



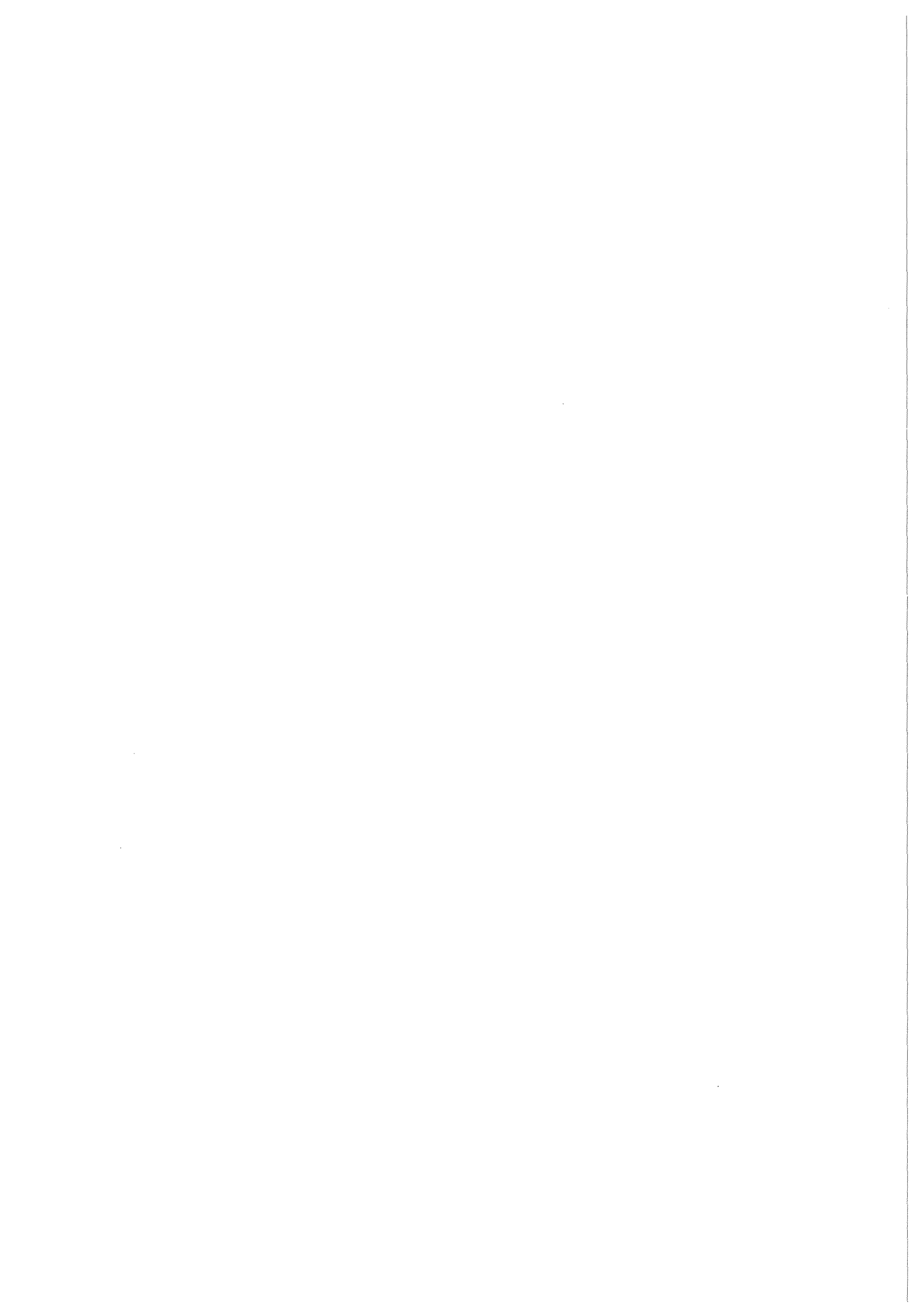
Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6209

**Das Zusammenspiel des
Proto-Onkogens *c-jun* und
des Tumorsuppressorgens
p53 in der Regulation der
Zellproliferation und
Apoptose**

A. A. Kolbus
Institut für Genetik

Dezember 1998



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6209

**Das Zusammenspiel des Proto-Onkogens *c-jun*
und des Tumorsuppressorgens p53
in der Regulation der Zellproliferation und Apoptose**

Andrea Anna Kolbus
Institut für Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1998

