

(-283/+170,mURE2)junCAT ist abgeleitet von (-283/+170)junCAT. Das Ausgangsplasmid wurde mit EcoO109 (Position-216) und SacII (Position-166) geschnitten und das Vektorfragment isoliert. Die fehlende Sequenzen zwischen den Position -216 und -166 wurde durch ein synthetisches Oligonukleotid mit Eco109- und SacII-Enden ersetzt. Somit wurde die Sequenz -191 ATTACCTCATCC -181 durch die Sequenz -191 TGGACCTCGAGC-181 ersetzt. Das Oligonukleotid und das Vektorfragment ergaben dann nach Ligation das Konstrukt (-283/+170,mURE2)junCAT. Die interne Deletionsmutante (-283/+170, Δ URE1) junCAT entstand durch Ligation des NcoI-Fragments aus (-132/+170,mURE1)junCAT (NcoI schneidet unter anderem in der Position -64 und im CAT-Gen) in den NcoI geschnittenen (-1600/+170)junCAT-Vektor (NcoI schneidet hier bei Position -130 und im CAT-Gen). Die Doppelmutante (-283/+170, Δ URE1,m2)junCAT wurde wie oben beschrieben konstruiert, nur wurde als Ausgangsplasmid (-283/+170, Δ URE1)junCAT benutzt.

Der Expressionsvektor für das Maus c-fos unter Kontrolle des RSV LTR wurden von R. Offringa, Leiden, Niederlande, zur Verfügung gestellt und ist von ihm beschrieben (Offringa et al., 1990). RSVv-fos ist ein Expressionsvektor für das retrovirale (FBJ-MuSV) fos Gen (Jenuwein und Müller, 1987). E300, L3L4L5 und FA183 wurde von Scheuermann, Marburg, zur Verfügung gestellt und die genauen Mutationen sind in Scheuerman et al., 1989, Neuberg et al., 1989 bzw. Lucibello et al., 1989 beschrieben. pSVfos ist ein Expressionsvektor für das Maus c-fos Gen (Schönthal et al., 1988b). Die Expressionsvektoren für die c-Fos-Mutanten (cFMBD und cFMBDD)

wurden ebenfalls von P. Angel zur Verfügung gestellt. Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der Mutanten.

Die Expressionsvektoren für das c-jun, das v-jun bzw. die vJun/cJun-Mutanten (I10, cJM, vJd1/119, vJMBD, cJd6/194 sowie M3 und M15) wurden von P. Angel, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt und sind beschrieben (Angel et al., 1989; Angel et al., 1988b; Smeal et al., 1989). Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 15 bzw. 16 zu sehen. RSVc-jun bzw. RSVv-jun ist ein Expressionsvektor jeweils für das menschliche c-jun Gen (Bohman et al., 1987) bzw. für das virale jun Gen (Maki et al., 1989). pSVjun ist ein Expressionsvektor für das c-jun Gen unter Kontrolle des SV40 Promotors. Die Jun Mutante, M3d, ist von dem cJd6/194 und M3 Konstrukten abgeleitet. Das NcoI/SstI Fragment von cJd6/194 wurde durch dasselbe Fragment von M3 ersetzt. M15d wurde wie oben beschrieben kloniert, wobei statt des M3 das M15 Konstrukt benutzt wurde.

pSV 65, pSVnuj: Der vom SP65 abgeleitete Expressionsvektor pSV65 unter der Kontrolle des SV40-Enhancers sowie der "antisense"-cjun Expressionsvektor pSVnuj sind in Schönthal et al. (1989) beschrieben. Der SV40-Expressionsvektor pKSV10 sowie der "antisense"-cfos Expressionsvektor pSVsof sind ebenfalls in Schönthal et al. (1988b) beschrieben.

pSVneo ist ein von pSV2CAT abgeleitetes Plasmid mit Austausch der CAT-Sequenzen gegen ein offenes Leseraster des Neomycin-Resistenzgens ("neomycin phosphotransferase").

METHODEN

Die beschriebenen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus den Handbüchern von Ausubel et al. (1989) und Maniatis et al. (1982) abgeleitet.

1. Behandlung von Nucleinsäuren

Spektrophotometrische Konzentrations-Bestimmung von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren wurden 1 zu 50 mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Das Verhältnis E_{260} zu E_{280} sollte etwa 1.8 : 1 bei DNA und 2 : 1 bei RNA sein.

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

$$E_{260} \times 40 = \text{mg/ml RNA}$$

$$E_{260} \times 20 = \text{mg/ml Oligonukleotide}$$

Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung der proteinhaltigen Nucleinsäurelösung wurde mit Wasser auf mindestens 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1 x TNE gesättigt; 1 x TNE : 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) wieder gut geschüttelt. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren getrennt. Die Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) auf die gleiche Weise extrahiert.

Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem geeigneten Volumen NaAcetat (pH4.8) zu einer Endkonzentration von 0.3 M versetzt. Bei kleinen Fragmenten sollte man noch etwa 5 mg tRNA als Fällungshilfe zufügen. Nach Zugabe des 2.5 fachen Volumens Ethanol wurde 30 min bei -80 °C oder 2 Stunden bei -20 °C gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei 13,000 x g zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde der Niederschlag nochmal mit 80% Ethanol gewaschen. Bei der Fällung von Nukleinsäuren kann Ethanol auch durch Isopropanol ersetzt werden. Man gibt dabei 0.6-0.7 Volumen Isopropanol zu der wässrigen Nukleinsäurelösung.

2. Plasmid-DNA-präparation

Bakterien-Wachstum und Amplifikation

Die Bakterien wurden in 2 ml Nährmedium (L-Broth) mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) etwa 4 Stunden bei 37 °C geschüttelt. 150 µl von dieser Vorkultur dienten zum Animpfen von 200 ml Selektionsmedium. Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 37 °C im Erlenmeyer-Kolben geschüttelt.

Plasmide mit pBR322-Origin wurden grundsätzlich amplifiziert, um die Ausbeute an DNA zu erhöhen. Die Bakterien wurden in 5 ml TB mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann wurde 10 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und weitere 20 Stunden inkubiert.

Präparation großer Mengen Plasmid-DNA

200 ml einer über Nacht inkubierten Bakteriensuspension wurden 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Bakterien-Niederschlag wurde in 10 ml LysozymbLösung (50 mM Glukose, 10 mM EDTA pH7.8, 25 mM Tris pH8.0, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30

min auf Eis gestellt. Anschließend wurden unter Schütteln 20 ml alkalische SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1%SDS) zugegeben und die Suspension 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 15 ml 3 M NaAcetat wurde die Mischung 60 min auf Eis gestellt. Ausgefallenes Protein und genomische DNA wurde durch 20 min Zentrifugieren bei 16800 x g (4 °C) abgetrennt. Zum Überstand wurde das 2.5 fache Volumen Ethanol (-20 °C) gegeben und die Plasmid-DNA mindestens 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde 10 min bei 16800 x g (4 °C) zentrifugiert, getrocknet und in 8 ml 0.1 M NaAcetat, 50 mM Tris pH8.0 gelöst. Nach anschließender zweiter Ethanol-fällung bei -20 °C für mindestens 30 min wurde der Niederschlag getrocknet und in 4.3 ml 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH8.0 gelöst. Nach Zugabe von 4.3 g CsCl und 320 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Lösung in 5 ml Vti65-Zentrifugenröhrchen gefüllt und diese zugeschweißt. Nach 16 Stunden Ultrazentrifugation im Beckman Vti65-Vertikalrotor bei 55000 rpm (20 °C) wurde die circuläre Plasmid-Bande abgesaugt und nochmals weitere 6 Stunden ultrazentrifugiert. Die Plasmid-Bande wurde erneut abgesaugt, die DNA mit Wasser auf 4 ml aufgefüllt und das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Die DNA wurde nach 30 min Zentrifugieren bei 16800 x g (4 °C) mit 10 ml 80% Ethanol gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde nach Trocknen in Wasser gelöst.

Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA

Die Bakterien wurden in 3 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 mg/ml) oder Kanamycin (50 mg/ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1.5 ml der Bakterien-Kultur wurden 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100 µl Lysozymlösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH7.8, 25 mM Tris pH8.0, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1%SDS) und Mischen wurde 150 µl 3 M NaAcetat zugefügt

und 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 1 ml Ethanol bei -80 °C für 30 min präzipitiert. Nach 5 minütigem Zentrifugieren wurde der Niederschlag getrocknet und in 100 µl 0.1 M NaAcetat, 50 mM Tris pH8.0 gelöst. Anschließend wurde die DNA mit 250 µl Ethanol bei -80 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation wurde der Niederschlag zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl Wasser gelöst. Der Restriktionsverdau der Plasmide wurde in Gegenwart von 1 µl RNase A (100 mg/ml) im Reaktionsansatz durchgeführt.

3. Klonierungstechniken

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Wenn nicht anders angegeben, wurde die DNA in 1 x Universal-Verdaupuffer (10 mM Tris pH7.5, 50 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA) mit dem entsprechendem Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht bei 37 °C verdaut. 1 Enzym-Einheit verdaut in einer Stunde 1 µg Lambda-DNA. Die Reaktion wurde mit 5 µl 5 x Glycerin-Proben Puffer (1x: 10 mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromophenolblau) abgestoppt.

Entfernung endständiger Phosphatgruppen

(1) von 5'-Überhängen

Die DNA wurde mit 1 µl Alkalischer Phosphatase (1U/µl) in einem Endvolumen von 50 µl 1 x CIP-Puffer (50 mM Tris pH9.0, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin) versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte durch 30 minütige Inkubation bei 37 °C, zufügen einer weiteren Enzymeinheit und nochmaliger 30 minütiger Inkubation.

Anschließend wurde 42.5 μ l H₂O, 10 μ l 10 x TNE (1x: 10mM NaCl, 10 mM Tris pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0) und 2.5 μ l 20% SDS zugegeben und 15 min bei 68 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

(2) von 3'- Überhängen und stumpfen Enden ("blund ends")

Diese Dephosphorylierung erfolgte unter sonst gleichbleibenden Bedingungen 15 min bei 37 °C, gefolgt von 15 min bei 56 °C. Nach erneuter Enzymzugabe wurde dies nochmals wiederholt. Anschließend wurde das Enzym durch 10 minütiges Erhitzen auf 68 °C inaktiviert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt.

Auffüllen von 5' Überhängen

Die DNA wurde mit 2 μ l 10 mM DTT, 1 μ l 10 mM dNTP-Mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 10 mM Tris pH7.5) und 1 μ l *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ μ l) in einem Endvolumen von 20 μ l 1 x Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH7.5, 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) versetzt. Nach 30 minütiger Reaktion bei RT erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion. 3'Überhänge werden bei dieser Prozedur abgebaut.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis 1:1 eingesetzt. Pro pMol-Enden mit Überhängen wurde 0.1 Einheit T4-DNA-Ligase verwendet, pro pMol-Enden ohne Überhänge 1 Einheit. Die Inkubation erfolgte über Nacht in 22 μ l Reaktionsvolumen bei 15 °C in 50 mM Tris, pH7.4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 100 μ g/ml Rinderserum-Albumin. Wenn sich die DNA in "low melting" Gel befand, wurde

diese innerhalb von 10 min bei 60 °C geschmolzen und nach Abkühlung auf 42 °C sofort mit obiger Lösung versetzt.

4. Markierung von DNA mit Radionukleotiden

"random priming" Markierung (Feinberg und Vogelstein, 1983)

Für Hybridisierungen wurden DNA-Proben nach dem "random-priming"-Verfahren radioaktiv markiert. Dabei wurde das "prime it" Kit der Firma "Stratagene" benutzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 20 ng linearisierte DNA (z. B. ein cDNA-Fragment) in 22 µl aqua bidest wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt und 10 µl Reaktionspuffer zugegeben. Mit der Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP (3000 Ci/ml; 10 mCi/ml) und 1 bis 2 µl T7-DNA-Polymerase (1 U/µl) wurde die Reaktion gestartet. Der Reaktionsansatz wurde nach kurzem Abzentrifugieren für 5 min bei 37 °C inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit mit 1 µl 0.5 M EDTA gestoppt. Die Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide erfolgte über eine Biogel P60-Chromatographie.

Gelfiltration über Biogel P60

Das Säulenmaterial Biogel P60 trennt Moleküle von 3000 bis 60000 Dalton auf. Es dient hier zur Abtrennung freier Nukleotide von einem radioaktiven DNA-Fragment. 2 g Biogel P60 wurden in 100 ml 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH7.8 einige Stunden quellen gelassen. Eine kurze Pasteurpipette wurde mit Glaswolle abgedichtet und eine Schlauchklemme angebracht. Die Pipette wurde bis zur oberen Einengung luftblasenfrei mit dem Säulenmaterial gefüllt, das daraufhin mehrmals mit 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH7.8 gewaschen wurde. Nach dem vollständigen Einsinken des Puffers in das Säulenmaterial wurde die Radioaktive Probe aufgetragen. Anschließend wurde mit 400 µl Puffer

nachgespült und diese Menge in der ersten Fraktion gesammelt. Dann wurde weiterer Puffer aufgetragen und je 3 Tropfen (etwa 100 μ l) gesammelt. Nach 12 Fraktionen wurde die Gelfiltration beendet. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde nach der Cerenkow-Methode gemessen und die 3 bis 4 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt.

5. DNA-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden eine Agarose-Konzentration von 0.8-2% gewählt. Es handelt sich hierbei um Mini-Gele: Gelvolumen 50 ml, Puffervolumen 100 ml, Taschenvolumen 25 μ l. Agarose TypII oder TypVII ("low melting agarose") wurde in 50 ml Laufpuffer 1 x TAE (40 mM Tris, 5 mM NaAcetat, 1 mM EDTA, pH7.7) durch Erhitzen gelöst, 0.3 μ g/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wurde gegossen und ca. 30 min abkühlen gelassen. Nach Entfernen des Kamms und Eingießen des Laufpuffers (1 x TAE) wurden die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA pH8.0, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromophenolblau) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 100 mA. Die DNA-Banden werden unter UV sichtbar.

Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele

Diese Gele dienen zur Auftrennung von DNA unter denaturierenden Bedingungen, hervorgerufen durch die 8.3 M Harnstoff-Konzentration und die hohe Temperatur während der Auftrennung. Es wurden 20 x 39 cm große Glasplatten benutzt mit 0.1 mm dicken Abstandhaltern. Die beiden Glasplatten müssen vorbehandelt werden. Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt. Auf die Glasplatte mit dem Ausschnitt wurde 3 ml 5% Dimethylchlor-Silan (gelöst in CCl₄) gleichmäßig verteilt und trocknen gelassen. Danach wurde die Glasplatte kräftig mit einem Kleenex® poliert. Auf die

ungeschnittene Glasplatte wurde eine Mischung von 3 ml Haftsilan und 100 µl 100% Essigsäure gleichmäßig verteilt und drei Minuten trocknen gelassen. Nach Abspülen mit Ethanol wurde die Glasplatte ebenfalls gut mit einem Kleenex® poliert. Nach kurzer Wartezeit wurden die beiden Glasplatten mit den 0.1 mm dicken Abstandhaltern zusammengebaut. Für ein 6% Gel werden 30 ml einer 6% Acrylamid-Lösung mit 8.3 M Harnstoff benötigt (100 ml einer deionisierten Acylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung werden mit 50 ml 10 x TBE (1x: 90 mM Tris pH8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH8.3) versetzt und darin 250 g Harnstoff gelöst. Die dann auf 500 ml mit Wasser aufgefüllte Lösung wird noch steril filtriert und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese mit Formaldehyd-Gelen durchgeführt. Ein Gramm Agarose wurde in 85 ml 1 x MOPS-Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAcetat, 0.5 mM EDTA, pH7.0) aufgekocht und gelöst. Verdunstetes Wasser wurde ersetzt und dem Gel nach Abkühlen auf ca. 60 °C unter dem Abzug 15 ml Formaldehyd (37%) zugesetzt. Dann wurde das Gel in die vorbereitete Kammer (zwischen zwei 14 x 15 cm großen Glasplatten (hitzesterilisiert) mit 5 mm dicken Kunststoff-Abstandhaltern) gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit Puffer überschichtet und der Kamm herausgezogen.

5 µg PolyA⁺ RNA (1 µg/µl) wurden in 20 µl FDP (50% deionisiertes Formamid, 6.5% Formaldehyd, 0.1 mg/ml Ethidiumbromid, in 1 x MOPS-Laufpuffer) aufgenommen und bei 60 °C für 10 min denaturiert. Die Proben wurden anschließend an Eis abgekühlt, mit 2 µl RNA-Ladepuffer (80% Glycerin, 0.1% Xylencyanol, 0.1% Bromphenolblau) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde senkrecht in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je etwa 400 ml 1 x MOPS. Die Formaldehydgelelektrophorese wurde ohne Pufferzirkulation durchgeführt. Nach Ende des Laufs wurde das Gel von den

Glasplatten entfernt und unter UV (302 nm Wellen-Länge) photographiert

7. Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA wurde in einem "low melting" Agarosegel aufgetrennt. Das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wurde 10 min bei 65 °C geschmolzen und mit dem 4 fachen Volumen 0.25 M NaCl in TE (10 mM Tris-HCl, pH7.2, 1 mM EDTA) verdünnt. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 65 °C wurde die Lösung auf 42 °C abgekühlt und über eine NACS Prepac Säule gereinigt. Eine NACS Prepac Säule wurde mit 5 x 1 ml 2 M NaCl in TE hydratisiert und mit 5 x 1 ml Bindungspuffer (0.2 M NaCl in TE für doppelsträngige DNA-Fragmente von weniger als 1 kb Länger, 0.5 M NaCl in TE für Doppelsträngige DNA-Fragmente von mehr als 1 kb Länge) äquilibriert. Die DNA Lösung wurde aufgetragen, mit 3 x 1 ml Bindungspuffer gewaschen und mit 400 µl Ablösepuffer (1M NaCl in TE) eluiert.

8. Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) mit dem "T7-Sequenase-Kit" der Firma USB, Cleveland Ohio sequenziert. Ca. 3 µg CsCl-Gradienten gereinigte DNA wurden bei Raumtemperatur für 5 min in 0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA denaturiert, anschließend mit 2 µl 2 M NaAcetat (pH4.6) neutralisiert und mit Ethanol bei -80 °C präzipitiert. Zur Hybridisierung des Primers wurden 7 µl Plasmid-Lösung plus 2 µl 10 x Reaktionspuffer mit 1 µl Primer (1pMol) gemischt, auf 65 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach einer 5 minütigen Strangverlängerung mit α -³⁵S-dATP erfolgte die Kettenabbruch-Reaktion mit den vier entsprechenden didesoxy-Nukleosidtriphosphaten (Terminations-Lösungen). Anschließend wurde eine Stop-Lösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0.05%

Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol) zugegeben. Zur Auftrennung der Reaktionsprodukte wurden die Proben (nach 3 min Kochen auf 90 °C) auf einem denaturierenden 6% Acrylamid/8.3M Harnstoff Gel aufgetrennt.

Die Terminations-Lösungen enthielten:

ddA-Mix: 80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dCTP, 80µM dTTP,
8µM ddATP, 50mM NaCl

ddT-Mix: 80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dCTP, 80µM dTTP,
8µM ddTTP, 50mM NaCl

ddC-Mix: 80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dCTP, 80µM dTTP,
8µM ddCT, 50mM NaCl

ddG-Mix: 80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dCTP, 80µM dTTP,
8µM ddGTP, 50µM NaCl

9. Transformation von Bakterien

Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation (Chung und Miller, 1988)

Bakterien des Stammes DH5 wurden mit Plasmiden entsprechend der Methode von Chung und Miller (1988) transformiert. 20 ml LB-Broth-Medium wurde mit einer Einzelkolonie DH5 angeimpft und über Nacht in 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml entnommen und mit 50 ml frischem LB-Broth-Medium verdünnt. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3-0.6 inkubiert. Dann wurden die Bakterien bei 4 °C mit 5000 rpm (670 x g) für 10 Min. abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml TSB (LB-Broth pH6.1, 10% PEG (MW3350), 5% DMSO, 20 mM Mg⁺⁺ (MgCl₂/MgSO₄)) resuspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die nun kompetenten Bakterien wurden bei 0 °C schnellstmöglichst in 200 µl Portionen abgefüllt und eingefroren.

Transformation von kompetenten Bakterien

200 µl kompetente Bakterien wurden mit 10-100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 3 ml SOC zugegeben und der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden 5 min bei Raumtemperatur mit 670 x g abzentrifugiert, in 20 µl SOB resuspendiert, auf entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Herstellung von Selektiv-Agarplatten

In einem 2 Liter Kolben wurden 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Difco-Agar auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45 °C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (oder Kanamycin, 50 µg/ml) zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agar-Platten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

10. Isolierung von polyA⁺-mRNA aus eukaryontischen Zellen

Zwei 15 cm Petrischalen mit nahezu konfluentem Zellrasen wurden nach Abgießen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel in 10 ml STE (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH7.4, 10 mM EDTA) abgeschabt und mit SDS (Endkonzentration 0.5%) und Proteinase K (Endkonzentration 300 µg/ml) versetzt. Zum Scheren der genomischen DNA wurde das Gemisch ca. 30 Sekunden mit Hilfe des Ultraturax homogenisiert und dann für 40 min in einem 37 °C Wasserbad inkubiert. Die Lösung wurde dann mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von NaCl auf 0.5 M und 200 mg Oligo-dT Zellulose (TypVII) in 2 ml HSB (0.4 M NaCl, 20 mM Tris pH7.4, 10 mM EDTA, 0.25% SDS) wurde die Suspension über Nacht bei

Raumtemperatur auf einer Rotationsapparatur gemischt. Danach wurde die Zellulose dreimal bei 3000 x g für 3 min zentrifugiert und jeweils in Ladepuffer (400 mM NaCl, 20 mM Tris pH7.4, 10 mM EDTA, 0.2% SDS) gewaschen. Danach wurde die Oligo d(T)-Cellulose-Suspension auf eine Biorad Econo Pac-Säule gegeben und mit 20 ml Waschpuffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH7.4, 10 mM EDTA, 0.2% SDS) gewaschen. Nach dem Trockenlaufen der Säule wurde die RNA mit 4 x 1 ml Elutionspuffer (1 mM Tris pH7.4, 0.1 mM EDTA, 0.2% SDS) eluiert, die Konzentrationen der unverdünnten RNA-Lösung im Photometer bestimmt und die RNA anschließend mit Ethanol bei 20 °C über Nacht gefällt. Nach der Präzipitation der RNA wurde diese durch Zentrifugieren pelletiert (30 min bei 4 °C und 12000 x g), getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde nochmals photometrisch bestimmt.