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

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

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

ISSN 0947-8620

Extrazelluläre Signale werden durch Transkriptionsfaktoren in veränderte Genexpression umgewandelt. Der Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt Veränderungen in der Genexpression die durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone oder alkylierende Agenzien ausgelöst werden. AP-1 ist der Sammelbegriff für Dimere, die sich aus Proteinen der Jun-, Fos- und ATF-Familien zusammensetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von c-Jun, einem Mitglied von AP-1, in der Proliferation und in der Apoptose untersucht. Dazu wurden Fibroblasten von Mäusen benutzt, die kein funktionelles c-Jun Protein mehr besitzen. Solche *c-jun*^{-/-} Fibroblasten proliferieren langsamer als Wildtyp Zellen, wobei der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus vermindert ist. Obwohl die Menge der Zykline D1 und E, die im Übergang von der G1- in die S-Phase eine Schlüsselrolle spielen, in den *c-Jun* defizienten Zellen leicht erhöht ist, ist die Aktivität der assoziierten Kinasen CDK4/6 und CDK2 nach Serumstimulation im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Darüber hinaus sind die RNA und das Protein des Tumorsuppressorgens p53 in den *c-jun*^{-/-} Zellen verstärkt exprimiert, was dazu führt, daß der Zellzyklusinhibitor p21, ein Zielgen von p53, in diesen Zellen ebenfalls erhöht ist. p21 hemmt den Zyklin D- und Zyklin E-assoziierten Kinase-Komplex, was zu einem reduzierten Übergang von der G1- in die S-Phase führt. Wird zusätzlich zu *c-jun* das p53 Gen inaktiviert, sind diese Veränderungen im Zellzyklus wieder aufgehoben. Der Inhibitor p21 ist in seiner Expression gehemmt, die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen ist wieder hergestellt und die Zellen proliferieren wieder mit gleicher Effizienz wie Wildtyp Zellen.

Im zweiten Teil meiner Arbeit konnte ich erstmals die postulierte wichtige Rolle von c-Jun in der zellulären Antwort auf genotoxische Substanzen experimentell bestätigen. *c-jun*^{-/-} Zellen sind hypersensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien, wobei diese Hypersensitivität nicht auf reduzierter Reparatur der geschädigten DNA beruht. Die Hypersensitivität ist auch nicht auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen, wie in Zellen denen das AP-1 Mitglied c-Fos fehlt. Im Gegensatz zu diesen *c-fos*^{-/-} Zellen, ist die Apoptose nach Behandlung mit MMS in den *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Die reduzierte Apoptose in den *c-jun*^{-/-} Zellen ist abhängig von p53 und korreliert mit verminderter Menge und Aktivität der Jun N-terminalen Kinasen (JNKs). Die verringerte Anzahl der Kolonien von *c-jun*^{-/-} Zellen im Toxizitäts-Test kommt durch einen Zellzyklusblock zustande. Im Gegensatz zu Wildtyp Zellen, die nach Behandlung mit MMS nach einem transienten Zellzyklusblock wieder zu proliferieren beginnen, verharren c-Jun defiziente Zellen permanent in dem ausgelösten Zellzyklusblock in der G2-Phase. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Abwesenheit von c-Jun sowohl zu einer verringerten Proliferation als auch zu einer reduzierten Apoptose führt, beides Prozesse die durch das zusätzliche Ausschalten von p53 rückgängig gemacht werden können.

Crosstalk between the proto-oncogene *c-jun* and the tumor suppressor gene p53 in the regulation of cell proliferation and apoptosis

Transcription factors function in coupling extracellular signals to alterations in the expression of specific target genes. The transcription factor AP-1 which is composed of dimers of members of the Jun, Fos and ATF protein families, exerts changes in gene expression upon growth factor, cytokine, hormone or alkylating agent stimulation. Based on this activity, AP-1 has been proposed to be critically involved in the regulation of cell proliferation, apoptosis and cell survival. However, the specific function of the individual members of the Jun, Fos and ATF families in these processes are presently unknown. In the present work the role of c-Jun in the regulation of cell proliferation and apoptosis was analysed. To this end fibroblasts from mice which lack a functional c-Jun protein were used. Such *c-jun*^{-/-} fibroblasts proliferate more slowly than wild type fibroblasts and the G1 to S transition in the cell cycle is reduced. While the amounts of cyclin D1 and cyclin E, both key regulators of the G1 to S transition, are elevated in c-Jun deficient cells, the activities of their associated kinases CDK4/6 and CDK2 after serum stimulation are reduced in comparison to the wildtype. In addition, tumor suppressor gene p53 RNA and protein are expressed to a higher extent in the *c-jun*^{-/-} cells. This subsequently leads to a higher expression of the inhibitor p21, a target gene of p53. p21 inhibits the cyclin D and cyclin E associated kinase complexes, therefore leading to a reduction in the transition from the G1 to the S-phase. If in addition to *c-jun* the p53 gene is also inactivated, all of these observed effects can be reverted: The inhibitor p21 is repressed in its expression, and the activity of the cyclin dependent kinases are restored, the cells then proliferate with the same efficiency as seen with the wild type cells.

In the second part of my work I could confirm for the first time the postulated role of c-Jun in the cellular response to genotoxic agents. *c-jun*^{-/-} cells are hypersensitive to alkylating agents, but this hypersensitivity is not based on a reduced repair of damaged DNA. This hypersensitivity can not be explained by increased apoptosis, which is seen with cells lacking the AP-1 member, c-Fos: the apoptosis rate of *c-jun*^{-/-} cells is dramatically reduced in comparison to the wildtype. The reduced apoptosis in *c-jun*^{-/-} cells is dependent on p53 and correlates with a reduced amount and decreased activity of Jun N-terminal kinases (JNKs). Furthermore, a lower number of colonies from *c-jun*^{-/-} cells seen in a toxicity test is based on a block in the cell cycle. In contrast to the wildtype cells, which proliferate after treatment with MMS following a transient cell cycle block, c-Jun deficient cells remain in the cell cycle block during the G2-Phase.