11. Northern-Blot und Hybridisierung

In eine Plastikwanne wurde 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat pH6.5) gefüllt. Auf einen Plastikständer in dieser Wanne wurde eine Glasplatte von der Größe des RNA-Gels gelegt und darüber drei Lagen Whatman 3MM Filterpapier, das mit 20 x SSC angefeuchtet wurde und nun links und rechts der Glasplatte in die SSC-Lösung eingetaucht war. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Danach wurde das Gel an allen Seiten mit Parafilm-Streifen umrandet, so daß das SSC nur durch das Gel gesaugt werden konnte. Auf das Gel wurde ein in Wasser und dann in 20 x SSC getränktes Filter in Gelgröße luftblasenfrei aufgelegt. Darüber kam nochmals ein 3MM Filterpapier und dann ein Stapel Kleenex-Tücher, die mit einer Glasplatte beschwert wurden. Dieser Kapillarblot wurde über Nacht durchgeführt. Der Filter wurde dann kurz in 20 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und dann zwischen zwei Lagen 3MM-Filterpapier bei 80 °C zwei Stunden gebacken.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Nylonfilter 1h bei 65 °C in Vorhybridisierungslösung (4 x SSC; je 0.02% Rinderserum-Albumin, PVP, Ficoll; 0.1% SDS; 3.3% PiPpi; 0.5M

Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7.3; 1.5% Na₄P₂O₇) inkubiert und nach Zugabe von 20 µg/ml "Carrier"-DNA eine weitere Stunde inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über 20 h bei 65 °C in 4 x SSC; 10 mM EDTA; 0.1% SDS; 20 µg/ml "Carrier"-DNA; 20 ng/ml "prime-it"-DNA. "Carrier"-DNA und "Prime-It"-DNA wurden 10 min gekocht, auf Eis abgekühlt und mit den restlichen Lösungen versetzt. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch 4maliges Waschen der Filter für je 30 min bei 65 °C in SSC; 0.1% SDS; 3% PiPPi (0.2M Na₂PO₄, 0.3M Na₂HPO₄, 1.5% Na₄P₂O₇) entfernt, wobei die SSC-Konzentration von 2 x über 1 x auf 0.5 x abgesenkt wurde. Der Filter wurde naß in Folie eingeschweißt und autoradiographiert.

12. Zellen kultivieren, einfrieren und auftauen

Die Zellen wurden in verschiedenen großen Gewebekulturschalen oder -flaschen bei 5.5% CO₂ in DMEM, 10% FCS, 1% P/S (Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100 µg/ml) gezogen. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und erneut eingesät. Zum Trypsinieren wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 5 ml PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM NaH₂PO₄) gewaschen und mit 1 ml 0.05-0.25% Trypsin bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wurde abgesaugt und die abgelösten Zellen in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/9cm Gewebekulturschale ausgesät. Für die Experimente wurden die Zellen 24-48 Stunden vor Gebrauch ausgesät. Zum Einfrieren wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsinisiert, gezählt und bei 330 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden zu 2-5 x 10⁶ in 1 ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann mehrere Stunden bei -80 °C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Reaktivierung wurden die Zellen sehr rasch bei 37 °C aufgetaut. Nachfolgend wurden sie in 10 ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

13. Transfektion und Behandlung von Zellen mit Induktoren

Alle Transfektionen wurden nach CaPO₄-Methode (Graham und van der Eb, 1973) durchgeführt.

Transiente Transfektion

NIH3T3- oder Hela tk⁻-Zellen wurden mit 8×10^5 Zellen pro 9 cm Petrischale 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Für die Herstellung des Präzipitates wurde zu 10 µg DNA in 475 µl 1 x HBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM D-Glucose, 21 mM HEPES pH7.1) 25 µl 2.5 M CaCl₂ zugegeben. Das Präzipitat wurde 30 min bei RT stehen gelassen. 485 µl dieser Mischung wurden dann im Kultur-Medium einer Petrischale verteilt. Nach 14 bis 19 Stunden Inkubation im Brutschrank, wurden die Zellen einmal mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄ pH7.3) gewaschen und frisches Medium mit 0.5% FCS zugegeben. Bei UV-Bestrahlungen wurden die Zellen nach Waschen mit PBS im trockenen Zustand in der Petrischale mit offenem Deckel bestrahlt. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine Dosis von 17.1 J/m² verwendet. TPA wurde in einer Endkonzentration von 100 ng/ml eingesetzt.

Stabile Transfektion

10 µg CAT-Plasmid-DNA wurden mit 1 µg pSVneo-Plasmid-DNA (Southern und Berg, 1982) wie oben beschrieben in 500 µl Gesamtvolumen präzipitiert und zum Medium (10ml) einer 9 cm Gewebekulturschale gegeben, die 24 h vor der Transfektion mit 7×10^5 Zellen ausplattiert wurde. Nach 16 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2 x PBS gewaschen und frisches DMEM/10% FCS zugegeben. Die Zellen wurden für 24 h weiterkultiviert, 1 zu 5 trypsiniert und zur Selektion von Zellen mit stabil integrierter Plasmid-DNA in DMEM/10% FCS mit 500 µg/ml G418 kultiviert. Nach 8-10 Tagen hatten sich G418-resistente Kolonien gebildet; diese wurden abtrypsiniert und zu Massenkultur vereinigt.

14. Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen

1-3x10⁶ Zellen wurden 2 x mit PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 6.5 mM NaHPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen und anschließend in 1 ml 1 x TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.6 mM Na₂HPO₄) mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgeschabt. Nach kurzer Zentrifugation bei 8800 x g wurde das Zellsediment in 100 µl 0.25 M Tris pH7.8 aufgenommen und anschließend 3 mal abwechselnd in Trockeneis/Methanol eingefroren und bei 37 °C aufgetaut (jeweils ca. 5 min). Nach diesem Vorgang wurde 10 min bei 20000 x g zentrifugiert und der klare Proteinüberstand vom Sediment getrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry. Die Extrakte wurden bei -20 °C aufbewahrt.

15. Proteinbestimmung nach Lowry

Zu 10 µl des Proteinextraktes wurden 490 µl Lösung 1 aus 2% Na₂CO₃ in 0.2 M NaOH pipettiert. Danach wurden 250 µl Lösung 4 (Lösung 1, ergänzt mit je 2.5 µl 2% Na-K-Tartrat, 2% CuSO₄) zugegeben und für 20 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 100 µl verdünntes Folin-Reagenz (1:1 mit H₂O) hinzupipettiert, für weitere 60 min inkubiert und nachfolgend die Extinktion bei 600 nm bestimmt. Nach Erstellung einer Eichkurve mit Rinderserum-Albumin-Lösungen bekannter Konzentration wurde die Proteinkonzentration der Extrakte berechnet.

16. CAT-Assay (Gorman et al., 1982b)

Für den CAT-Assay wurden von den Transfektionsansätzen jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt, die mit 0.25 M Tris pH7.8 auf 80 µl aufgefüllt wurde. Nach Zugabe von 2 µl ¹⁴C-Chloramphenicol

wurde die Reaktion mit 20 μ l 4 mM Acetyl-Coenzym A (in 0.25 M Tris pH7.8) gestartet. Nach eine Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat abgestoppt. Durch kurzes Mischen für 10 Sekunden wurde das Chloramphenicol aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch 5 min Zentrifugieren wieder getrennt und das Ethylacetat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Chloramphenicol wurde in 15 μ l Ethylacetat gelöst und punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Als Laufmittel diente eine Chloroform/Methanol-Mischung (9:1). Nach Lufttrocknung der DC-Platte wurde diese auf Hyperfilm MP®, der Firma Amersham, bei -80 °C über Nacht exponiert. Nach Entwicklung des Filmes konnte man die Lage der radioaktiven Flecken auf der DC-Platte markieren. Die 1'-, 3'- und 1',3'-diacetylierten Formen wandern in der angegebenen Reihenfolge jeweils schneller. Zur Auswertung wurden die nichtacetylierte und die acetylierten Formen ausgeschnitten und mit 5 ml "Emulsifier Safe" in einem Szintillationszähler 1 min gemessen. Auf diese Weise kann berechnet werden, wieviel Prozent des Chloramphenicols acetyliert wurden. Weiterhin kann man die spezifische Enzymaktivität in pMol/mg x h berechnen, da bekannt ist, wieviel pMol ¹⁴C-Chloramphenicol eingesetzt wurde (7000pMol), wieviel Substrat in 60 min acetyliert wurde und welche Proteinmenge eingesetzt wurde.

17. "nuclear run on" Transkriptions-Analyse (Greenberg et al., 1984)

2-3x10⁶ NIH3T3-Zellen wurden in 15 cm Gewebekulturschalen ausplattiert und 24 h in DMEM/10% FCS kultiviert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, DMEM/0.5% FCS versetzt. Nach 50 bis 56 Stunden wurden die Zellen für 30 Sekunden mit UV bestrahlt und die Zellkerne in 0, 15, 30, 45, 60 und 90 min präpariert.

Präparation der Zellkerne

Die Zellen wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen und in 5 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden dann bei 300-400 g abzentrifugiert und das Zell-Pellet in 1 ml NP40-Lysispuffer (10 mM Tris pH7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% (v/v) NP40) resuspendiert. Nach 5 münitiger Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne abzentrifugiert und mit 2 ml NP40-Lysispuffer gewaschen. Die Kerne wurden dann in 100 µl 50 mM Tris HCl pH8.3, 40% (v/v) Glycerol, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA resuspendiert und in flüssigem Stikstoff eingefroren.

Präparation der ³²P-markierten Transkripte

Die aufgetauten Kerne (100 µl) wurden mit 100 µl Reaktionspuffer (10 mM Tris pH8.0, 5 mM MgCl₂, 300 mM KCl, je 0.5 mM ATP, CTP, GTP und 100 µCi α-³²P-UTP) gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert.

Die "run-on"-Reaktionen wurden durch Zugabe von DNase I (4 Einheiten/Reaktion) und 5 min Inkubation bei 30 °C gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden dann in 1% SDS, 5 mM EDTA, 10 mM Tris pH7.4 mit 100 µg Proteinase K/ml für 30 min bei 42 °C incubiert und anschließend 2 x Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 25 µg Hefe-tRNA pro Ansatz wurden 250 µl 10% Trichloroessigsäure, 60 mM Na₄P₂O₇ hinzupipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat auf Nitrozellulosefilterscheiben (Schleicher und Schüll BA85, Durchmesser 25mm, Porengröße 0.45 µm) unter Verwendung einer Mehrfachfiltereinrichtung gesammelt und 3 x mit 10 ml 3% TCA, 30 mM Na₄P₂O₇ gewaschen. Die Filterscheiben wurden danach in 0.9 ml DNase I-Puffer (20 mM HEPES pH7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) mit DNase I (4 Einheit/Reaktion) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der DNase I-Verdau wurde durch Zugabe von EDTA (15 mM) und 1% SDS gestoppt. Die RNA wurde dann durch 10-15 minütige Inkubation bei 65 °C von den Filtern eluiert. Nach Abnahme der Flüssigkeit wurden die Filter mit 0.5 ml 1% SDS, 10 mM Tris pH7.5, 5 mM EDTA für weitere 10-15 min bei 65 °C inkubiert. Die beiden

Flüssigkeiten wurden vereinigt und mit 25 µg Proteinase K/ml für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Phenol/Chloroform Extraktion wurde die RNA in Gegenwart von 0.1 M NaCl mit 2.5 Volumen Ethanol bei -20 °C über Nacht präzipitiert.

Immobilisierung von DNA-Fragmenten an Nitrozellulose

Durch Verwendung einer "Slot Blot"-Apparatur (Scheicher & Schüll, Minifold II SRC 072/0) wurden die DNA-Fragmente an eine Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Nitrozellulosemembran wurde dazu vorher mit 2 x SSC (1 x SSC: 0.15 M NaCl, 0.0125 M Na-Citrat) getränkt. Die DNA-Fragmente in 1 mM EDTA, 20 mM Tris pH7.6 durch Zugabe desselben Volumens 1N NaOH für 20 min bei RT denaturiert. Danach wurde das 8 fache des NaOH-Volumens an Neutralisationspuffer (1.5 M NaCl, 1 M Tris pH7.5) zugegeben und rasch gemischt. Zur Anfärbung wurden 0.1-1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Von der Lösung wurde jeweils ein 1 µg DNA in einen "slot" pipettiert und die Flüssigkeit während 5 min durchgesaugt.

verwendete cDNA-Sequenzen

- * c-fos: 3.6 kb BamHI Fragment aus p48/3 (Rüther, et al., 1985)
- * c-jun: 1.2 kb SmaI/HindIII-Fragment aus pchj-1 (Angel et al., 1988a)
- * Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH): 1050 bp PstI-Fragment aus pMGAP (König et al., 1989)
- * HindIII verdaute Lambda-Phagen DNA
- * Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT): 671 bp Xho/ScaI-Fragment aus pBLCAT4

Vorhybridisierung, Hybridisierung, Waschen

Die Nitrozellulosemembran wurde in 100 ml 3 x SSC, 3 x Denhardt's (100 x Dehnhardt's: 2% BSA, 2% Polyvinylpyridin, 2% Ficoll MW

400000, 3% PiPPi (PiPPi: 0.2 M NaH₂PO₄, 0.3 M Na₂HPO₄, 1.5% Na₄P₂O₇), 1% SDS, 10 mM EDTA and 50 µg/ml "denatured salmon sperm DNA") für 2h bei 65 °C schüttelnd inkubiert.

Die ³²P-markierten Transkripte wurden in 200-220 µl TE (10 mM Tris pH7.5, 1 mM EDTA) gelöst. Zur Hybridisierung wurde jeweils dieselbe Zahl "counts per minute" (cpm) eingesetzt (0.5-1 x 10⁶ cpm/ml). Die Proben wurden vor Zugabe der Hybridisierungslösung 5 min bei 85 °C denaturiert. Anschließend wurde das einzelne Filter in Hybridisierungslösung (3 x SSC, 1 x Denhardt's, 3% PiPPi, 0.1% SDS, 10 mM EDTA und 10 µg/ml "denatured salmon sperm DNA") inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte für 36 h bei 65 °C im Schüttelwasserbad.

Die Filter wurden 2 h bei 65 °C in 2 x SSC gewaschen und nochmals für jeweils 30 min 1 x SSC, 30 min 0.5 x SSC bei 65 °C gewaschen. Nach kurzem Abtrocknen auf Kleenex[®] wurden die Filter auf Whatman 3 MM Papier befestigt und in Plastikfolie eingeschweißt. Die Exposition erfolgte zwischen zwei Verstärkerfolien bei -80 °C mit Amersham Hyperfilm MP[®].

ERGEBNISSE

1. Transiente Expression des endogenen c-jun Gens.

Zur Untersuchung von Parametern, die für die Repression des c-jun Proto-Onkogens wichtig sind, wurden c-jun Promotor-Indikatorgen-Konstrukte und Expressionsplasmide durch Kotransfektion in eukaryontische Zellen eingeführt und ihre Expression analysiert. Diese Experimente erfordern ein geeignetes Zellsystem, das die folgenden Voraussetzungen erfüllen muß: (i) Endogenes c-jun muß durch geeignete Induktoren, z. B. Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung bzw. Tumorpromotor, induzierbar sein und dann wieder abgeschaltet werden. (ii) Die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA soll hoch sein (iii) Die vom SV40 oder vom RSV Promotor gesteuerte Expression soll aktiv sein (Diese beiden Promotoren werden in den Expressionsplasmiden verwendet). Die Zelllinie NIH3T3 (embryonale Mausfibroblasten) erfüllt diese Kriterien. Daher wurden alle nachfolgenden Experimente mit dieser Zelllinie durchgeführt.

1.1. Die Abschaltung der Serum-vermittelten Expression des c-jun Gens erfolgt durch Hemmung der Transkription.

Zunächst wurde untersucht, ob die Repression des c-jun Gens auf der Ebene der Transkription oder Stabilität der mRNA erfolgt. Zu diesem Zweck wurde die Transkriptionsaktivität des c-jun Gens zu verschiedenen Zeiten nach Induktion direkt gemessen. Diese direkte Messung erfolgt durch "nuclear run on" Experimente. Für diese Analysen werden Kerne, in denen Initiation der mRNAs stattgefunden hat, isoliert. In den Kernen findet weder Elongation noch neue Initiation von mRNA statt. In vitro wird die Elongation schon initiiertes mRNA zugelassen, indem ATP, CTP, GTP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP als Baustein der mRNA hinzugefügt werden. Während der Inkubation werden alle bereits initiierten mRNAs verlängert und

radioaktiv markiert aber es findet keine neue Initiation statt. Damit ist die mRNA Neusynthese ein Maß für die transkriptionelle Aktivität der Gene zum Zeitpunkt der Ernte der Zellkerne. Um die Aktivität eines spezifischen Gens zu bestimmen, werden die radioaktiven mRNAs an spezifische DNA-Sonden hybridisiert. Nach Autoradiographie korreliert die Intensität der Schwärzung mit der Transkriptionsaktivität.

Zellen wurden zunächst 48-60 Stunden in Medium mit 0.5% FCS ("fetal calf serum") gehungert, um möglichst die durch Wachstumsfaktoren verursachte Transkription zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen mit 20% FCS haltigem frischem Medium stimuliert und zu verschiedenen Zeiten danach Kerne präpariert. Nach in vitro Elongation wurde die mit ^{32}P radioaktiv markierte mRNA, wie oben beschrieben, mit jun, fos und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) spezifischen Sonden hybridisiert (Abb. 1).

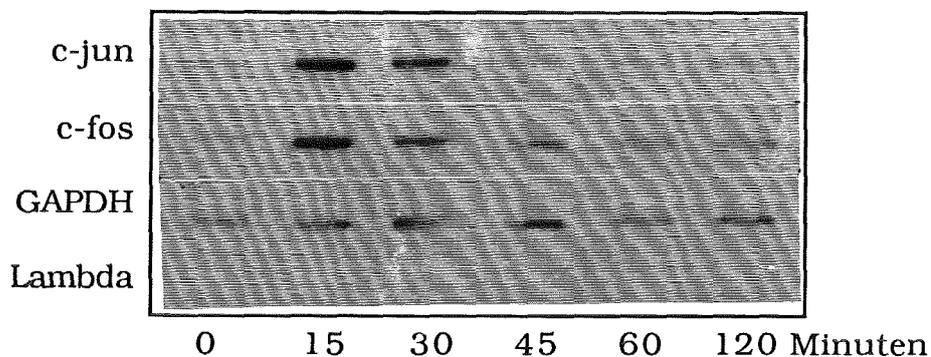


Abb. 1: Abschaltung des c-jun Gens nach Seruminduktion erfolgt auf Transkriptionsebene. Jeweils 2.5×10^6 NIH3T3 Zellen wurden für 48 Stunden in DMEM/0,5% FCS gehungert und anschließend mit DMEM/20% FCS behandelt, oder, zur Kontrolle, nicht behandelt. Zu den angegebenen Zeiten nach Serumzugabe wurden die Zellen geerntet und Kerne präpariert. Die Kerne wurden unter "run on" Bedingungen (siehe Methoden) für 30 min inkubiert und die neusynthetisierte RNA wurde mit $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. An Nitrozellulosemembran gebundene DNA-Proben für c-jun (1.2 kb SmaI/HinIII Fragment aus phcJ-1; Angel et al., 1988a), c-fos (3.6 kb BamHI Fragment aus p48/3; Rütger et al., 1985), das Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase Gen (GAPDH) (1.05 kb PstI Fragment aus pMGAP; König et al., 1989) wurden gleiche Menge an radioaktiv markierter RNA hybridisiert. HindIII Fragmente aus Lamda-Phagen DNA (Lamda) diente als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung.

Die basale Aktivität des endogenen c-jun Gens war in nicht stimulierten Zellen schwach, aber nachweisbar. Die Transkriptionsaktivität dieses Gens erreicht rasch, nämlich bereits 15 Minuten nach Serumstimulation, ein Maximum und wird anschließend schnell herunterreguliert. Nach 60 Minuten ist sie wieder auf ihren Basalwert abgesunken. Eine ähnliche Kinetik wird für das endogene c-fos Gen beobachtet. Die Expression des GAPDH Gens ist konstitutiv und dient als Nachweis, daß jeweils gleiche Menge an RNA für die Hybridisierung eingesetzt wurde. Das Experiment zeigt, daß die Repression des c-jun Promotors in vivo auf dem Niveau der Transkription stattfindet.

1.2. UV-Bestrahlung führt ebenfalls zur transienten mRNA Akkumulation des endogenen c-jun Gens.

Auch ultraviolette Strahlung führt zur Induktion von c-jun und c-fos (Stein et al., 1989; Stein et al., 1992). Um festzustellen, ob das c-jun Gen nach UV-Bestrahlung auch schnell abgeschaltet wird, wurden RNA-Mengen zu verschiedenen Zeiten nach UV-Strahlung durch Northern-Hybridisierung bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in Medium mit 0,5% FCS gehungert und anschließend durch UV-Bestrahlung stimuliert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung geerntet. PolyA⁺ RNA aus UV-bestrahlten sowie aus nicht bestrahlten Zellen wurden mit einer menschlichen c-jun cDNA-Probe hybridisiert (Abb. 2).

In nicht bestrahlten Zellen ist die Expression des c-jun Gens wie erwartet niedrig. Nach UV-Bestrahlung kommt es zu einer schnellen Akkumulation der c-jun mRNA. 30 min nach UV-Bestrahlung wurde eine drastische Akkumulation von c-jun mRNA beobachtet. Die RNA-Menge erreicht nach einer Stunde ein Maximum. Der Rückgang der Menge an mRNA ist auch drastisch. Die Menge an mRNA ist zwei Stunden nach Erreichen des Maximums wieder auf das Niveau der

Kontrolle abgesunken. Dies zeigt, daß die Expression des c-jun Gens auch durch UV-Bestrahlung transient ist.

Die Ähnlichkeit der Kinetik legt den Schluß nahe, daß die Abschaltung des c-jun Gens unabhängig von der Art der Stimulatoren durch den gleichen Mechanismus erfolgt.

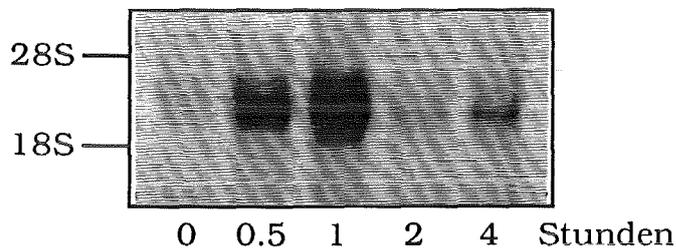


Abb. 2: UV-Strahlung führt zur transienten Expression des c-jun Gens. Jeweils 2.5×10^6 NIH3T3 Zellen wurden für 50 Stunden in DMEM/0,5% FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit UV (35.7 J/m^2) bestrahlt. Poly(A⁺) RNA wurde sowohl aus unbestrahlten Zellen als auch aus Zellen, die für die angegebenen Zeit nach UV Bestrahlung weiter inkubiert worden waren, präpariert. Je $5 \mu\text{g}$ RNA wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend auf ein Hybond N⁺ Filter (Amersham) übertragen. Die Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten jun-Probe (SmaI/HindIII-Fragment aus phcJ-1) wurde unter Standard-Bedingungen (siehe Material und Methoden) durchgeführt. Die Zahlenangaben auf der linken Seite markieren die Stellen, an denen die 28S, 18S rRNAs laufen.

2. Fos reprimiert die Induktion des c-jun Gens.

Es wurde bereits gezeigt, daß die Expression des c-fos Gens sowohl durch Fos selbst als auch durch Jun reprimiert wird (Sassone-Corsi et al., 1988b; Schönthal et al., 1989; Lucibello et al., 1989; König et al., 1989). Da die Expression des c-jun Gens mit gleicher Kinetik wie das c-fos Gen abgeschaltet wird (Abb. 1), habe ich getestet, ob die Expression des endogenen c-jun Gens ebenfalls durch cFos reprimiert werden könnte.

Technisch ist es einfacher statt des Abschaltens nach Induktion des Promotors die Verhinderung der Induktion des Promotors zu messen, z. B. durch Kotransfektionsexperimente. Im Falle des c-fos Gens sind die beide Vorgänge identisch, weil sie über ein einziges DNA-Element vermittelt werden (König et al., 1989; Lucibello et al., 1989). Ich habe für den c-jun Promotor zunächst auch Repression der Induktion gemessen.

In einem ersten Experiment habe ich in Zellen, in denen fos-Proteinsynthese durch das Glucocorticoid Dexamethason induziert werden kann, den Effekt von Fos-Überexpression auf die Seruminduktion des endogenen c-jun Gens studiert. Fos Überexpression erfolgt von einem durch Dexamethason induzierbaren Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) Promotor-fos-Chimärenkonstrukt aus (Abb. 3B) (Schönthal et al., 1988b), welches stabil im NIH3T3 Zellen transfiziert worden war.

Stabil mit MMTVfos transfizierte und unbehandelte NIH3T3 Zellen wurden für 50 Stunden in DMEM mit 0,5% FCS gehungert und dann mit 20% FCS haltigem frischem DMEM stimuliert, um das endogene c-jun Gen zu induzieren. In einem Teil der Zellen wurde 180 Minuten vor Serumgabe das stabil transfizierte MMTVfos Gen durch Dexamethason induziert. 30 bzw. 60 Minuten nach FCS-Stimmulierung wurde die Menge von c-jun Transkripten durch Northern-Analyse ermittelt (Abb. 3A).

30 bzw. 60 minütige Serumstimulation in unbehandelten MMTVfos transfizierten Zellen führt zur Induktion des endogenen c-jun Gens. Anschaltung des transfizierten c-fos Gens vor Serumstimulation blockiert die Induktion des endogenen c-jun Gens. Die basale Expression des endogenen c-jun Gens wurde nicht beeinflusst. In nicht transfizierten NIH3T3 Zellen wurde die Seruminduktion des endogenen c-jun Gens durch Dexamethason (DEX) allein nicht beeinflusst. Als Kontrolle, daß gleiche Menge an RNA eingesetzt worden waren, wurde der Filter mit einer GAPDH-Probe nachhybridisiert. GAPDH ist ein Haushaltsgen und unterliegt keine Regulation.

Dieses Experiment zeigt, daß die Überexpression von Fos die Induktion des c-jun-Gens blockiert. Je mehr Fos-Protein synthetisiert wird, desto stärker ist die Repression des c-jun Gens.

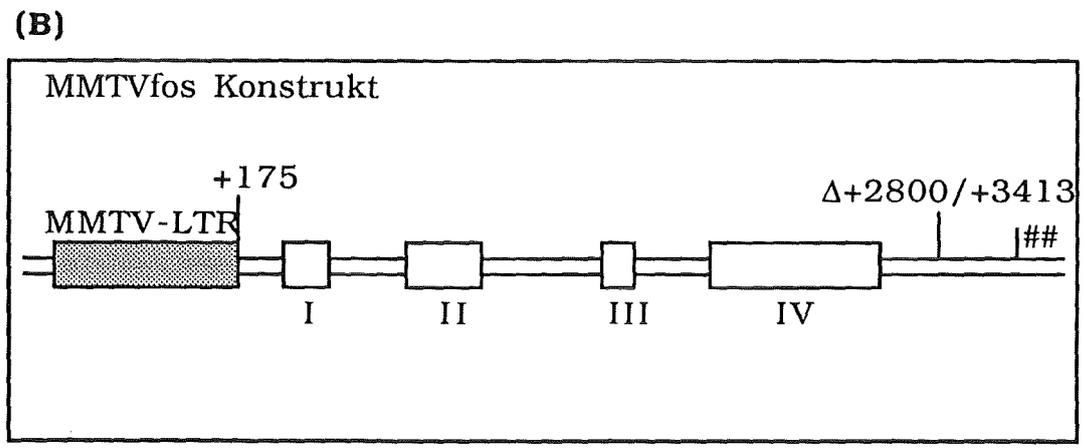
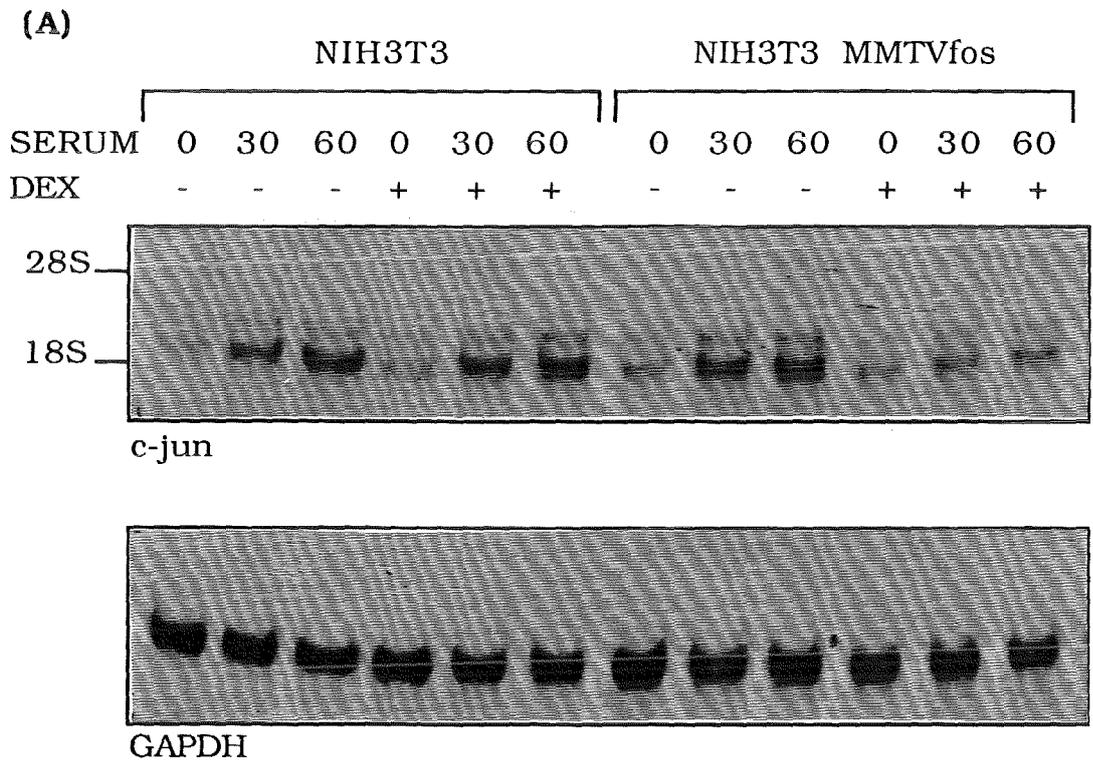


Abb 3: (A) Die Seruminduktion des c-jun Gens wird durch Fos-Protein unterbunden. Je 2.5×10^6 NIH3T3 Zellen bzw. NIH3T3 Zellen, die stabil mit MMTVfos transfiziert worden waren (das Konstrukt ist in (B) schematisch dargestellt), wurden 56 Stunden in DMEM/0,5% FCS gehungert. Dann wurden die Zellen für die angegebenen Zeit in DMEM/20% FCS inkubiert. Dexamethason (DEX, 5×10^{-7} M) wurde, wenn indiziert, 2 Stunden vor Serumbehandlung zugegeben (+). Zu den angegebenen Zeiten nach Seruminduktion wurde poly(A⁺) RNA präpariert. Je 5 µg poly(A⁺)-RNA wurde pro Bande auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Größentrennung wurde die RNA auf Hybond N⁺ Filter übertragen. Dieses Filter wurde mit einer radioaktiv markierten c-jun Probe (siehe Methoden) hybridisiert (obere Abbildung) und später mit einer GAPDH-Probe rehybridisiert (untere Abbildung). Die Zahlenangaben auf der linken Seite markieren die Stellen, an denen die 28S (4718 Nukleotide), und 18S (2237 Nukleotide) rRNAs laufen. (B) Schematische Darstellung des Konstruktes MMTVfos. Das Konstrukt enthält die vollständige Kodierungssequenz des murinen c-fos Gens (ab Position +175). Im 3' nicht translatierten Teil wurden die Sequenzen von 2800 bis 3413 deletiert. Die Expression wird vom Promotor des MMTV (Maus Mamma Tumor Virus) getrieben. I, II, III, IV: Exons des c-fos Gens; ##: Polyadenylierungssignal.

3. An- bzw. Abschaltung klonierter c-jun Promotor-Chimärengene.

Um für Repression wichtige Sequenzen zu identifizieren, analysierte ich c-jun Promotor-Chimärengene. Die Promotorsequenz des menschlichen c-jun-Gens war kloniert und teilweise sequenziert worden (Hattori et al., 1988). Die klonierten Promotorfragmente sind dann für die Identifizierung cis-wirkender Regulationselemente geeignet, wenn sie sich in ihrer Regulation nach Transfektion ähnlich dem endogenen Gen verhalten.

3.1. Induktion klonierter c-jun Promotor-Konstrukte.

Die längsten klonierten c-jun Promotorsequenzen reichen von -1600 bis +170. Sie wurden vor die kodierenden Sequenzen des bakteriellen Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) Gens kloniert, so daß die CAT-Aktivität ein Maß für die c-jun Promotoraktivität ist. Dieses Konstrukt wurde transient in NIH3T3 Zellen transfiziert und seine Induzierbarkeit durch Serum, TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) und UV ermittelt (Abb. 4).

Die stärkste Induktion erhält man mit UV. Serum induziert ebenfalls, aber wesentlich schwächer, TPA gar nicht. In weiteren Versuchen wurde daher meistens die UV-Strahlung als Induktor genommen.

Interessanterweise beeinflusst TPA-Behandlung die CAT Aktivität in NIH3T3 Zellen nicht. In Hela tk⁻-Zellen wurde aber die Induzierbarkeit durch TPA beobachtet (Stein et al., 1992; Daten nicht gezeigt).

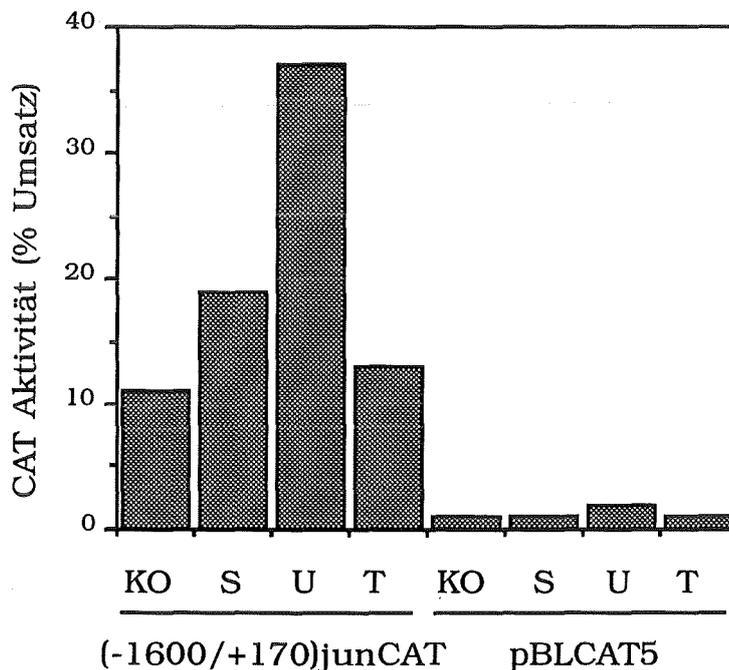


Abb. 4: Induktion des c-jun Promotors nach transienter Transfektion. Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit jeweils 2 μg Plasmid-DNA, wie angegeben, und 8 μg pSV Δ Fos (Schönthal, 1988b) als Träger-DNA transfiziert. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in DMEM/0,5% FCS weiterkultiviert. 24 h danach wurden die Zellen mit frischem DMEM/20% FCS behandelt (S) oder TPA (100 ng/ml, Endkonzentration) zugegeben (T) oder mit UV (17.1 J/m², 254 nm) bestrahlt (U). Die Zellen wurden 8 Stunden nach Induktion geerntet und die CAT-Aktivität im Proteinextrakt bestimmt. Die schematische Darstellung der verwendeten CAT-Konstrukte ist in Abb. 9 gezeigt. CAT Aktivität ist in % Umsatz von ¹⁴C-Chloramphenicol angegeben. KO: Kontrolle. Angabe: 10% Umsatz entspricht 15.0 pMol acetyliertes Chloramphenicol \times h⁻¹ \times mg⁻¹ Protein. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

3.2. Die Transkription klonierter c-jun Promotor-Konstrukte ist transient.

Um zu demonstrieren, daß die c-jun Promotor-Chimärenkonstrukte transkriptionell abgeschaltet werden, wurden "nuclear run on" Analysen mit den Zellen durchgeführt (Abb. 5), die mit dem (-1600/+170)junCAT Konstrukt (Abb. 9) stabil transfiziert worden waren. Dieses Konstrukt wurde in NIH3T3 Zellen mit pSVneo transfiziert und mit G418 haltigem Medium auf stabile Integration selektioniert. Anschließend wurden etwa 100 verschiedenen Klone als Massenkultur vereinigt.

Die basale Expression der stabil transfizierten CAT-Konstrukte ist höher als die des endogenen c-jun Gens (Der Grund dafür könnte die große Zahl von integrierten Kopien des Plasmides sein). Die Transkriptionsaktivität erreicht 15 Minuten nach Serumstimulation ein Maximum und wird anschließend rasch herunterreguliert. Die Kinetik ist ähnlich der für das endogene c-jun Gen.

Dies bedeutet, daß sowohl die für die Anschaltung als auch die für die Abschaltung benötigten Sequenzen in dem Promotorbereich von -1600 bis +170 vorhanden sind. Somit ist dieses Konstrukt für die Identifizierung der Repressionssequenz geeignet.

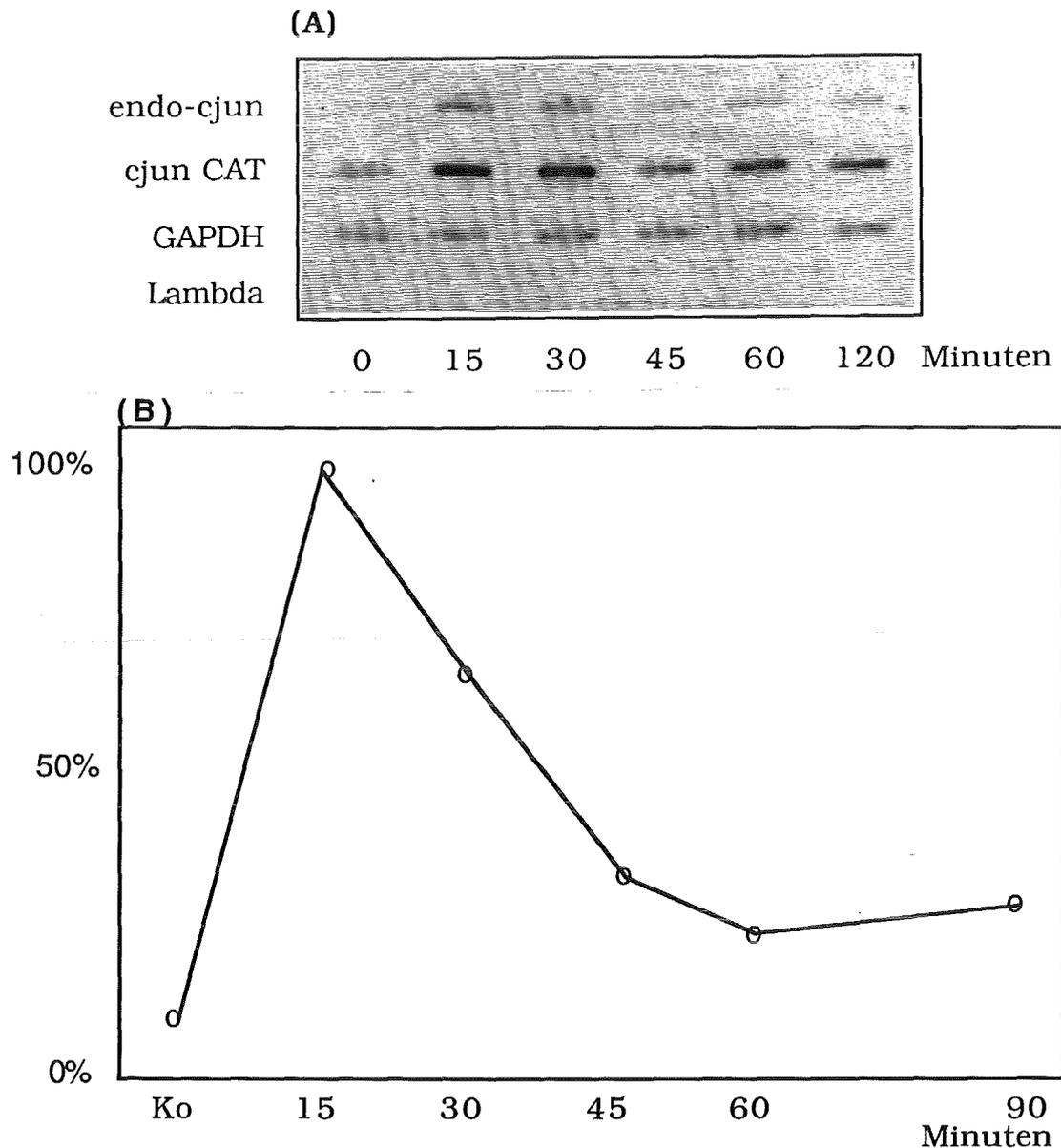


Abb. 5: Messung der Transkriptionsaktivität von c-junCAT nach Serumstimulation. (A) Je 2.5×10^6 NIH3T3 Zellen, die mit (-1600/+170)junCAT stabil transfiziert und als Massenkultur vereinigt worden waren, wurden für 50 Stunden DMEM/0,5% FCS gehungert. Anschließend wurden die Zellen mit 20% FCS-haltigem DMEM behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Kerne präpariert. Transkriptionsaktivität in den Kernen wurde, wie in Abb. 1 beschrieben, bestimmt. Die DNA-Fragmente, an die die radioaktiv markierte RNA hybridisiert wurde, sind in Abb. 1 beschrieben mit Ausnahme von cjunCAT. Das CAT-Fragment (bakterielles Chloramphenicol Acetyl Transferase Gen) war das 671 bp lange XhoI/ScaI-Fragment aus pBLCAT4. c-jun: endogenes c-jun; GAPDH: endogenes Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase Gen; Lamda: Lamda-Bakteriophagen DNA als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung. (B) Graphische Auswertung des Autoradiogrammes, das in (A) gezeigt ist. Densitometrische Messung der Autoradiographie durch Laser Densitometer (Firma: LKB BROMA), die Werte wurden auf GAPDH-Aktivität korrigiert, und dann als Prozentzahl der maximalen Aktivität (15 Minuten nach Serumstimulation) aufgetragen.

4. Welche cis-Elemente im c-jun Promotor sind für die Repression verantwortlich?

4.1. Transrepression durch Überexpression des cFos Proteins

Zur Identifizierung der cis-Elemente im jun-Promotor, die für die Repression wichtig sind, wurde zuerst festgestellt, ob die Aktivität des klonierten Promotorbereichs auch durch Fos reprimiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde das (-1600/+170)junCAT-Konstrukt zusammen mit einem Expressionsvektor kotransfiziert, der große Menge von Fos-Protein unter Kontrolle des RSV (Rous Sarcoma Virus) LTR (RSVfos) produziert. Als Kontrolle diente ein Vektor ohne c-fos-Sequenzen (pUCRSV). Die transfizierten Zellen wurden zunächst in DMEM mit 0.5% FCS gehungert und anschließend durch UV-Strahlung stimuliert. Sie wurden nach weiteren 9 Stunden geerntet und die CAT-Aktivität bestimmt (Abb. 6).

In der Kontrolle (Leervektor) wurde die Aktivität des jun CAT-Konstruktes, wie in Kapitel 3.1. beschrieben, durch UV-Strahlung deutlich erhöht. Durch Überexpression des Fos-Proteins werden sowohl die Basalaktivität als auch die induzierte Aktivität auf 30% reprimiert. Das junCAT-Konstrukt, in dem die jun Promotorsequenzen von -18 bis +170 reichen, und der Leervektor (pBLCAT5) ohne jede jun Sequenzen sind dagegen nicht mehr durch Fos reprimierbar. Der Effekt ist daher spezifisch für den jun-Promotor.

Promotor-CAT Konstrukte, die durch Fos aktiviert werden sollen (5xTRECAT, SV40CAT, RSVCAT) (Lucibello et al., 1988; Lee et al., 1987), wurden in Parallelexperiment auch tatsächlich durch Fos vermehrt exprimiert (Abb. 6B für 5xTRE CAT; Abb. 7 für SV40CAT; Abb. 10 für RSVCAT).

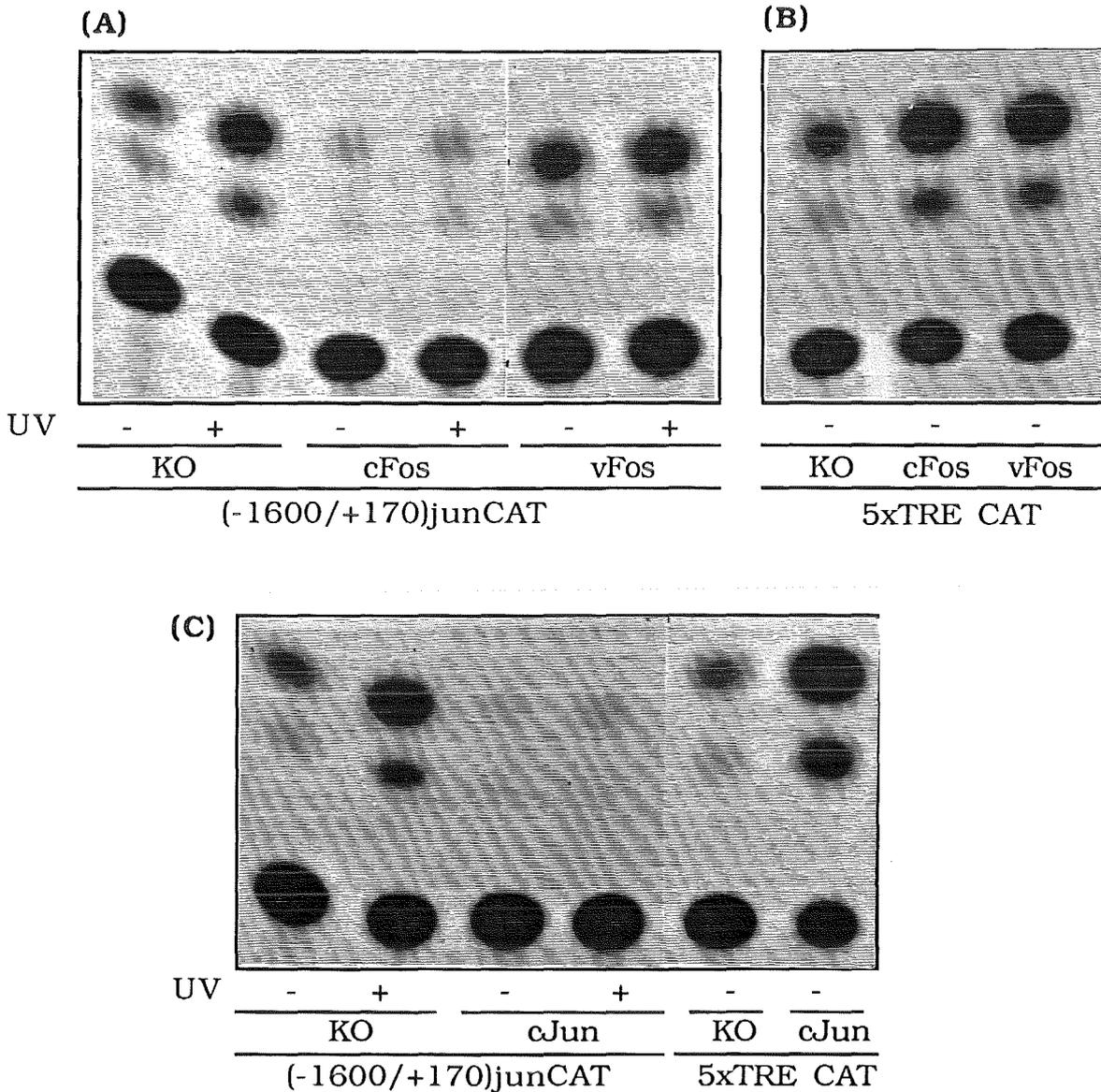


Abb. 6: cJun bzw. cFos reprimieren den c-jun Promotor. Jeweils 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden in 10cm Petrischalen nach der Kalziumphosphat-Methode mit je $2 \mu\text{g}$ (-1600/+170)junCAT bzw. $2 \mu\text{g}$ 5xTRECAT und $2 \mu\text{g}$ des (Proto-) Onkogen-exprimierenden Plasmids (cFos, vFos und cJun) transfiziert. Mit dem Trägerplasmid ($6 \mu\text{g}$ pSV Δ Fos) (Schönthal et al., 1988b) wurde jeder Ansatz auf $10 \mu\text{g}$ DNA ergänzt. Als Kontrollplasmid (KO) diente $2 \mu\text{g}$ pUCRSV Plasmid (Angel et al., 1988b). 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in DMEM/0,5% FCS weiterkultiviert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und, wenn angegeben, anschließend mit UV (17.1 J/m^2) bestrahlt (+) und in DMEM/0,5% FCS weiterkultiviert. 9 Stunden danach wurden die Zellen geerntet, Proteine extrahiert und CAT-Aktivität gemessen. 5xTRE CAT ist identisch mit 5x(-73/-65) Coll tkCAT-Konstrukt, bei dem Collagenase-Sequenzen von den Positionen -73 bis -65 5 mal vor dem tk Promotor inseriert sind (Angel et al., 1987). Die Expression der (Proto-) Onkogene erfolgt vom RSV (Rous Sarkom Virus) Promotor aus (RSVc-jun; Angel et al., 1989, RSVc-fos; Offringer et al., 1990, RSVv-fos; Jenuwein und Müller, 1987). Alle Transfektionen wurden mehrfach (mehr als dreimal) wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Die Repression des jun-Promotors wurde auch mit drei anderen Fos-Expressionsvektoren erreicht:

(1) Kotransfektion des jun Promotor CAT-Konstruktes mit einem fos-Gen unter der Kontrolle des FBR Maus Sarkom Virus LTR (E300, Lucibello et al., 1988) hemmt ebenfalls die junCAT-Expression (Abb. 14). In diesem Fall diente der Vektor (pRΔXneo), der nur das neo-Protein exprimiert, als Kontrolle. (2) Durch den Einsatz eines Fos-Expressionsplasmids (pSVfos), bei dem der regulierende Bereich der Fos-Expression durch den SV40-Promotor ersetzt ist, konnte in Kotransfektionsexperimenten ebenfalls die Repression der junCAT-Aktivität erreicht werden (Abb. 7A). Auch in Zellen, die mit MMTVfos stabil transfiziert worden waren, resultierte die hormoninduzierte fos Expression in einer Reduktion der junCAT-Aktivität (Daten nicht gezeigt). In normalen NIH3T3 Zellen beeinflusst das Hormon Dexamethason allein die junCAT-Aktivität nicht. Diese Unabhängigkeit von Expressionsplasmid deutet darauf hin, daß nur das Fos-Protein für die Repression relevant ist.

Überexpression von vFos Protein kann den c-fos-Promotor nicht reprimieren (Lucibello et al., 1989; Sassone-Corsi et al., 1988b; Ofir et al., 1990). Wenn der Repressionsmechanismus für das c-jun Gen ähnlich dem des c-fos Gens ist, sollte vFos ebenfalls keine Repression zeigen. Dies ist tatsächlich der Fall. Abb. 6A zeigt für das vFos-Protein keine Reprimierbarkeit des cjun-Promotors, unter Bedingungen, unter denen das cFos Protein voll reprimiert. Die beiden cFos und vFos Proteine aktivieren aber, wie erwartet, das 5xTRE CAT-Konstrukt ca. 5 bis 6 fach (Abb. 6B).

Die Überexpression des Fos-Proteins führt zu einer verminderten cjunCAT-Aktivität, sowohl in Serum- als auch UV-behandelten Zellen (Abb. 6A, Abb. 10A). Dies läßt vermuten, daß der cFos-vermittelte Repressionsmechanismus in beiden Fällen, unabhängig vom Induktor, gleich ist.

4.2. Autorepression durch Überexpression des cJun Proteins

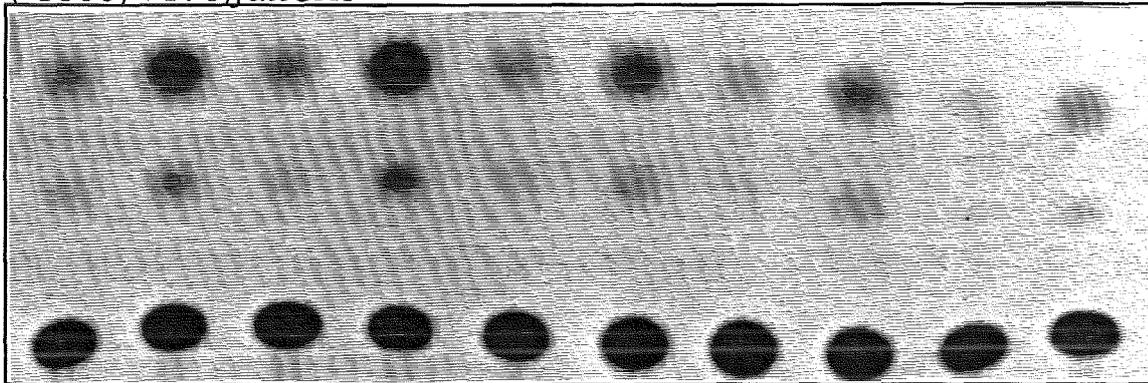
Das Jun-Protein bildet zusammen mit dem Fos-Protein (oder anderen Proteinen aus der Fos-Familie) den Transkriptionsfaktor AP1, der an spezifische DNA-Erkennungssequenzen bindet und dann zur Aktivierung der entsprechenden Gene, z. B. der Kollagenase, führt (Schönthal et al., 1988b; Chiu et al., 1988; Genz et al., 1989). Es wurde daher getestet, ob Jun auch zusammen mit Fos, seinen eigenen Promotor abschalten kann. Transiente Kotransfektionsexperimente zeigen, daß dies tatsächlich der Fall ist (Abb. 6C). Die c-jun-Expressionsvektoren, pSVjun oder pRSVjun, reprimieren ebenfalls die Aktivität des junCAT-Konstruktes in NIH3T3-Zellen (Abb. 7B; Abb. 6C). Unter den selben Bedingungen induziert das cJun-Protein die 5xTRE CAT-Aktivität (Abb. 6C). Dieses Experiment zeigt, daß die Expression des c-jun Promotors durch Rückkopplung autoreprimiert wird und daß für diese Abschaltung des c-jun Promotors sowohl Fos- als auch Jun-Protein eine Rolle spielen.

Das Jun-Protein reprimiert ebenfalls sowohl Serum- als auch UV-induzierte Aktivität des c-jun Promotors. Die Jun bzw. Fos vermittelte Trans-Repression ist nicht nur auf NIH3T3 Zellen beschränkt, sondern wurde auch in Hela-Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, daß die Überexpression des cJun-Proteins in nicht stimulierten Zellen die Basalaktivität des c-jun Promotors reprimiert, deutet darauf hin, daß nur neusynthetisiertes Jun-Protein reprimieren kann.

Die Repression des c-jun Promotors ist wie erwartet abhängig von der Menge an Fos und Jun. Dies wurde gezeigt, indem verschiedene Mengen des cFos-Expressionsplamids (pSVfos) jeweils mit 2 µg des Reporterplasmids kotransfiziert wurden und die Aktivität des Reporterplasmides ermittelt wurde (Abb. 7A). Mit steigenden Mengen des transfizierten Fos-Expressionsplasmides sollte mehr Fos in der Zelle produziert werden. Dies wurde parallel durch die konzentrationsabhängige Induktion des SV40 CAT Konstruktes (Lee et al., 1987) demonstriert (Abb. 7A). Sowohl die basale als auch die durch UV induzierte Aktivität des junCAT-Konstruktes wurde durch steigende Menge der pSVfos Plasmid-DNA (zwischen 4 bis 8 µg) zunehmend reprimiert.

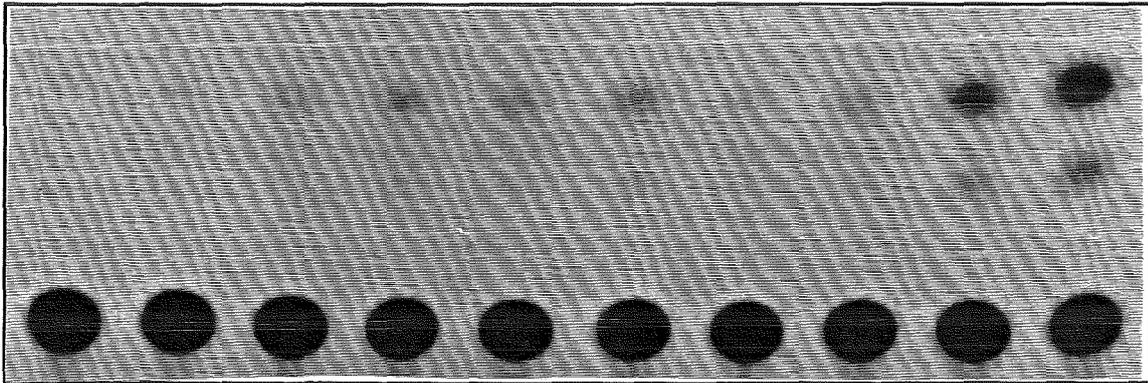
Die Repression des c-jun Promotors ist ebenfalls von der kotransfizierten Menge eines pSVjun-Plasmides abhängig (Abb. 7B), d. h. die Basalaktivität und die UV induzierte Promotoraktivität wird von kotransfiziertem pSVjun Expressionsplasmid mit steigenden Mengen zunehmend unterdrückt. Vergleichbare Konzentrationsabhängigkeit wurde auch mit pRSVjun Plasmid erhalten (Daten nicht gezeigt).

(A)
(-1600/+170)junCAT



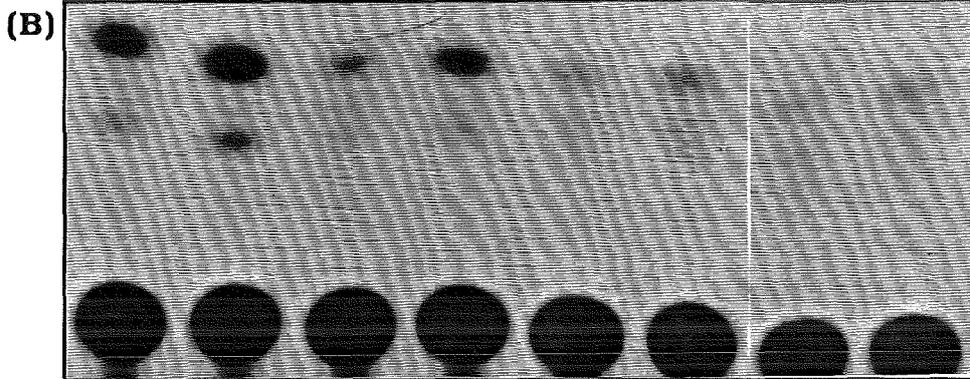
UV - + - + - + - + - +
0 1 2 4 8
μg pSVfos

SV 40 CAT



UV - + - + - + - + - +
0 1 2 4 8
μg pSVfos

(-1600/+170)junCAT



UV - + - + - + - +
0 1 2 4
μg pSVjun

Abb. 7: Konzentrationsabhängigkeit der Repression des c-jun Promotors durch Fos und Jun. (A) Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit 2 μg (-1600/+170) junCAT bzw. 2 μg SV40CAT und steigenden Mengen an pSVfos Plasmid in parallelen Ansätzen nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Mit dem Trägerplasmid pSV Δ fos wurde jeder Ansatz auf 10 μg DNA ergänzt. Die Zellen wurden, wo angegeben, mit UV (17.1 J/m^2) bestrahlt. SV40CAT: CAT Gen unter Kontrolle des Simian Virus 40 Promotor (Gorman et al., 1982b). (B) Statt mit pSVfos, wie in (A), wurde mit pSVc-jun kotransfiziert.

5. fos oder jun "anti sense" Sequenzen erhöhen die junCAT-Aktivität.

Da die Basalaktivität des c-jun Promotors durch Neusynthese von Fos und Jun reduziert wird, könnte das Verhindern von Neusynthese die Repression aufheben. Dies wurde durch "anti-sense" Experimente geprüft. Bei diesen Experimenten werden RNA-Sequenzen in der Zelle exprimiert, die der mRNA des Ziel-Gens komplementär sind. Sie binden dann an die mRNA und verhindern die Synthese des Proteins (siehe schematische Darstellung in Abb. 8B). Das Plasmid pSVsof enthält solche Sequenzen, die die Synthese von Fos-Protein blockieren (Schönthal et al., 1988b). Das junCAT-Konstrukt (-1600/+170)junCAT wurde mit pSVsof in NIH3T3 Zellen kotransfiziert und anschließend mit Serum stimuliert. Das Resultat ist in Abb. 8A dargestellt. In den Zellen, in die ein Kontrollplasmid (pKSV10) kotransfiziert wurde, zeigte sich eine erhöhte CAT-Aktivität nach Serum-Behandlung. Die Expression der sof Sequenz führt zu einer weiteren Erhöhung der junCAT Aktivität in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß das neusynthetisierte Fos an der Repression des jun Promotors beteiligt ist. Die Aktivität des Leervektors (pBLCAT5) wurde dadurch nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Resultate wurden auch mit "anti sense"-jun Konstrukte (pSVnuj) erhalten (Daten nicht gezeigt).

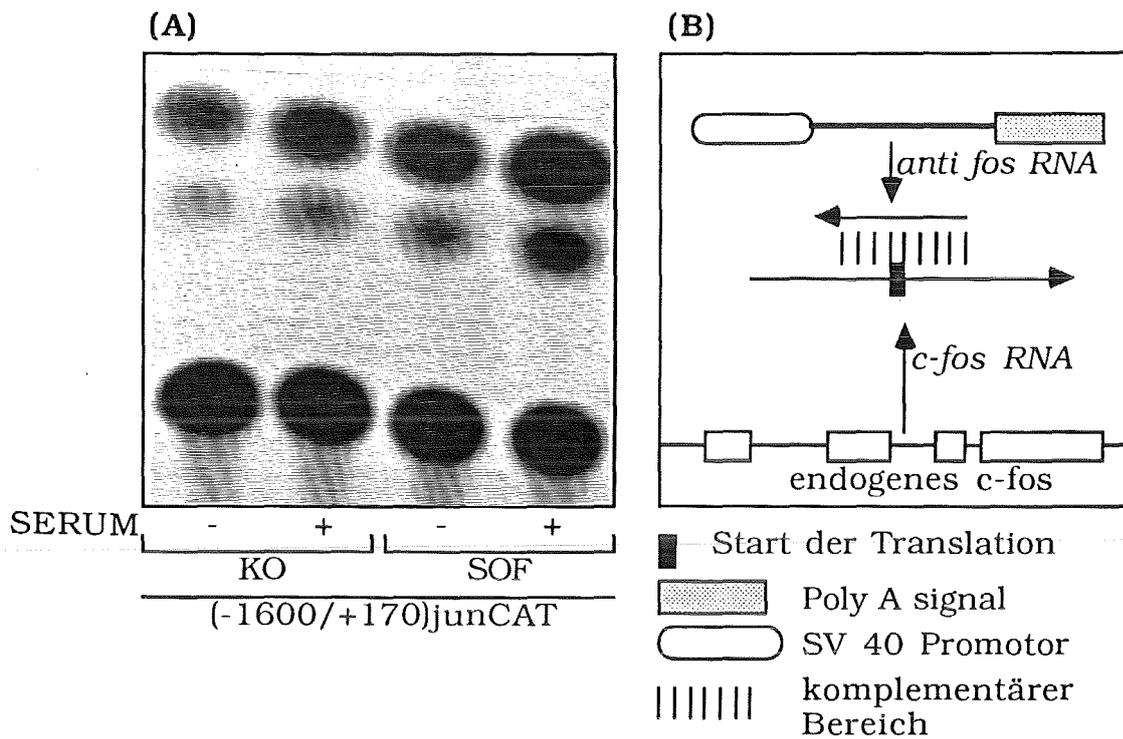


Abb. 8: "anti-sense" fos-Sequenzen aktivieren den c-jun-Promotor. (A) Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ (-1600/+170)junCAT und $10 \mu\text{g}$ pSVsof Plasmid (SOF) (Schönthal et al., 1988b) oder $10 \mu\text{g}$ pKSV10 (Schönthal et al., 1988b) zur Kontrolle (KO) transfiziert. 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium durch DMEM/0.5% FCS ersetzt. Weitere 24 Stunden danach wurden die Zellen, wo angegeben, mit DMEM/20% FCS stimuliert. 9 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität im Proteinextrakt bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. (B) Schematische Darstellung der Wirkung der "anti-sense" Sequenzen. Fos-"anti-sense" Sequenzen (ab Position +175 bis +292; Schönthal et al., 1988b) werden unter Kontrolle des SV40 Promotors synthetisiert.

Sowohl die Expression des endogenes c-jun Gens als auch die der klonierten Promotorsequenz wird durch UV-Bestrahlung bzw. Serum-Behandlung schnell angeschaltet und nachfolgend abgeschaltet. Fos verhindert die Seruminduktion des endogenen c-jun Gens. Die Aktivität klonierter c-jun Promotor-Sequenzen wird ebenfalls durch Fos aber auch durch Jun reprimiert. Die Intensität der Repression hängt von der Menge an kotransfiziertem Expressionsplasmid ab.

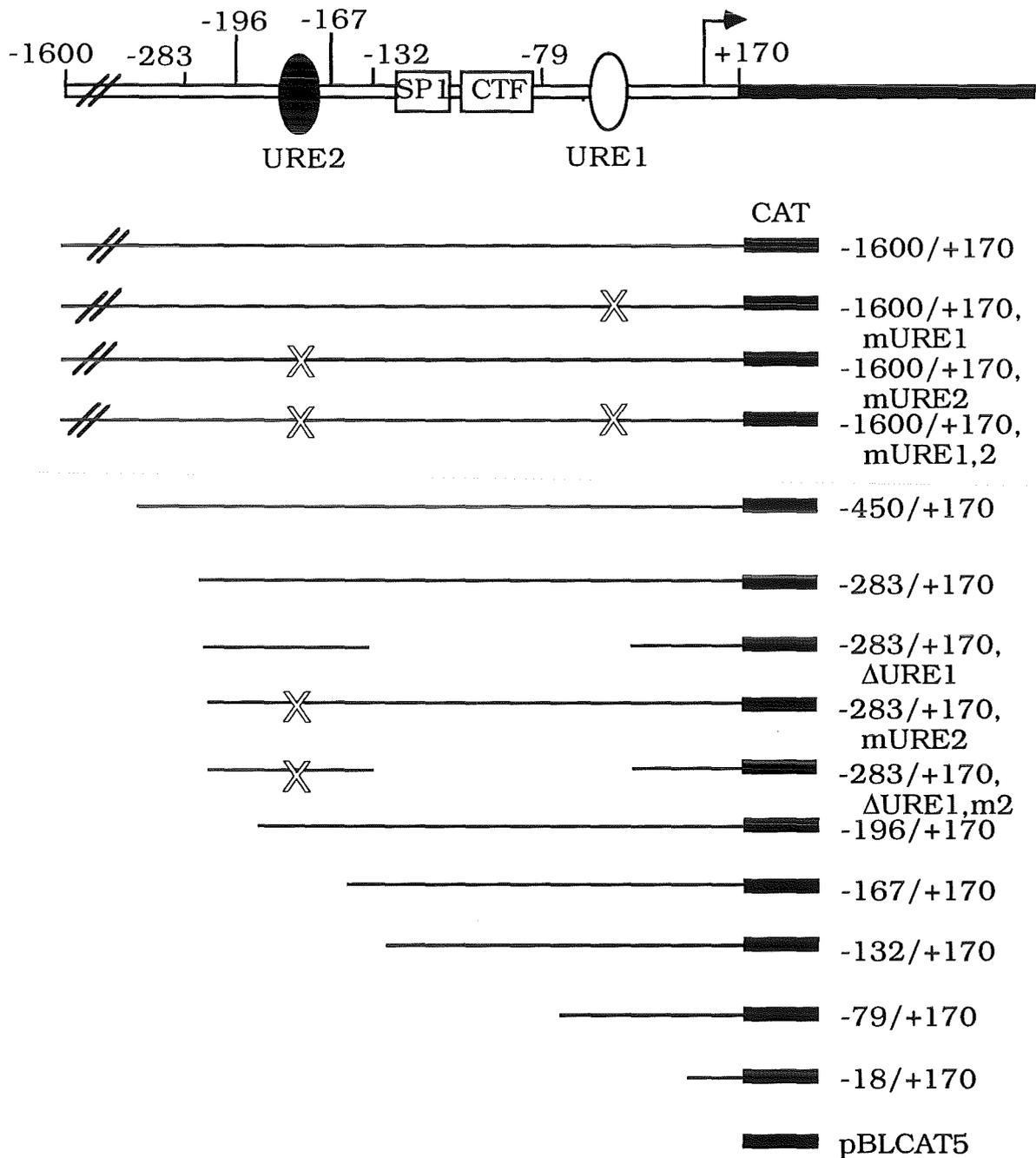


Abb. 9: Schematische Darstellung der chimären c-jun Promotor-CAT-Gene. Verschiedene Abschnitte des c-jun Promotors mit der Startstelle der Transkription (+1) wurden in pBLCAT5 kloniert (genauere Beschreibung: Stein et al., 1992; Angel et al., 1988b; siehe Material und Methoden in dieser Arbeit). Ein schematischer Aufbau des c-jun Promotors mit einigen wichtigen DNA-Elementen ist gezeigt. Die kodierende Region für CAT ist durch eine schwarze dicke Linie gezeigt. Die Kreuze repräsentieren Punktmutationen im URE1 bzw. URE2. URE: "UV Response Element"; SP1: SP1 Bindestelle; CTF: CTF Bindestelle.

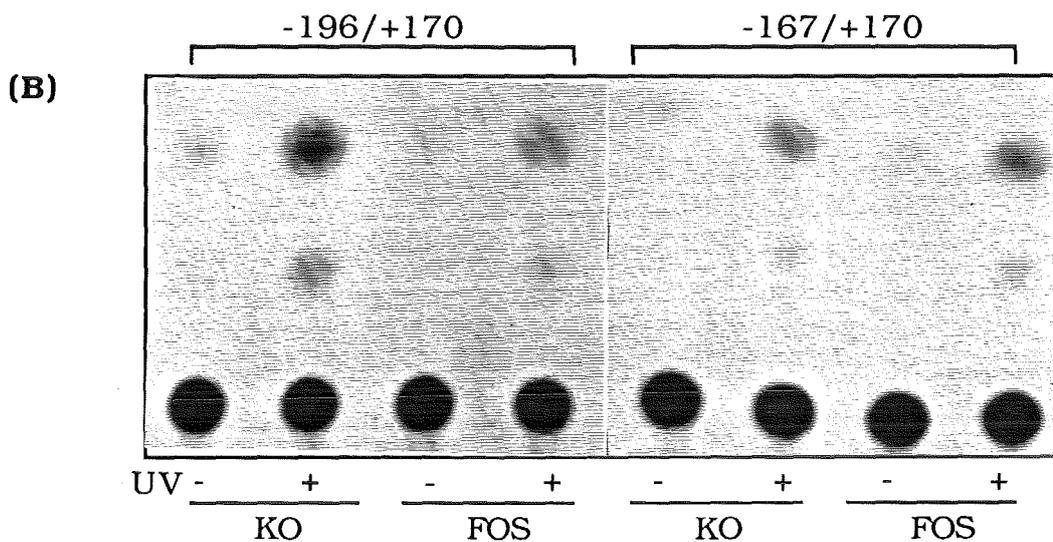
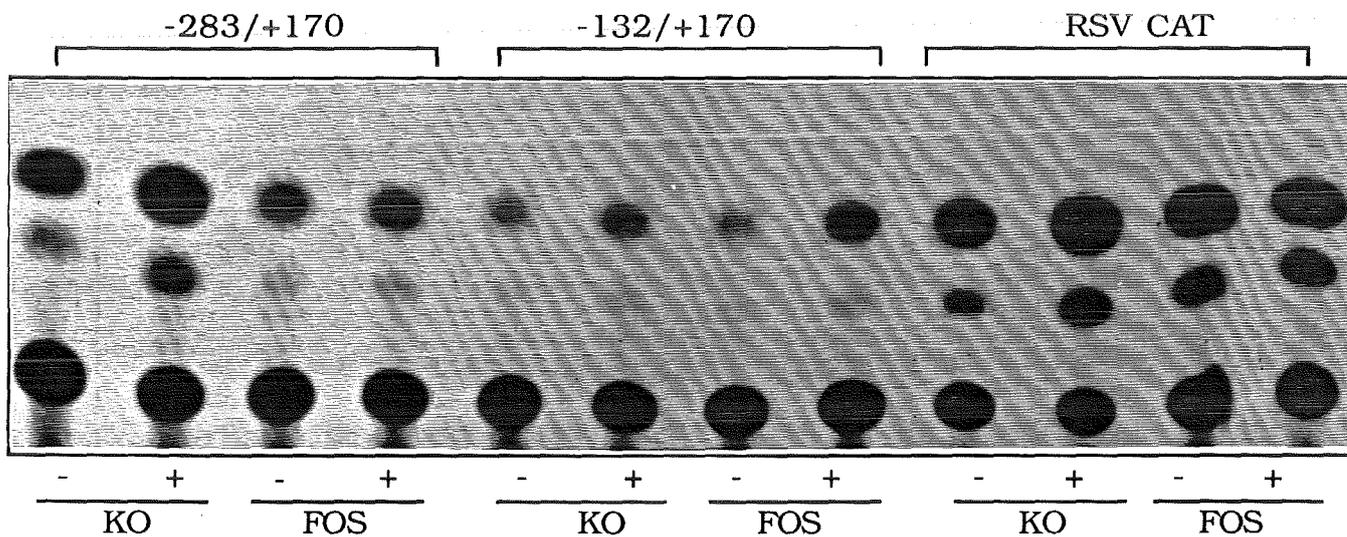
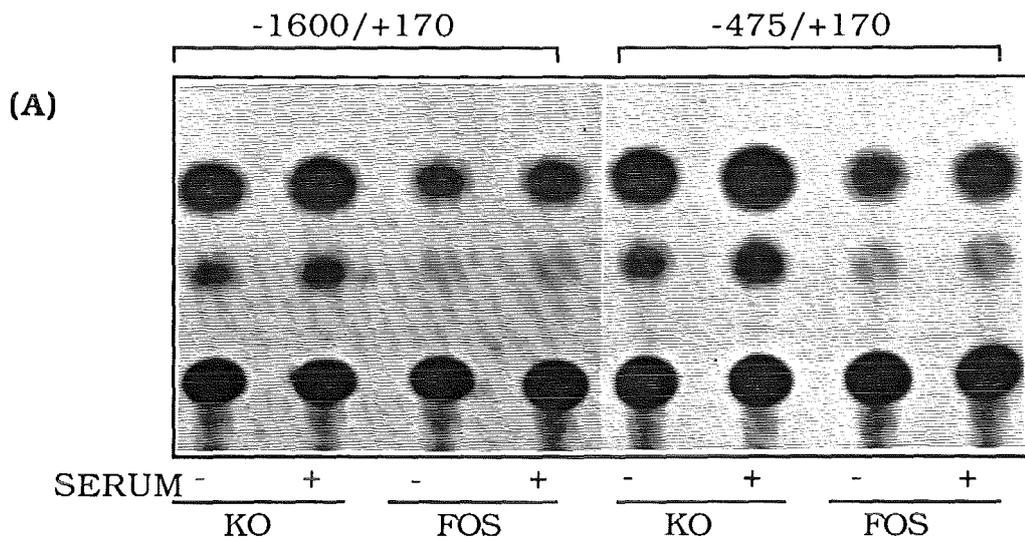


Abb. 10: Sequenzen zwischen Positionen -196 und -167 vermitteln die Repression des c-jun Promotors. (A) Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit je 2 μg der angegebenen cjunCAT-Deletionsmutanten und 8 μg pSVfos Plasmid nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (FOS). 8 μg pSV Δ fos Plasmid wurden als Kontrolle mit den c-jun Promotor-Konstrukten transfiziert (KO). 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 24 Stunden in DMEM/0.5% FCS weiterkultiviert. Sie wurden dann, wo angegeben, mit DMEM/20% FCS behandelt (+). 9 Stunden danach wurden die Zellen geerntet und CAT-Aktivität bestimmt. RSV CAT: CAT Gen unter Kontrolle der Rous Sarkom Virus LTR (Gorman et al., 1982a). (B) Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit 2 μg des jeweils angegebenen c-jun Promotor-CAT-Konstrukts transfiziert und, wo indiziert, mit UV (17.1 J/m^2) bestrahlt (+). Weitere Behandlung dieser Zellen erfolgt wie in (A) beschrieben. KO: Kontrolle. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

6. Identifizierung des NREs ("negative responsive element") im jun-Promotor.

Zur Identifizierung von DNA-Sequenzmotiven, die für die Fos/Jun vermittelten Repression des menschlichen c-jun Gens wichtig sind, wurden Deletionsmutanten bzw. Punktmutanten im klonierten c-jun Promotor konstruiert. Diese Mutanten wurden dann in den NIH3T3-Zellen zusammen mit einem Expressionsvektor, von dem aus das cFos- oder cJun-Protein exprimiert wird, kotransfiziert und auf ihre Reprimierbarkeit analysiert.

6.1. Das NRE ist zwischen Position -196 und -167 lokalisiert.

Zunächst wurden Deletionsmutanten analysiert. Verschiedene 5' Deletionen des humanen c-jun Promotors (-1600, -450, -283, -196, -167, -132 sowie -79 jeweils bis +170) wurden in pBLCAT5 inseriert (schematische Darstellung in Abb. 9). Die jeweiligen CAT-Konstrukte wurden mit pSVfos Plasmid in NIH3T3 Zellen transient kotransfiziert und die Promotor-Aktivität durch Bestimmung der CAT-Aktivität ermittelt (Abb. 10).

Die Konstrukte (1600/+170)junCAT, (-450/+170)junCAT, (-283/+170)junCAT sowie (-196/+170)junCAT waren durch Fos in ähnlichem Maße hemmbar (Abb. 10). D. h. die zwischen diesen Positionen liegenden ca. 1300 bp enthalten kein DNA-Element, das für die Repression notwendig ist.

Die Konstrukte (-167/+170)junCAT, (-132/+170)junCAT und (-79/+170)junCAT waren dagegen nicht mehr hemmbar (Abb. 10). D. h. bei weiterer Verkürzung des 5' flankierenden Bereiches von -196 bis zur Position -167 ging die Reprimierbarkeit verloren. Der Vektor pBLCAT5 und das "Rous Sarcoma Virus" Promotor CAT-Konstrukt (RSVCAT) wurden durch Überexpression von Fos nicht beeinflusst.

Dies bedeutet, daß die für die Repression verantwortlichen Sequenzen zwischen den Positionen -196 und -167 liegen.

6.2. Mutationen im URE2 verhindern die Fos-vermittelte Repression.

In dem DNA-Abschnitt -196 bis -167 liegt ein Element, das für die UV-Induzierbarkeit verantwortlich ist (Stein et al., 1992): das URE2, zwischen Position -191 bis -180. Dieses Element ähnelt einer AP1 Bindestelle und könnte somit Fos und Jun binden. Ich habe getestet, ob diese Sequenz an der Repression des jun Promotors beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde eine Mutation im URE2 eingeführt und seine Konsequenz auf die Reprimierbarkeit getestet (Abb. 11).

Die Sequenz ATTACCTCATCC wurde gegen TGGACCTCGAGC ausgetauscht. Die mutierte Sequenz sollte keinen Transkriptionsfaktor binden. Die Mutante (-1600/+170,mURE2)junCAT zeigte sehr niedrige Basalaktivität, die durch Fos nicht mehr weiter reprimierbar ist (Abb. 11).

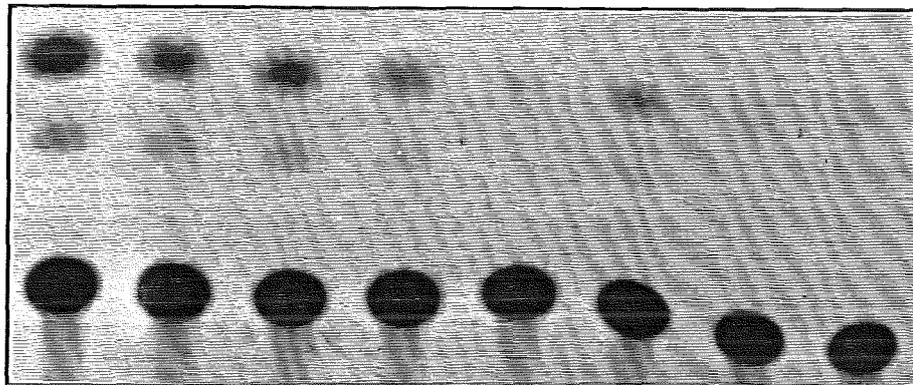
Interessanterweise wurde die Aktivität dieser Konstruktes (-1600/+170,mURE2)junCAT sogar durch Fos erhöht. Diese Erhöhung der Aktivität durch Fos könnte über die URE1-Sequenz erfolgen, da eine zusätzliche Mutation im URE1 keine solche Erhöhung zeigt (Abb. 11).

Neben dem URE2 spielt das URE1 (GTGACATCAT: -72/-63) des c-jun Promotors auch bei der UV-Induktion eine Rolle (Stein et al., 1992). Diese Sequenzen ähneln dem TRE der Kollagenase und dem CRE (auf cyclisches AMP reagierender Enhancer) des Fibronectin-Gens. Weiterhin wurde gezeigt, daß das Element in F9 Teratokarzinomazellen Transaktivierung durch Jun vermittelt (Angel et al., 1988b). Wenn die Repression spezifisch über das URE2 abläuft, sollte eine Mutation im URE1 für die Repression keine Rolle spielen. Um dies auszutesten, wurde nur das URE1 mutiert (Austausch GTGACATCAT gegen GATCCACCAT). Das Konstrukt (-1600/+170,mURE1)junCAT zeigt eine minimale Verringerung der Basalaktivität und tatsächlich immer noch Repression durch Fos (Abb. 11).

Die Doppelmutante (-1600/+170,mURE1,2)junCAT zeigt sehr niedrige Basalaktivität. Sie wurde durch die Überexpression des Fos Proteins nicht mehr beeinflusst.

Vergleichbare Resultate wurden mit kürzeren c-jun Promotor-Konstrukten und den entsprechenden Mutanten erhalten ((-283/+170)junCAT, (-283/+170,mURE2)junCAT, (-283/+170, Δ URE1)junCAT bzw. (-283/+170, Δ URE1,m2)junCAT) (Daten nicht gezeigt).

Es ist daher wahrscheinlich, daß Sequenzen, die für die Fos-vermittelte Repression des c-jun Promotors benötigt werden, im URE2 lokalisiert sind.



KO	FOS	KO	FOS	KO	FOS	KO	FOS
A		B		C		D	
A: -1600/+170				C: -1600/+170,mURE2			
B: -1600/+170,mURE1				D: -1600/+170,mURE1,2			

Abb. 11: Repression des c-jun Promotors erfolgt durch das URE2. Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ der angegebenen cjunCAT-Konstrukte und $8 \mu\text{g}$ pSVfos Plasmid transfiziert (FOS). Als Kontrolle wurde das junCAT Plasmid mit $8 \mu\text{g}$ pSV Δ fos transfiziert (KO). 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in DMEM/0.5% FCS weiterkultiviert. 30 Stunden danach wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität wurde bestimmt. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Die verwendeten CAT-Konstrukte sind in Abb. 9 schematisch dargestellt.

6.2.1. Serum- bzw. UV-vermittelte Autorepression durch Jun erfolgt ebenfalls über das URE2.

Um zu überprüfen, ob die Jun-vermittelte Repression des c-jun Promotors auch durch die URE2-Sequenzen vermittelt wird, wurden die entsprechende Reporter-genkonstrukte zusammen mit cJun-Expressionsplasmid kotransfiziert und die Zellen anschließend entweder mit 20% Serum behandelt oder UV bestrahlt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Abb. 12).

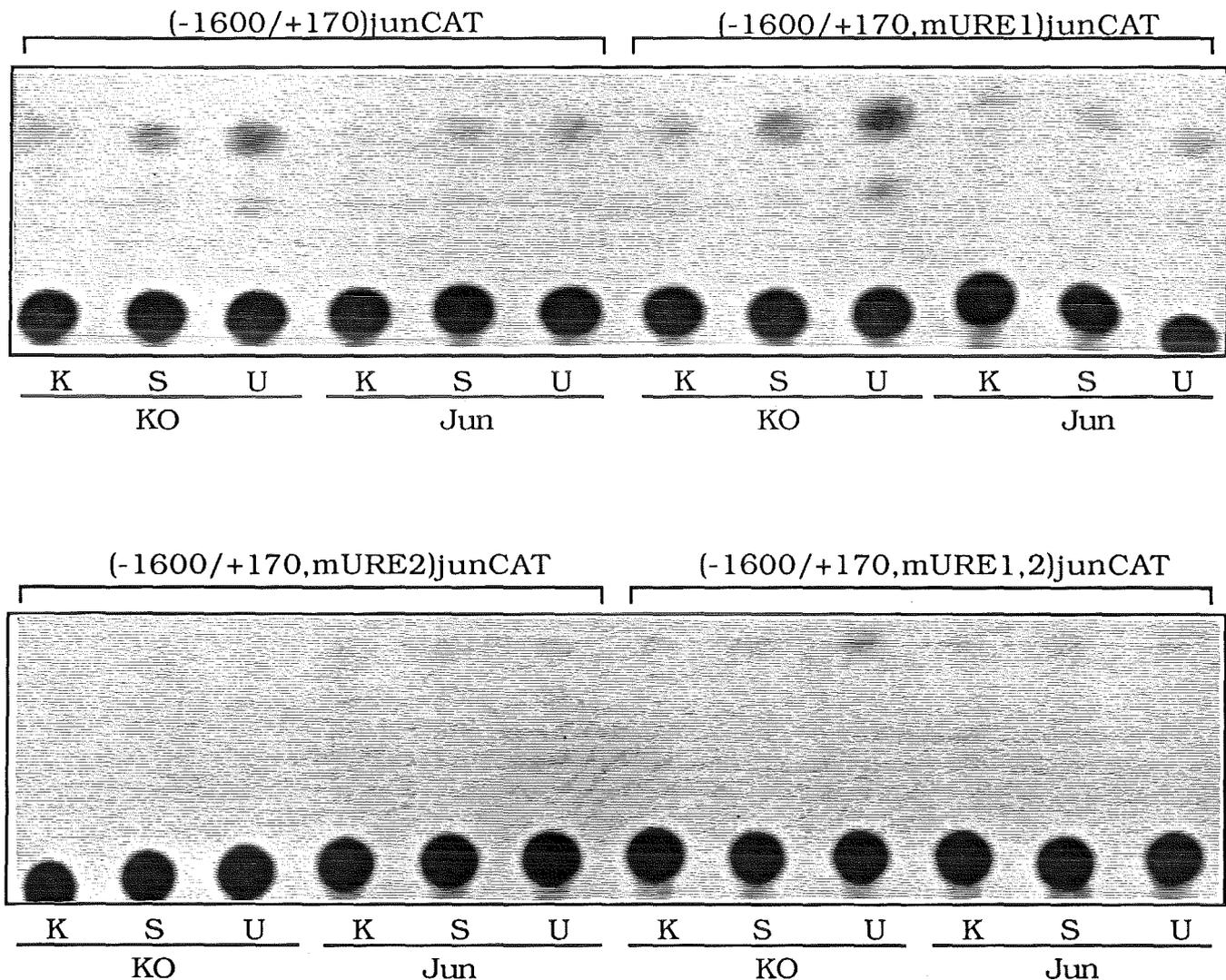


Abb. 12: Repression der Induktion durch Serum und UV ist abhängig vom URE2. Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit den angegebenen Indikatorkonstrukten ($2 \mu\text{g}$) und dem pSVc-jun-Expressionsplasmid ($8 \mu\text{g}$) (Jun) oder dem Kontrollplasmid pSV ($8 \mu\text{g}$) (KO) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem DMEM/0,5% FCS für 24 Stunden weiterkultiviert. Dann wurden sie entweder mit DMEM/20% FCS behandelt (S) oder mit UV (17.1 J/m^2) bestrahlt (U). Für die Kontrolle (K) wurde nur Medium gewechselt. Nach 9 Stunden wurden die Zellen geerntet und in Proteinextrakten die CAT-Aktivität bestimmt. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Wie in Kapitel 4 beschrieben, wurde die Serum- bzw. UV-induzierte Aktivität des c-junCAT-Konstrukts durch Überexpression des cJun Proteins reprimiert. Die Serum- bzw. UV-induzierte Aktivität des (-1600/+170,mURE2)junCAT-Konstruktes wurde aber durch Überexpression des Jun-Proteins nicht reprimiert sondern im Gegenteil sogar erhöht. Dies deutet darauf hin, daß der Hauptanteil der Jun-vermittelten Autorepression auch über das URE2 abläuft und die URE2 vermittelte Induktion des c-jun Promotors blockiert. Weiterhin scheint die Bindung eines Faktors am URE2 sowohl für die Induktion (Stein et al., 1992) als auch für die Autorepression notwendig zu sein.

Ähnlich wie für Fos sind Mutanten im URE1 des c-jun Promotors auch durch Jun Protein noch reprimierbar. Das Konstrukt mit einer Punktmutation im URE1 (-1600/+170,mURE1) verhielt sich ähnlich wie das (-1600/+170)junCAT-Konstrukt. Es wird durch UV-Strahlung bzw. durch Serum induziert und voll durch Jun reprimiert (Abb. 12), was bedeutet, daß das URE1 bei der Repression keine Rolle spielt.

Die Doppelmutante (-1600/+170)junCAT wurde durch Jun nicht beeinflußt.

6.3. Ein isoliertes URE2 vermittelt Hemmung durch Fos bzw. Jun.

Um zu prüfen, ob die URE2 Sequenz allein, ohne andere DNA-Sequenzen, für die beobachtete Hemmung durch Fos ausreicht, wurde ein Minimalkonstrukt synthetisiert, in dem die URE2-Sequenz (ATTACCTCATCC) vor den Promotor des Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Gens (HSVtk) eingesetzt wurde (Abb. 13A). Der Promotor enthält die Sequenzen von Position -105 bis +51 des HSVtk (Luckow und Schütz, 1987). In dem Promotor befinden sich einige Transkriptionsfaktorbindestellen, die die Basalaktivität in eukaryontischen Zellen vermitteln. Der Promotor zeigt keine

Induzierbarkeit und wurde schon häufig und erfolgreich (z. B. GREtk ("Glucocorticoid Responsive Element" tk) oder TREtk) als heterologer Promotor zum Austesten induzierbarer DNS-Abschnitte verwendet.

Das URE2 tkCAT-Konstrukt zeigte hohe Basalaktivität, UV-Induzierbarkeit und wird tatsächlich durch Fos reprimiert. (Abb. 13B), ähnlich dem Wildtyp (-1600/+170)junCAT-Konstrukt. Die Aktivität des URE2 wurde ebenfalls durch Überexpression des Jun-Proteins reprimiert (Daten nicht gezeigt). Dagegen verhielt sich das URE1 tkCAT-Konstrukt anders: Es hatte niedrige Basalaktivität, war durch UV nicht so stark wie das URE2 tkCAT Konstrukt induzierbar und die Überexpression von Fos führt zu keiner Repression sondern sogar zu einer Aktivierung des Promotors. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, daß ein verkürztes jun Promotorkonstrukt ohne URE2 durch Überexpression von Jun aktiviert wird (Angel et al., 1988b). Das Kontroll-Plasmid tkCAT wurde durch das Fos-Protein nicht beeinflusst.

Das Resultat dieser Untersuchungen ist also, daß die Repression der UV-Induzierbarkeit des c-jun Promotors durch das URE2 vermittelt wird, daß das URE2 für die Repression des c-jun-Promotors ausreichend ist und keine andere Sequenzen dafür notwendig sind.

Somit ist es gelungen, die cis-wirkende Sequenz zu identifizieren, die für die Fos/Jun-vermittelte Repression des cjun-Promotors verantwortlich ist. Es ist die URE2 Sequenz (ATTACCTCATCC), die sich zwischen -180 und -191 im Promotorbereich des c-jun Gens befindet. Das URE2 vermittelt zusammen mit dem URE1 sowohl die UV- bzw. Seruminduktion als auch, alleine, die Repression durch Fos/Jun.

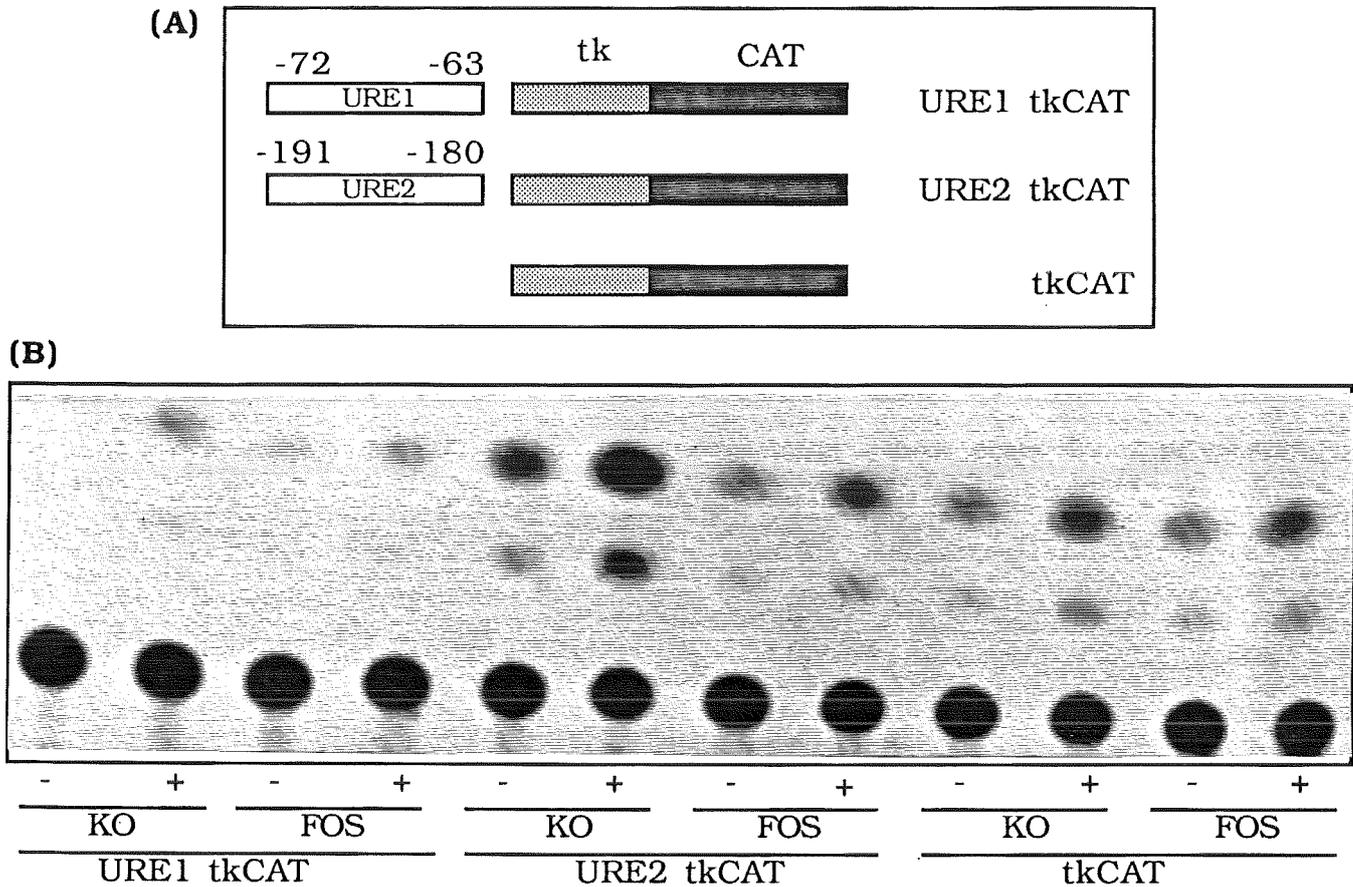


Abb. 13: Das URE2 ist ausreichend für die Repression durch Fos. (A) Schematische Darstellung der in (B) verwendeten Plasmide. tkCAT ist identisch mit pBLCAT4 (Jonat, et al., 1990). URE1 tkCAT, URE2tkCAT: Das URE1 (-72 GTGACATCAT -63) oder das URE2 (-191 ATTACCTCATCC -180) der c-jun Promotorsequenz wurde in die Polyklonierungsstelle der pBLCAT4 inseriert (Stein et al., 1992). (B) Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit je $2 \mu\text{g}$ der angegebenen CAT-Konstrukten und $8 \mu\text{g}$ pSVfos Plasmid transfiziert (FOS). Transfektion mit $8 \mu\text{g}$ pSV Δ fos Plasmid-DNA und DNA der entsprechenden CAT-Konstrukte diente dabei als Kontrolle (KO). Die weitere Behandlung der Zellen erfolgt wie in Abb. 6 beschrieben. 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in DMEM/0.5% FCS weiterkultiviert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und UV (17.1 J/m^2) bestrahlt (+). 9 Stunden danach wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität im Proteinextrakt bestimmt. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

7. Identifizierung der reprimierenden Domäne von Fos bzw. Jun.

Nachdem ich im ersten Teil meiner Arbeit die DNA-Elemente identifiziert und charakterisiert habe, die am Mechanismus der Abschaltung der Promotoraktivität des c-jun Gens beteiligt sind, beschäftige ich mich nun mit den strukturellen Voraussetzungen der Proteine, die diese Abschaltung bewirken, nämlich des cFos- und des cJun-Proteins. Beide können als Transkriptionsfaktor wirken, indem sie ein Heterodimer (Jun/Fos) bilden. Jun alleine kann ein Homodimer bilden und dann auch als Transkriptionsfaktor wirken. Für die Dimerisierung ist eine spezifische Aminosäurestruktur, der Leuzin-Zipper, verantwortlich. Für die DNA-Bindung wird die Dimerisierung benötigt, der Leuzin-Zipper ist also unentbehrlich. Darüber hinaus bedarf es aber eines unmittelbar davorliegenden Proteinabschnittes, nämlich der basischen Domäne (siehe Einleitung). Außerdem wurde eine Transaktivierungsdomäne von Jun im N-Terminus (Angel et al., 1989) und im Fall von Fos im C-Terminus (Gebel, 1992) identifiziert. Die Funktion dieser Strukturen in der Repression wurde getestet.

Verschiedene Mutanten des fos- bzw. jun-Gens wurden vor den RSV-Promotor kloniert und nach Transfektion exprimiert. Da die Aktivität des RSV-Promotors in NIH3T3-Zellen sehr stark ist, wurde nur 1 bis 2 µg des jeweiligen Expressionsplasmids mit 2 µg des CAT-Konstruktes kotransfiziert. Als Reporterplasmid diente jeweils das Konstrukt (-1600/+170)junCAT, welches alle für die Repression und für die Induktion (z. B. durch UV oder Serum) benötigten Sequenzen besitzt (Kapitel 3.1., 4.1. und 4.2.). Der Effekt von Fos bzw. Jun auf die Hemmung der Induktion durch UV-Bestrahlung wurde gemessen.

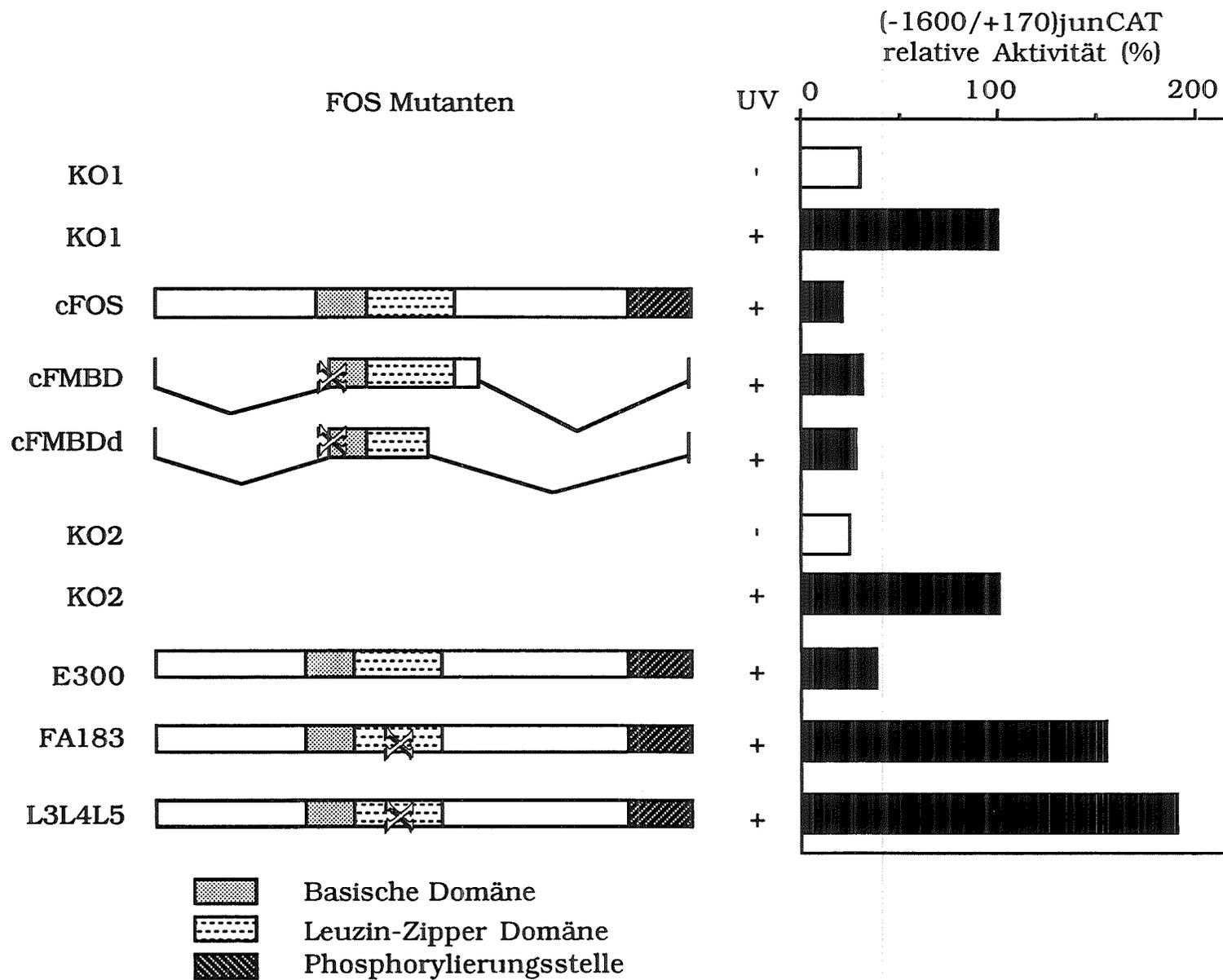


Abb. 14: Die Leuzin-Zipper Domäne des cFos Proteins ist für die Transrepression des c-jun-Promotors notwendig und ausreichend. Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ (-1600/+170)junCAT, $2 \mu\text{g}$ der jeweils angegebenen Expressionsplasmide und $6 \mu\text{g}$ pSV Δ Fos als Trägerplasmid transfiziert. Der Leervektor (pUCRSV) (KO) war Kontrolle für die c-fos-Mutanten, p Δ Xneo für die E300-Mutanten. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Abb. 6 beschrieben. Die Zellen wurden, wo angegeben, mit UV (17.1 J/m^2) behandelt (+). Die UV-induzierte Aktivität in Gegenwart des Leervektors wurde jeweils 100% gesetzt. Sie entspricht für pUCRSV 32.1% Umsatz von ^{14}C -Chloramphenicol und für p Δ Xneo 24.7% Umsatz. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte gezeigt. Dabei sind die Bereiche der DNA-Bindedomäne, der Leuzin-Zipper Domäne und der Phosphorylierungsstelle im C-terminalen Ende gekennzeichnet. Die Kreuze symbolisieren die Mutationen in der Leuzin-Zipper Domäne oder in der DNA-Bindedomäne. KO1: Kontrolle für cFos-Mutanten; KO2: Kontrolle für E300-Mutanten. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

7.1. Die Leuzin-Zipper Domäne des Fos Proteins ist notwendig und ausreichend für die Repression des c-jun-Promotors.

Das Resultat, daß sowohl cFos als auch cJun an der Repression des c-jun Promotors beteiligt sind, deutet darauf hin, daß eine gemeinsame Funktion der beiden z. B. durch DNA-Bindung als Heterodimer (Fos/Jun) für die Repression notwendig sein könnte. Dafür könnte auch sprechen, daß sich im URE2-Bereich eine der AP1 Bindestelle ähnliche Konsensussequenzen befindet und das Fos- bzw. Jun-Protein möglicherweise an diese Sequenzen binden (Stein et al., 1992). Daher stellte ich zunächst die Frage, ob die Bindung des Fos-Proteins an die DNA für die Repression erforderlich ist.

Um dies auszutesten, wurde das Konstrukt, cFMBD, von P. Angel im Institut für Genetik in Karlsruhe zur Verfügung gestellt, auf seine Repressionseigenschaft getestet. cFMBD enthält eine intakte Leuzin-Zipper Domäne aber eine mutierte basische Domäne und bindet daher nicht an DNA, bildet aber noch Heterodimere. Es enthält auch keine Transaktivierungsdomäne. Wenn DNA-Bindung für Repression notwendig wäre, sollte dieses Konstrukt keine Repression zeigen. Dies war aber nicht der Fall: Das Konstrukt zeigte

volle Repression (Abb. 14). Das Resultat demonstriert deutlich, daß die Repression nur durch die Leuzin-Zipper Domäne ohne DNA-Bindung vermittelt wird und auch keine Transaktivierungsdomäne benötigt wird.

Wenn nur die Leuzin-Zipper Domäne für die Repression notwendig wäre, sollte eine Mutation im Leuzin-Zipper keine Repression zeigen. In den Mutanten FA183 bzw. L3L4L5, die von M. Schuermann, Marburg, zur Verfügung gestellt wurden, ist nur die Leuzin-Zipper Domäne des Fos-Proteins zerstört. Die Mutanten bilden kein Heterodimer mit Jun und binden nicht mehr an DNA (Schuermann et al., 1989; Neuberg et al., 1989). Kotransfektion dieser Konstrukte mit dem c-junCAT-Reportergen führte tatsächlich zu keine Repression der Induktion durch UV. Es wurde, im Gegenteil, eine schwache Aktivierung (1.6 fach) beobachtet. Kontrolle mit dem Wildtyp-Konstrukt (E300) zeigte dagegen volle Repression (Abb. 14).

Mutationen in der Leuzin-Zipper Domäne (FA183 und L3L4L5) zerstören die Repressionsfähigkeit, während die Mutante (cFMBD), die nur die Leuzin-Zipper Domäne trägt, volle Repression zeigt. Aus diesen Daten könnte geschlossen werden, daß die Fähigkeit zur Dimerbildung das ausschlaggebende Kriterium darstellt. Da Fos kein Homodimer bilden kann, ist nun die nächste Frage, ob die Heterodimerbildungsfähigkeit mit Jun für die Repression erforderlich ist. Es gibt eine Mutante (cFMBDD), die nur Teile der Leuzin Zipper-Domäne (drei Leuzine von insgesamt fünf) trägt und mit Jun keine Heterodimere bilden kann (P. Angel, persönliche Mitteilung). Dieses Konstrukt zeigt aber ebenfalls Repression des c-jun Promotors, genauso wie das Wildtyp cFos und cFMBD-Konstrukt (Abb. 14). Dies deutet darauf hin, daß nur ein Teil der Leuzin-Zipper Domäne von Fos für die Repression benötigt wird und daß Dimerbildung mit cJun keine Voraussetzung ist.

7.2. Die Leuzin-Zipper Domäne des cJun Proteins ist auch ausreichend für die Autorepression des c-jun Promotors.

Eine Reihe von Jun-Mutanten wurden zur Identifizierung der im Jun benötigten Domäne für die Repression herangezogen.

Das retrovirale Jun (vJun) stellt eine natürliche Mutante dar (Maki et al., 1987; Nishimura und Vogt, 1988). Dem vJun fehlt ein kurzes Stück (δ -Region, 27 Aminosäuren) der transaktivierenden Domäne (N-Terminus) von cJun (Bos et al., 1988; Bos et al., 1989). Dieser Anteil wurde als eine negativ wirkende Funktion charakterisiert (Baichwal und Tjian, 1990). Wenn dieser Anteil ebenfalls an der Repression des c-jun Promotors beteiligt ist, sollte vJun keine Repression zeigen. Dies war aber nicht der Fall. Wie cJun zeigt das vJun ebenfalls Repression (Abb. 15). Zwischen cJun und vJun befinden sich keine Unterschiede in der Repressionsfähigkeit des c-jun Promotors. Die Sequenzen, die für die Repression verantwortlich sind, müssen daher im C-Terminus der beiden Proteine lokalisiert sein.

Um dies zu überprüfen, wurde die Mutante, die den C-Terminus enthält aber in der N-Terminus (transaktivierende Domäne) deletiert ist (vJd1/119), durch Kotransfektionsversuche analysiert. Wie erwartet zeigt diese Mutante volle Repression des c-jun-Promotors, ähnlich dem Wildtyp Jun (Abb. 15). Der C-Terminus des Jun-Proteins ist also für die Repression ausreichend.

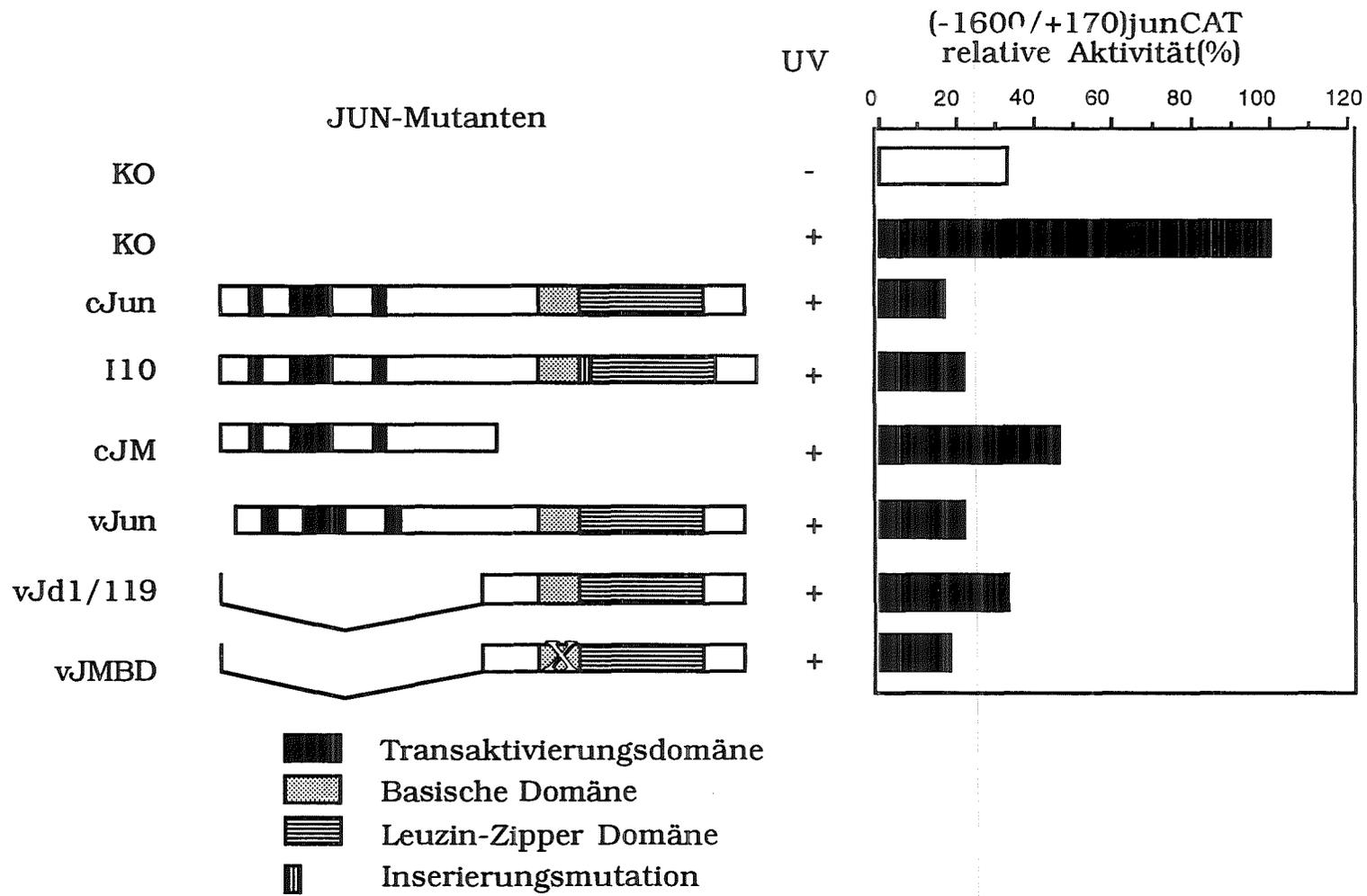


Abb. 15: Die Leuzin-Zipper Domäne des cJun Proteins ist für die Autorepression des c-jun Promotors ausreichend. 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit 2 μg (-1600/+170)junCAT und jeweils 2 μg Expressionsplasmid und 6 μg pSV Δ Fos als Träger-DNA transfiziert. Als Kontrolle für die Jun-Mutanten diente dabei das Plasmid pUCRSV. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie in Abb. 6 beschrieben. Die Zellen wurden, wo angegeben, mit UV (17.1 J/m^2) behandelt (+). Die UV-induzierte Aktivität in Gegenwart des Leervektors wurde jeweils als 100% gesetzt. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der verwendeten Mutanten gezeigt. Dabei sind die Bereiche der Transaktivierungsdomäne, der DNA-Bindedomäne und Leuzin-Zipper Domäne gekennzeichnet. Das Kreuz symbolisiert eine Mutation in der DNA-Bindedomäne. KO: Kontrolle (pUCRSV-Plasmid). Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Wenn der N-terminale Bereich des cJun Proteins an der Repression nicht beteiligt ist, sollte eine "Frame Shift"-Mutante (cJM), die nur den N-terminale Bereich enthält, nicht mehr reprimieren. Kotransfektionsexperimente der Mutante mit dem c-junCAT-Reporterplasmid zeigen aber auch für diese Mutante Repressionseigenschaften (Abb. 15). Dies könnte auf "Squelching" zurückzuführen sein (Levine und Manley, 1989), der Kompetition einer Aktivierungsdomäne um Bindung eines Koaktivators (Gill und Ptashne, 1988). Dafür spricht, daß die Mutante auch 5xTRE CAT-Aktivität reprimiert (Angel et al., 1989; Daten nicht gezeigt).

Ich stellte nun die Frage, ob DNA-Bindung des Jun-Proteins für die Repression notwendig ist. Die DNA-Bindemutante (I10) wurde so konstruiert, daß einige Aminosäuren zwischen der basischen und der Leuzin-Zipper Domäne inseriert wurden. Das mutierte Protein bindet nicht an DNA (Smeal et al., 1989). Die I10 Mutante zeigte aber volle Repression des c-jun-Promotors (Abb. 15). Dies deutet darauf hin, daß wie im Falle von Fos die DNA-Bindung des cJun-Proteins keine Voraussetzung für die Autorepression ist, sondern wie für Fos gezeigt, nur die Leuzin-Zipper Domäne für die Repression benötigt wird. Um dies zu testen, wurde eine Mutante (vJMBD), in der die basische Domäne weiter mutiert ist, aber in der die Leuzin-Zipper Domäne noch intakt ist, getestet. Wie erwartet zeigt vJMBD volle Repression des cjun Promotors (Abb. 15).

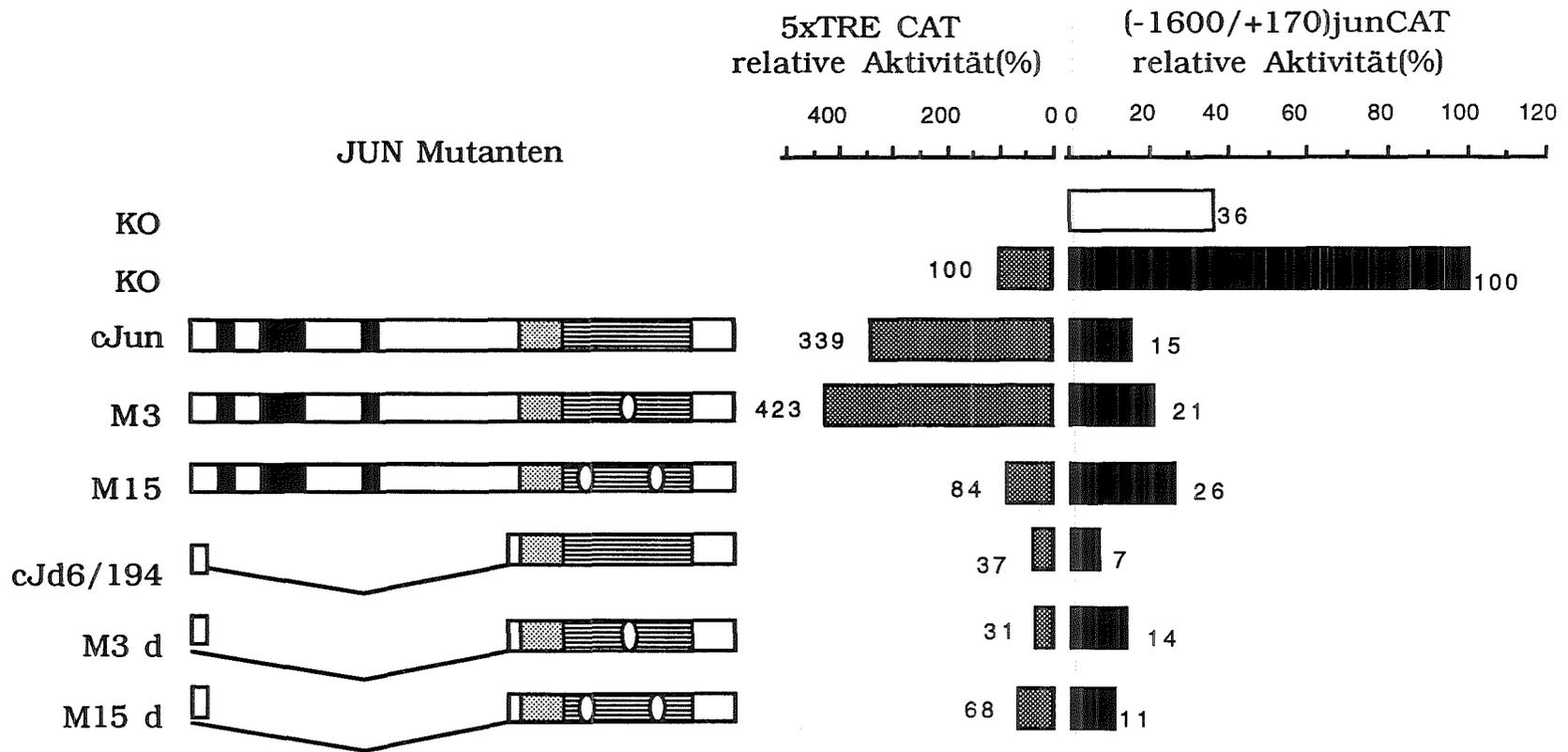


Abb. 16: Jun/Jun-Homodimerbildung und Jun/Fos-Heterodimerbildung ist für die Repression nicht erforderlich. Je 8×10^5 NIH3T3 Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ 5xTRE CAT oder $2 \mu\text{g}$ (-1600/+170)junCAT und $2 \mu\text{g}$ des jeweils angegebenen Expressionsplasmids transfiziert. $6 \mu\text{g}$ pUC18-DNA wurde als Trägerplasmid verwendet. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie in Abb. 6 beschrieben. Die Zellen, die mit junCAT-Konstrukt transfiziert worden waren, wurden mit UV (17.1 J/m^2) behandelt (schwarze Säule) oder, als Kontrolle, nicht behandelt (weiße Säule). Die relative CAT-Aktivität wurde wie in der vorhergehende Abbildung angegeben. Mit dem 5xTRECAT-Konstrukt wurde nur Basalaktivität gemessen. Die 5xTRECAT-Aktivität in Gegenwart des Leervektors wurde jeweils als 100% gesetzt. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte gezeigt. Dabei sind die Bereiche der Transaktivierungsdomäne, der DNA-Bindedomäne und der Leuzin-Zipper Domäne gekennzeichnet. Die geschlossenen Kreise symbolisieren eine Punktmutation (Austausch einer Aminosäure) in der Leuzin-Zipper Domäne. KO: Kontrolle. Gezeigt sind die Werte eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

Dies macht wahrscheinlich, daß die Leuzin-Zipper Domäne von Jun alleine für die Repression verantwortlich ist. Der Mechanismus könnte über Homodimerbildung vermitteln sein oder aber Heterodimerbildung benötigen, wobei Fos als Partner ausgeschlossen ist (siehe Kapitel 7.1.).

In Ergänzung zu der Fos-Mutante cFMBDD, die die Repression zeigt aber keine Heterodimere mit Jun bildet, kann eine Jun-Mutante, die mit Fos keine Heterodimere wohl aber Homodimere bilden kann, ebenfalls noch die c-jun Promotoraktivität reprimieren (Abb. 16; mit der Mutante M3, Smeal et al., 1989). Um den Beitrag der Transaktivierungsdomäne auszuschließen ("Squelching", siehe vorhergehendes Kapitel), wurde die Mutante M3d mit eine Deletion des N-Terminus konstruiert. Diese Mutante zeigt, wie erwartet, keine Induktion des 5xTRE CAT-Konstruktes, war aber noch voll aktiv in der Repression des c-jun Promotors (Abb. 16).

Mit der Mutante M15 (Smeal et al., 1989) liegt ein Konstrukt vor, in dem die Leuzin-Zipper Sequenz, die für Homodimerbildung verantwortlich ist, selektiv zerstört ist und die Mutante nur Heterodimere bilden kann. Überraschenderweise kann auch diese Mutante noch reprimieren (Abb. 16). Auch für diese Mutante

wurde ein "Sequelching"-Mechanismus ausgeschlossen, indem der N-Terminus deletiert wurde (M15d) und mit dieser neuen Mutante vergleichbare Repression beobachtet wurde (Abb. 16).

Die Experimente zur Identifizierung der an der Repression des c-jun Promotors beteiligten Domänen von Fos bzw. Jun führen zu folgenden Ergebnisse: Von beiden Proteine wird jeweils nur die Leuzin-Zipper Domäne für die Repression benötigt. DNA-Bindung (die Basische Domäne) bzw. Heterodimerbildung für beiden Proteine sind aber an der Repression nicht beteiligt. Für Jun wurde gezeigt, daß auch Homodimerbildung für die Repression nicht benötigt ist.

DISKUSSION

Eine Vielzahl von Agenzien, wie UV-Strahlung, Serum und Phobolester, führen zu einer unmittelbaren Anschaltung der Transkription des Protoonkogens c-jun. Das Produkt des c-jun Gens ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP1 (die zweite Untereinheit ist das Produkt des Protoonkogens c-fos). Der Transkriptionsfaktor AP1 ist dann für die Transkription einer Reihe von Genen verantwortlich, die letztlich die genetische Antwort auf die Wirkung der verschiedenen Agenzien darstellen. Damit die Zellen wieder neue Signale empfangen können und darauf reagieren können, müssen sie auf den "Ausgangs"-Zustand zurückkehren. Für das c-jun Gen bedeutet das, daß die transkriptionelle Aktivierung des Promotors nur transient ist und nach kurzer Zeit wieder reprimiert wird. Da die Lebenszeit der c-jun mRNA und des cJun-Proteins relativ gering ist (Halbwertszeiten von wenigen Stunden), verarmen die Zellen rasch wieder am cJun-Protein und können wieder restimuliert werden.

Für die Repression der Promotoraktivität des c-jun Gens ist Neusynthese von Protein notwendig. In Anwesenheit von Proteinsynthesehemmern, wie z. B. Cycloheximid oder Anisomycin, findet eine drastische Akkumulation von c-jun mRNA Transkripten statt. Dies bedeutet aber auch, daß für die Stimulation des c-jun Promotors *de novo* Proteinsynthese nicht benötigt wird und bereits präformierte Transkriptionsfaktoren das c-jun Gen induzieren.

Interessanterweise ist die Halbwertszeit des Lebensdauer der c-jun mRNA in Anwesenheit von Proteinsynthesehemmer verlängert (3-4 Stunden im Vergleich zu 0.5-1 Stunden in Abwesenheit von Proteinsynthesehemmern) (Lamph et al., 1988; Quantin und Breathnach, 1988; Ryseck et al., 1988). Weiterhin führt die Blockierung der Protein-Synthese durch Anisomycin zu einer "Superinduktion" der Transkription nach TPA- bzw. EGF- ("epidermal growth factor") Behandlung (König, 1992; Edwards und Mahadevan, 1992). Diese Befunde schließen aus, daß die

Transkriptionsabschaltung durch Degradation eines aktivierten Transkriptionsfaktors, der an den c-jun Promotor bindet, bewirkt wird.

Ich konnte zeigen, daß das c-jun Genprodukt selbst oder das dem c-Jun ähnliche, koinduzierte c-fos Genprodukt für die Abschaltung des c-jun Promotors verantwortlich ist. Mehrere Befunde unterstützen diese Behauptung: (1) Ein c-jun Promotor CAT-Konstrukt wird induziert, wenn die Synthese des endogenen Jun- bzw. Fos-Proteins durch eine "antisense"-Sequenz blockiert wird (Kapitel 5). (2) Die Aktivität eines c-jun CAT-Konstruktes wird reprimiert, wenn das Jun-Protein bzw. das Fos-Protein überexprimiert wird (Abb. 6). Diese Resultate wurden sowohl in stimulierten Zellen als auch in gehungerten Zellen gefunden, was bedeutet, daß für die Repression keine durch Wachstumsfaktoren vermittelten Modifikationen notwendig sind. (3) Die Serumvermittelte Induktion des endogenen c-jun Gens wird gehemmt, wenn ein stabil transfiziertes MMTVfos Plasmid durch Dexamethason angeschaltet wird (Abb. 3).

Die Induktion des c-jun Promotors durch UV bzw. TPA erfolgt durch zwei cis-wirkende DNA-Elemente im c-jun Promotor, dem URE1 und URE2 (Stein et al., 1992). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das URE2 auch ein seruminduzierbares Enhancer-Element darstellt (Abb. 12). Das URE2 gehört damit zu einer Gruppe von seruminduzierbaren Enhancern, zu der auch das SRE des c-fos Gens (Treisman et al., 1986; Büscher et al., 1988) und das TRE des Kollagenase Gens (Imler et al., 1988; Wasylyk et al., 1988) gehören. Die Aktivierung des URE2 könnte durch Erhöhung der Bindungsaffinität eines Aktivatorproteins zum URE2 erfolgen. Dies wird durch den Befund wahrscheinlich, daß in der Gel-Retardationsanalyse am URE2 in Extrakten aus UV-behandelte Zellen im Vergleich zu Extrakten aus nicht behandelten Zellen mehr Protein gebunden ist (Stein et al., 1992).

Das URE2 vermittelt auch nahezu die gesamte Basalaktivität des c-jun Promotors (Abb. 11, 12 und 13; Stein et al., 1992), denn Mutationen im URE2 führen zu einer drastischen Absenkung der Basalaktivität des c-jun Promotors.

Das URE2 vermittelt nicht nur die Induktionen des c-jun Promotors, sondern ist gleichzeitig auch das Ziel-Element für die Repression durch das Fos- oder Jun-Protein. Solange das URE2 im c-jun Promotor intakt vorhanden ist, wird der Promotor voll reprimiert, während Mutationen im URE2 keine Repression zeigen. Das URE2 reicht auch in Kotransfektionsexperimenten aus, um die Transrepression nach Überexpression von Fos- oder Jun-Protein auf einen heterologen Promotor zu übertragen. Diese Repression ist spezifisch für das URE2: tkCAT-Konstrukte mit anderen Sequenzen (URE1tkCAT, 5xTREtkCAT) werden unter denselben Bedingungen nicht reprimiert (Abb. 6B, 6C, Abb. 13).

Sequenzen, die weitgehende Homologie mit den menschlichen URE2-Sequenzen (5'ATTACCTCATCC3') haben, wurden auch im cjun-Promotor verschiedener Tiere (Huhn, Ratte bzw. Maus) gefunden (Tabelle 1). Sie könnten in diesen Spezies für die Repression der c-jun Expression eine ähnliche Rolle spielen wie das URE2 im menschlichen Promotor. Interessanterweise sind die dem URE2 ähnlichen Sequenzen in den Säugertieren zu 100% konserviert und an praktisch gleicher Position im Promotor lokalisiert, während im Huhn 2 Positionen in den Sequenzen verändert sind und die Position im Promotor von der in den Säugern abweicht.

Tabelle 1

-191 ATTACCTCATCC -180	URE2 aus Mensch
-242 ATATCCTCATCC -231	cjun aus Huhn
-191 ATTACCTCATCC -180	cjun aus Ratte
-189 ATTACCTCATCC -178	cjun aus Maus

Das URE1 und das URE2 sind in ihren Sequenzen ähnlich. Trotzdem spielt das URE1 für die Repression keine Rolle. Dies bedeutet, daß die Transkriptionsfaktoren, die am URE2 und URE1 binden unterschiedlich sein müssen. Dies wurde auch durch Gelretardationsanalysen plausibel gemacht: URE2 kompetiert Bindung von Protein an das URE1 schlechter als an das URE2 und umgekehrt (Stein et al., 1992). Interessanterweise kann auch Fos und Jun an URE1 und schwach an URE2 binden, doch aus Kompetitionsexperimente muß man schließen, daß in den Zellextrakten (und daher wahrscheinlich auch in vivo) andere Transkriptionsfaktoren als AP1 an die beiden UREs binden.

Für die Repression des c-jun Gens ist die Leuzin-Zipper (LZ)-Domäne sowohl von Fos als auch von Jun ausreichend. Jun/Fos-Heterodimere bzw. Jun/Jun-Homodimere scheinen an der Repression nicht beteiligt zu sein. Dies könnte bedeuten, daß der LZ-Anteil von Jun oder Fos mit einem anderen Protein, z. B. dem am URE2 gebundenen Aktivator in Wechselwirkung tritt und ihn dadurch inaktiviert.

Die LZ-Domäne zeigt besondere Eigenschaften; (1) Eine α -helikale hydrophobe Oberfläche (O'Shea et al., 1989a): sie wird daher in wässrigen Lösung gezwungen, mit anderen hydrophoben Gruppen zu interagieren. (2) Eine amphipathische Struktur mit fünf Leuzinen, die durch jeweils 7 Aminosäuren getrennt sind. Diese Leuzine sind äußerst hydrophob und ragen weit aus dem Helix-Gerüst heraus. Auch diese Struktur könnte für eine Komplexbildung mit einem Aktivator (oder einem anderen Protein) wichtig sein.

Für die Repression werden nicht alle Leuzin-Reste benötigt. Z. B. kann die Fos-Mutante cFMBDD mit nur drei Leuzinen noch reprimieren und auch die Mutante M15d, in der das erste und dritte Leuzin mutiert sind, zeigt Repression.

Während cJun, vJun bzw. cFos den c-jun Promotor reprimieren, zeigen vFos und cMyc diese Eigenschaft nicht. vFos und cMyc (Blackwood et al., 1991) enthalten ebenfalls LZ-Domäne. Die Aminosäure-Sequenzen in den LZ-Domänen von vFos bzw. cFos unterscheiden sich nur in einer Aminosäure. Interessanterweise zeigt vFos auch keine Repression des c-fos Promotors (Ofir et al., 1990). Für die Repression muß daher der Unterschied im C-terminalen Bereich zwischen cFos und vFos (van Beveren et al., 1983) verantwortlich sein. Man könnte sich vorstellen, daß die reprimierende Funktion der LZ-Domäne des vFos-Proteins durch seinen C-terminalen Bereich maskiert ist und dadurch keine Repression zeigt.

Am URE2 bindet wahrscheinlich ein zur AP1 Familie gehörender, aber von Fos/Jun verschiedener Transkriptionsfaktor (Stein et al., 1992). Dieser Faktor könnte ebenfalls eine LZ-Domäne besitzen. Komplexbildung mit Fos oder Jun über LZ-Interaktion könnte ihn inaktivieren. Tatsächlich kann Fos oder Jun mit verschiedenen Leuzin-Zipper enthaltenden Proteinen interagieren (Cohen et al., 1989; Ryseck und Bravo, 1991; Benbrook und Jones, 1990; Macgregor et al., 1990; Hai et al., 1988; Hai und Curran, 1991; Zerial et al., 1989).

Die URE2-Sequenz weist auch Ähnlichkeit mit Sequenzen auf, die Proteine mit "Homeo"-Domänen binden (Tabelle 2). So findet sich in der URE2-Sequenz das Motiv ATTA (TAAT), das auch in fast allen Homeoprotein-Bindestelle vorhanden ist (Scott et al., 1989; Hanes und Brent, 1991).

Homeo-Domänen besitzen eine "Helix-Loop-Helix" (HLH)-Struktur (Anthony-Cahill et al., 1992; Struhl et al., 1989; Pertival-Smith et al., 1990). Es könnte daher sein, daß die Aktivierung der URE2-Aktivität durch ein positiv wirkendes, eine HLH-Struktur enthaltendes Protein erfolgt, und diese Aktivierung durch Fos bzw. Jun unterbunden wird. Daß dies möglich ist zeigt das Beispiel des MyoD-Proteins (Lassar, et al., 1989; Bengal et al., 1992). Das MyoD

ist ein eine HLH-Struktur enthaltendes Protein (Weintraub et al., 1991), das an eine dem URE2 ähnliche DNA-Sequenz (AACACCTGCT) bindet. Fos und Jun hemmen die Aktivierung von MyoD durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung (Bengal et al., 1992).

Tabelle 2

GCATTACCTCATCCC	URE2-Bereich des c-jun Gens
GGATTAC	Fushi Tarazu Bindestelle Schier und Gehring, (1992)
CCATTAC	
TCTAATCCC	Bicoid Bindestelle Driever und Nüsslein-Volhard, (1989)

Wie Fos oder Jun die Repression des c-jun Transkription über das URE2 bewirken kann derzeit noch nicht genau beantwortet werden. Für die Hemmung der URE2-Aktivität durch Fos oder Jun sind aber verschiedenen Mechanismen denkbar. (1) Konkurrenz mit einem am URE2 bindenden Faktor durch Fos- oder Jun-Protein. Dies ist nicht sehr wahrscheinlich, da die Repression ohne DNA-Bindung von Fos und Jun erfolgt (Abb. 14, 15). (2) Indirekte Repression durch Induktion eines Repressors. Dann wirken Fos und Jun als Aktivatoren des Repressors. Dieser Mechanismus ist auch ausgeschlossen, weil sowohl keine DNA-Bindung als auch keine Transaktivierungsdomäne von Fos und Jun für die Repression benötigt werden. (3) Modifikation des am URE2 bindenden Faktors durch Fos/Jun. Eine solche Enzymaktivität von Fos oder Jun wurde noch nie beschrieben und ist speziell für die Leuzin-Zipper Domäne sehr unwahrscheinlich. (4) Komplexbildung zwischen dem Fos oder Jun und einem am URE2 bindenden Faktor. Dies scheint mir der wahrscheinlichste Mechanismus.

Beispiele solcher Interaktion zwischen Repressor und Aktivator wurden in einigen anderen Fällen auch gefunden (Tabelle 3).

Tabelle 3

Repressor	Aktivator	Literatur
Id/Fos/Jun	MyoD	Benezra et al., (1990) Lassar et al., (1989) Bengal et al., (1992)
emc	Achaete-Scute	M. Barinaga (1991)
pp40	Rel Protoonkogen	Davis et al., (1991)
IP-1	Fos/Jun	Auwerx und Sassone-Corsi (1991)
Fos/Jun (GR)	Glucocorticoid Rezeptor (GR) Fos/Jun)	Jonat et al., (1990) Touray et al., (1991) Yang-Yen et al., (1990b) Schüle et al., (1990)
Retinoic Acid Rezeptor	AP1	Nicholson et al., (1990) Schüle et al., (1991)

Da die Leuzin-Zipper Domäne sowohl von Fos als auch von Jun für die Repression des c-jun Promotors notwendig sind, könnte man annehmen, daß der Komplex von Fos und Jun (AP1) für die Repression notwendig ist. Dies wird aber durch Fos- bzw. Jun-Mutanten ausgeschlossen, die sowohl Heterodimerbildung (Fos/Jun) als auch Homodimerbildung (Jun/Jun) verhindern und trotzdem reprimieren können. Es scheint daher, daß Fos- oder Jun-Protein, jedes für sich, die Repression durch Interaktion mit einem Aktivatorprotein mit seiner Leuzin-Zipper Domäne erreicht.

Alle Gene, die unmittelbar nach Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren bzw. UV-Strahlung aktiviert werden ("immediate early genes"), zeigen eine ähnliche Kinetik der Expression wie das c-jun Gen. Viele dieser Gene kodieren auch für dem Fos und Jun ähnliche Transkriptionsfaktoren. Es könnten daher in vielen Fällen auch Repressionsmechanismen wirken, die dem am c-jun Promotor wirkenden ähnlich sind. Tatsächlich wurde dieser Fall für das c-fos Gen bereits gefunden. Die Funktion der Abschaltung besteht offenbar darin, den induzierten Zustand der Zelle abzubauen, damit sie einem neuen Stimulus zugänglich wird. In diesem Sinne unterscheidet sich dieser Typ von Repression von der, in der signaltypspezifische Transkriptionsfaktoren miteinander kommunizieren. Z. B. wird die AP1-Aktivierung von Genen durch den Transkriptionsfaktor Glucocorticoidrezeptor reprimiert, wenn dieser Rezeptor in der Zelle gleichzeitig mit AP1 durch Steroidhormon aktiviert ist (Jonat et al., 1990). Dieser Typ von Repression verhindert die gleichzeitige Anschaltung von sich gegenseitig ausschließenden genetischen Programme (z. B. Differenzierung und Proliferation) (Ponta et al., 1992), während die Abschaltung der "immediate early gene" nach Stimulierung der Zelle der Beseitigung der bereits ausgelösten Signale und der Herstellung des Grundzustandes der Zelle dient.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abate, C., Luk, D., Gentz, R., Rauscher III, F. J. und Curran, T. (1990a). Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos und Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1032-1036.
- Abate, C., Luk, D., Gagne, E., Roeder, R. G. und Curran, T. (1990b). Fos and Jun cooperate in transcriptional regulation via heterologous activation domains. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5532-5535.
- Alani, R., Brown, P., Binetruy, B., Dosaka, H., Rosenberg, R. K., Angel, P., Karin, M. und Birrer, M. J. (1991). The transactivating domain of the c-Jun proto-oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 6286-6295.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987). 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 (London)* **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.
- Anthony-Cahill, S. J., Benfield, P. A., Fairman, R., Wasserman, Z. R., Brenner, S. L., Stafford III, W. F., Altenbach, C., Hubbell, W. L. und de Grado, W. F. (1992). Molecular characterization of Helix-Loop-Helix peptides. *Science* **255**: 979-983.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1989). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Ass. and Wiley-Interscience, 1+2.
- Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1991). IP-1: A dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* **64**: 983-993.
- Baichwal, V. R. und Tjian, R. (1990). Control of c-Jun Activity by Interaction of a cell-specific inhibitor with regulatory domain δ : Differences between v- and c-Jun. *Cell* **63**: 815-825.
- Barber, J. R. und Verma, I. M. (1987). Modification of fos proteins: phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2201-2211.

- Barinaga, M. (1991). Dimers direct development. *Science* **251**: 1176-1677.
- Bartel, D. P., Sheng, M., Lau, L. F. und Greenberg, M. E. (1989). Growth factors and membrane depolarisation activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* **3**: 304-313.
- Benbrook, D. M. und Jones, N. C. (1990). Heterodimer formation between CREB and Jun proteins. *Oncogene* **5**: 295-302.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockson, D., Turner D. L. und Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of Helix-Loop-Helix DNA binding proteins. *Cell* **61**: 49-59.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscoh, S. J., Weintraub, H. und Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD Proteins: A direct physical association. *Cell* **68**: 507-519.
- Bernstein, L. R. und Colburn, N. H. (1989). AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant JB6 cells. *Science* **244**: 566-569.
- Binetruy, B., Smeal, T. und Karin, M. (1991). Ha-Ras arguments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**: 122-127.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-248.
- Blackwood, E. M. und Eisenman R. N. (1991). Max: a Helix-Loop-Helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with myc. *Science* **251**: 1211-1217.
- Blumberg, P. M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* **48**: 1-8.
- 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.
- Boldogh, I., Abubarker, S. und Albrecht, T. (1990). Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science* **247**: 561-564.
- Bos, T. J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R., Vogt, P. K. (1988). V-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell* **52**: 705-721.
- Bos, T. J., Rauscher III, F. J., Curran, T. und Vogt, P. K. (1989). The carboxy terminus of the viral jun oncoproteins is required for complex formation with the cellular fos protein. *Oncogene* **4**: 123-126.
- Bos, T. J., Monteclaro, F. S., Mitsunobu, F., Ball, A. R., Chang, C.H.W., Nishimura, T. und Vogt, P. K. (1990). Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Genes Dev.* **4**: 1677-1687.

- 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 regulates its DNA-binding activity. *Cell* **64**, 573-584.
- Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. und Karin, M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- α . *Nature (London)* **337**: 661-663.
- 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 transduktion pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**: 301-311.
- Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Druckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. und Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**: 281-302.
- Carter, R., Cosenza, S. C., Pena, A., Lipson, K., Soprano, D. R. und Soprano K. J. (1991). A potential role for c-jun in cell cycle progression through late G1 and S. *Oncogene* **6**: 229-235.
- Castellazzi, M., Dangy, J.-P., Mechta, F., Hirai, S.-I., Yaniv, M., Samarut, J., Lassailly, A. und Brun, G. (1990). Overexpression of avian or mouse c-jun in primary chick embryo fibroblasts confers a partially transformed phenotype. *Oncogene* **5**: 1541-1547.
- 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.
- Chung, C. T., und Miller, H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acid Research* **16**: 3580.
- Ciechanover, A., DiGiuseppe, J., Bercovich, B., Orian, A., Richter, J. D., Schwartz, A. L. und Brodeur, G. M. (1991). Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 139-143.
- 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.
- Curran, T. und Franza Jr., B. R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**: 395-397.
- Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Liou, H.-C., Baltimore, D. und Bose Jr, H. R. (1991). Rel associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* **253**: 1268-1270.
- de Groot, R. P., Kruyt, F. A. E., van der Saag, P. und Kruijer, W. (1990). Ectopic expression of c-jun leads to differentiation of P1a embrional carcinoma cells. *EMBO J.* **9**: 1831-1837.

- de Groot, R., Foulkers, N., Mulder, M., Kruijer, W. und Sassone-Corsi, P. (1991). Positive regulation of jun/AP-1 by E1A. *Mol. Cell. Biol.* 11: 192-201.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. und Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2084-2811.
- Driever W. und Nüsslein-Volhard, C. (1989). The bicoid protein is a positiv regulator of hunchback transcription in the early Drosophila embryo. *Nature (London)* 337: 138-143.
- Edwards, D. R. und Mahadevan, L. C. (1992). Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J.* 11: 2415-2424.
- Fagarasan, M. O., Aiello, F., Muegge, K., Durum, S. und Axelrod, J. (1990). Interleukin 1 induces β -endorphin secretion via Fos and Jun in AtT-20 pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7871-7874.
- Feinberg, A. B. und Vogelstein, P. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Add. Anal. Biochem.* 137: 266-267
- Franza Jr., B. R., Rauscher III, F. J., Josephs, S. F. und Curran, T. (1988). The fos complex and fos related antigens recognize sequense elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239: 1150-1153.
- Gauthier-Rouviere, C., Fernandez, A. und Lamb, N. J. C. (1990). ras-induced c-fos expression and proliferation in living rat fibroblasts involves C-kinase activation and the serum response pathway. *EMBO J.* 9: 171-180.
- Gebel, S., Stein, B., König, H., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Risse, G., Neuberg, M., Müller, R. und Herrlich, P. (1989). Two nuclear oncogene produkts cooperate in the formation of the transcription factor AP-1. In "Vectors as Tools for the Study of Normal and Abnormal Growth and Differentiation". (H. Lothar, Ed.) Springer-Verlag, Berlin, 34: 385-397.
- Gebel, S. (1992). Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren c-Fos 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 transkriptional activator GAL4. *Nature (London)* 334: 721-724.
- Ginsberg, D., Hirai, S.-I., Pinhasi-Kimhi, O., Yaniv, M. und Oren, M. (1991). Transfected mouse c-jun can inhibit transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 6: 669-672.

- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. und Howard, B. H. (1982a). The raus 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. USA* **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.
- Greenberg, M. E. und Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature (London)* **311**: 433-437.
- Grossi, M., Calconi, A. und Tato, F. (1991). V-jun oncogene prevents terminal differentiation and suppresses muscle-specific gene expression in ASV-17-infected muscle cells. *Oncogene* **6**: 1767-1773.
- Gutman, A. und Wasylyk B. (1991). Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *TIG* **7**: 49-54.
- Hai, T., Liu, F., Allegretto, E. A., Karin, M. und Green, M. R. (1988). A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev.* **2**: 1216-1226.
- Hai, T. und Curran, T. (1991). Cross-family dimerisation of transkription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA Binding specificity. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**: 3720-3724.
- 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.
- Haluska, F. G., Huebner, K., Isobe, M., Nischimura, T., Croce, C. M. und Vogt, P. K. (1988). Localization of the human jun protooncogene to chromosome region 1p31-32. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2215-2218.
- Hanes, S. D. und Brent, R. (1991). A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. *Science* **251**: 426-430.
- Hattori, K., Angel, P., Le Beau, M. M. und Karin, M. (1988). Structure and chromosomal lokalisation of the functional intronless human jun protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9148-9152.
- Havarstein, L. S., Morgan, I. M., Wong, W.-Y. und Vogt, P. K. (1992). Mutations in the jun delta region suggest an inverse correlation between transformation and transkriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 618-622.
- Heldin, C. und Westmark, B. (1984). Growth factors: mechanism of action and relation to oncogens. *Cell* **37**: 9-20.

- Herrlich, P. und Ponta, H. (1989). "Nuclear" oncogens convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *TIG* 5: 112-116.
- Herrlich, P., Ponta, H. und Rahmsdorf, H. J. (1992). DNA damage induced gene expression: signal transduction and regulation to growth factor signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* in press.
- Herschman, H. R. (1989). Extracellular signals, transcriptional responses and cellular specificity. *TIBS* 14: 455-458.
- Hirai, S. I., Bourachot, B. und Yaniv, M. (1990). Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* 5: 39-46.
- Hunter, T. (1991). Cooperation between Oncogenes. *Cell* 64: 249-270.
- Imler, J. L., Schatz, C., Wasylyk, C., Chatton, B. und Wasylyk, B. (1988). A Harvey-ras responsive transcription element is also responsive to a tumor-promoter and to serum. *Nature (London)* 332: 275-278.
- Jackson, S. P. und Tjian, R. (1989). Purification and analysis of RNA polymerase II transkription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1781-1785.
- Jenuwein, T. und Müller, R. (1987). Structure-Function analysis of fos protein: A single amino acid change activates the immortalizing potential of v-fos. *Cell* 48: 647-657.
- 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.
- Kingston, R. E., Baldwin, A. S. und Sharp P. A. (1985). Transcription regulation by oncogenes. *TIG* 7: 49-54.
- Kingston, R. E., Baldwin, A. S. und Sharp, P. A. (1985). Transcription control by Oncogenes. *Cell* 41: 3-5.
- Kitabayashi, I., Kawakami, Z., Chiu, R., Ozawa, K., Matzuoka, T., Toyoshima, S., Umesono, K., Evans, R. M., Gachelin, G. und Yokoyama, K. (1992). Transcriptional regulation of the c-jun gene by retinoic acid and E1A during differentiation of F9 cells. *EMBO J.* 11: 167-175.
- Kouzarides, T., und Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature (London)* 336: 646-651.
- Kovary, K. und Bravo, R. (1991a). Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2451-2459.
- Kovary, K. und Bravo R. (1991b). The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblast. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4466-4472.

- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1989). Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J* 8: 2559-2566.
- König, H. (1992). Konstitutiv und induzierbar an die DNA bindende Transkriptionsfaktoren in vivo: Vermittler von positiver und negativer Genregulation. Dissertation, Universität, Karlsruhe.
- Krämer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., König, H., Loferer, H., Grunicke, H. H., Ponta, H., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1990). Radiation-induced activation of transkription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 29: 303-313.
- Krämer, M. (1991). Das Cytokin Interleukin-1 α und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor: Zwei neue Komponenten der UV-induzierten Signalkette in Säugerzellen. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corse, P. und Verma, I. M. (1988). Induction of proto-oncogene Jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature (London)* 334: 629-631.
- Lamph, W. W., Dwarki, V. J., Ofir, R., Montminy, M. und Verma, I. M. (1990). Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4320-4324.
- Landschulz, W., Johnson, P. und McKnight, S. (1988). The leucin zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764.
- Lassar, A. B., Thayer, M., Overell, R. W. und Weintraub, H. (1989). Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1. *Cell* 58: 659-667.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. und Tjian, R. (1987). Activation of transkription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human methallothionein gene and SV40. *Nature (London)* 325: 368-372.
- Levin, M. und Manley J. L. (1989). Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 59: 405-408.
- Lewin, B. (1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 64: 303-312.
- Lloyd, A., Yancheva, N. und Wasylyk, B. (1991). Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain. *Nature (London)* 352: 635-638.
- Lucibello, F. C., Neuberg, M., Hunter, J. B., Jenuwein, T., Scheurmann, M., Wallich, R., Stein, B., Schönthal, A., Herrlich, P. und Müller, R. (1988). Transactivation of gene expression by fos protein: Involvement of a binding site for the transcription factor AP-1. *Oncogene* 3: 43-51.

- Lucibello, F. C., Loway, C., Neubergh, M. und Müller, R. (1989). Trans-repression of the mouse c-fos promoter: a novel mechanism of fos-mediated trans-regulation. *Cell* **59**: 999-1007.
- Luckow, B. und Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5490.
- 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. USA* **84**: 2848-2852.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mellström, B., Achaval, M., Montero, D., Naranjo, J. R. und Sassone-Corsi, P. (1991). Differential expression of the jun family members in rat brain. *Oncogene* **6**: 1959-1964.
- Mitchell, P. J. und Tjian, R. (1989). Transkriptionale Regulation in mammalian cells by sequence-spezifische DNA Bindungsproteine. *Science* **245**: 371-378.
- Mohn, K. L., Laz, T. M., Melby, A. E. und Taub, R. (1990). Immediate-early gene expression differs between regenerierende Leber, insulin-stimulierte H-35 Zellen, und mitogen-stimulierte Balb/c 3T3 Zellen. *J. Biol. Chem.* **265**: 21914-21921.
- Morello, D., Lavenu, A. und Babinet, C. (1990). Differential Regulation and Expression of c-jun, c-fos und c-myc Proto-onkogene während der Leberregeneration und nach Hemmung der Proteinsynthese. *Oncogene* **5**: 1511-1519.
- Morgan, I. M., Ransone, L. J., Bos, T. J., Verma, I. M. und Vogt, P. K. (1992). Transformation by Jun: Requirement for leucine zipper, basic region und transaktivationsdomäne und Enhancement durch Fos. *Oncogene* **7**: 1119-1125.
- Murakami, Y., Satake, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Sakai, M., Muramatsu, M. und Ito, Y. (1991). Die nukleären Proto-onkogene c-jun und c-fos als Regulatoren der DNA-Replikation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3947-3951.
- Naftilan, A. J., Gilliland, G. K., Eldridge, C. S. und Kraft, A. (1990). Induktion der Proto-onkogene c-jun durch Angiotensin II. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5536-5540.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. und Nathans, D. (1988). DNA-Bindungsaktivitäten von drei murinen Jun-Proteinen: Stimulation durch fos. *Cell* **55**: 907-915.
- Nakabeppu, Y. und Nathans, D. (1989). Die basic region von Fos vermittelt spezifische DNA-Bindung. *EMBO J* **8**: 3833-3841.

- Neuberg, M., Schuermann, M., Hunter, J. B. und Müller, R. (1989). Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. *Nature (London)* **338**: 589-590.
- Nicholson, R., Mader, S., Nagpal, S., Rochette-Egly, C. und Chambon, P. (1990). Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *EMBO J.* **9**: 4443-4454.
- Nishimura, T. und Vogt, P. K. (1988). The avian cellular homolog of the oncogene jun. *Oncogene* **3**: 659-663.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature (London)* **308**: 693-698.
- Offringer, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1A: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**: 527-538.
- Ofir, R., Dwarki, V. J., Rashid, D. und Verma, I. M. (1990). Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature (London)* **348**: 80-82.
- O'Neil, K. T., Hoess, R. H. und DeGrado, W. F. (1990). Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science* **249**: 774-778.
- 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 homodimer 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.
- Pertival-Smith, A., Müller, M., Affolter, M. und Gehring, W. J. (1990). The interaction with DNA of wild-type and mutant fushi tarazu homeodomains. *EMBO J.* **9**: 3967-3974.
- Pertovaara, L., Sistonen, L., Bos, T. J., Vogt, P. K., Keski-Oja, J. und Alitalo, K. (1989). Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor β stimulation. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1255-1262.
- Ponta, H., Cato, A.C.B. und Herrlich, P. (1992). Interference of pathway specific transcription factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**: 255-261.
- Prywes, R., Dutta, A., Cromlish, J. A. und Roeder, R. G. (1988). Phosphorylation of serum response factor, a factor that binds to the serum response element of the c-Fos enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7206-7210.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature (London)* **353**: 670-674.

- Quantin, B. und Breathnach, R. (1988). Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature (London)* 334: 538-539.
- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U. und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucl. Acids Res.* 15: 1643-1659.
- 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: 770-780.
- 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., Voulalas, P. J., Franza Jr, B. R. und Curran, T. (1988b). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* 2: 1687-1699.
- Rauscher III, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. und Spiegelman, M. (1988c). Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52: 471-480.
- Redner, R. L., Lee, A. W.-M., Osawa, G. A. und Nienhuis, A. W. (1992). Variable pattern of jun and fos gene expression in different hematopoietic cell lines during interleukin 3-induced entry into the cell cycle. *Oncogene* 7: 43-50.
- Rütger, U., Wagner, E. F. und Müller, R. (1985) Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO J* 4: 1775-1781.
- Ryder, K., Lau, L. F. und Nathans D. (1988a). A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1487-1491.
- Ryder, K. und Nathans, D. (1988b). Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8464-8467.
- Ryseck, R.-P., Hirai, S. I., Yaniv, M. und Bravo, R. (1988). Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature (London)* 334: 535-537.
- Ryseck, R.-P. und Bravo, R. (1991). c-Jun, jun B, and jun D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* 6: 533-542.
- Sanger, F., Niclen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L., Lamph, W. and Verma, I., (1988a). Direct interaction between Fos and Jun nuclear oncoprotein: Role of the leucine zipper domain. *Nature (London)* 336: 692-695.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C. und Verma, I. M. (1988b). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature (London)* 334: 314-319.

- Schier, A. und Gehring, W. J. (1992). Direct homeodomain-DNA interaction in the autoregulation of the fushi tarazu gene. *Nature (London)* **356**: 804-807.
- Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1984). UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* **37**: 861-868.
- Schönthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1988a). Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **53**: 779-787.
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. and Ponta, H. (1988b). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* **54**: 325-334.
- Schönthal, A., Büscher, M., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M. und Herrlich, P. (1989). The fos and jun/AP1 proteins are involved in the downregulation of fos transcription.
- Schönthal, A., Srinivas, S. und Eckhart, W. (1992). Induction of c-jun protooncogene expression and transkription factor AP-1 activity by the polyoma virus middle-sized tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4972-4976.
- Schuermann, M., Neuberger, M., Hunter, J. B., Jenuwein, T., Ryseck, R.-P., Bravo, R. und Müller, R. (1989). The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell* **56**: 507-516.
- Schuermann, M., Jooss, K. und Müller, R. (1991a). Fos B is a transforming gene encoding a transcriptional activator. *Oncogene* **6**: 567-576.
- Schuermann, M., Hunter, J. B., Hennig, G. und Müller, R. (1991b). Non-leucine residues in the leucine repeats of Fos and Jun contribute to the stability and determine the specificity of dimerisation. *Nucl. Acids Res.* **19**: 739-746.
- 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.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L., Bolado, J., Verma, I. M. und Evans, R. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6092-6096.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. und Harzell, III, G. W. (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta* **989**: 25-48.
- Sherman, M. L., Datta, R., Hallahan, D. E., Weichselbaum, R. R. und Kafre, D. W. (1990). Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5663-5666.
- Smeal, T., Angel, P., Jennifer, M. und Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun:Jun and Jun:Fos complexes. *Genes Dev.* **3**: 2091-2100.

- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. und Karin, M. (1991). Oncogenic and transkriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature (London)* **354**: 494-496.
- Sonnenberg, J. L., Rauscher III, F. J., Morgan, J. I. und Curran, T. (1989). Regulation of proenkephalin by Fos and Jun. *Science* **246**: 1622-1625.
- Southern, P. J. und Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early promotor. *J. Mol. Appl. Genetics* **1**: 327-341.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Liftin, M. und Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate in UV-induced expression of humman immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and methallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5169-5181.
- Stein, B. (1990). Mechanismus der UV-induzierten Expression des menschlichen Immunschwäche-Virus Typ1, der Collagenase und des Protoonkogens c-jun. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der Eb, A. und Rahmsdorf, H. J. (1992). Ultraviolet-radiation induced c-jun Gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem. Photobiol.* **55**: 409-415.
- Struhl, K. (1989). Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transkriptional regulatory proteins. *TIBS* **14**: 137-140.
- Su, H., Bos, T. J., Montecarlo, F. S. und Vogt, P. K. (1991). Jun inhibits myogenic differentiation. *Oncogene* **6**: 1759-1766.
- Thevenin, C., Kim, S.-J. und Kehrl, J. H. (1991). Inhibition of protein phosphatases by okadaic acid induces AP1 in human T cells. *J. Bio. Chem.* **266**: 9363-9366.
- Touray, M., Ryan, F., Sauer, S., Martin, F. und Jaggy, R. (1991). Mos-induced inhibition of glucocorticoid receptor function is mediated by Fos. *Oncogene* **6**: 211-217.
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein binding site that mediates transkriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* **46**: 567-574.
- 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.
- Ullrich, A., und Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.
- van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. und Van der EB, A. J. (1990). Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP1 transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5857-5864.

- van Beveren, C., Van Staalén, F., Curran, T., Müller, R. and 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.
- Vinson, C. R., Sigler, P. B. und McKnight, S. L. (1989). Scissor-Grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**: 911-916.
- Vogt, P. K. und Bos, T. J. (1989). The oncogene jun and nuclear signalling. *TIBS* **14**: 172-175.
- Wasylyk, C., Imler, J. L. and Wasylyk, B. (1988). Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA1. *EMBO J.* **7**: 2475-2485.
- Wasylyk, C., Schneikert, J. und Wasylyk, B. (1990). Oncogene v-jun modulates DNA replication. *Oncogene* **5**: 1055-1058.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Pupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, Y. und Lassar, A. (1991). The myoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**: 761-766.
- Weiss, R., Teich, M., Varmus, H., Coffin, J. (Eds.) (1984). *The Molecular Biology of Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Wu, B.-Y., Fodor, E. J. B., Edwards, R. H. und Rutter, W. J. (1989). Nerve growth factor induces the proto-oncogene c-jun in PC12 cells.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., E.Pan, Y.-C., und Curran, T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J* **11**: 3323-3335.
- Yang-Yen, H.-F., Chiu, R. und Karin, M. (1990a). Elevation of AP1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transkription. *The New Biologist* **2**: 351-361.
- Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. und Karin, M. (1990b). Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**: 1205-1215.
- 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.
- Zwiller, J., Sassone-Corsi, P., Kakazu, K. und Boynton, A. L. (1991). Inhibition of PDGF-induced c-jun and c-fos expression by a tyrosine protein kinase inhibitor. *Oncogene* **6**: 219-221.