The results of this present work show that the absence of c-Jun leads to a reduced proliferation and to a reduced apoptosis in fibroblasts. Both processes were reverted by the additional deletion of p53.

1. Einleitung	1
1.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1	1
1.1.1. Die Regulation von AP-1	2
1.1.2. Die Rolle von c-Jun in Differenzierung und Proliferation.....	7
1.2. Der Zellzyklus.....	8
1.2.1. Die Zykline der G1-Phase und ihre Regulation.....	10
1.2.2. Inhibitoren	12
1.3. Der Tumorsuppressor p53.....	12
1.3.1. Funktionen von p53 in der Regulation des Zellzyklus.....	13
1.3.2. Die Regulation von p53	14
1.4. Die Apoptose	16
1.4.1. Die Regulation der Apoptose.....	16
1.4.2. Apoptose durch Todesrezeptoren.....	17
1.5. Fragestellung	18
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Bezugsquellen.....	21
2.1.2. Radiochemikalien	22
2.1.3. Antikörper.....	22
2.1.4. Proben für Northern-Blot Analysen.....	23
2.1.5. Oligonukleotide für Gelretardations-Analysen	23
2.1.6. Primer für PCR.....	23
2.1.7. Lösungen und Puffer	24
2.1.8. Zellen	24
2.2. Methoden	25
2.2.1. DNA- und RNA-Techniken.....	25
2.2.1.1. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung.....	25
2.2.1.2. Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987).....	25
2.2.1.3. RT-PCR.....	25
2.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	26

2.2.1.5. Southern-Blot.....	26
2.2.1.6. Isolierung von genomischer DNA.....	27
2.2.1.7. Gelelektrophorese von RNA.....	27
2.2.1.8. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot).....	27
2.2.1.9. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	28
2.2.1.10. Hybridisierung.....	29
2.2.2. Zellkultur.....	29
2.2.2.1. Trypsinieren von Zellen.....	29
2.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	30
2.2.2.3. Synchronisation der Zellen.....	30
2.2.2.4. Toxizitäts-Test durch Kolonienbildung.....	30
2.2.2.5. Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien.....	31
2.2.2.6. Bestrahlung mit UV C.....	31
2.2.2.7. FACS-Analyse.....	31
2.2.2.8. Bestimmung der S-Phase-Zellen und der DNA-Reparatur (UDS).....	32
2.2.3. Präparation und Analyse von Proteinen.....	33
2.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten.....	33
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al., 1951.....	34
2.2.3.3. Immunpräzipitation und in vitro Kinase-Assay.....	34
2.2.3.4. Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen.....	35
2.2.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.2.3.6. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen.....	37
2.2.3.7. Silberfärbung von Proteingelen.....	37
2.2.3.8. Transfer von Proteinen auf Membran und Nachweis von Proteinen (Western-Blot).....	37
2.2.3.9. Bestimmung der Bindeaktivität durch Gelretardations-Analyse.....	38
3. Ergebnisse.....	41
3.1. Teil 1: Die Rolle von c-Jun in der Zellproliferation.....	41
3.1.1. Zellen, die kein c-Jun exprimieren, zeigen eine verlangsamte Proliferation....	41
3.1.2. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, ist in Abwesenheit von c-Jun verringert.....	42
3.1.3. Das Fehlen von c-Jun führt zu einer deutlich verminderten Aktivität der Zyclin-abhängigen Kinasen.....	47

3.1.4. Der Inhibitor p21 ist in Abwesenheit von c-Jun erhöht.....	51
3.1.5. Die Effekte von c-Jun sind abhängig von p53	54
3.2. Teil 2: Die Rolle von c-Jun in der Apoptose und in der Etablierung von zellulären Schutzmechanismen gegenüber alkylierenden Agenzien.....	59
3.2.1. In Abwesenheit von c-Jun ist die AP-1 abhängige Genexpression nach genotoxischen Substanzen verringert.....	59
3.2.2. Der Verlust von c-Jun erzeugt Hypersensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien	61
3.2.3. Die DNA-Reparatur ist in c-jun ^{-/-} Zellen nicht beeinträchtigt.....	63
3.2.4. Der Verlust von c-Jun führt zu verringerter Apoptose	67
3.2.5. Ist die reduzierte Apoptose in den c-jun ^{-/-} Zellen abhängig von der Expression von p53?.....	72
3.2.6. In c-jun ^{-/-} Zellen ist die Aktivität von NF-kB deutlich reduziert	74
3.2.7. Sind Signaltransduktionswege in Abwesenheit von c-Jun noch funktionsfähig?	77
3.2.8. Die Aktivierung von AP-1 abhängigen Genen in Abwesenheit von c-Jun und p53.	81
3.2.9. Die Expression der CD95 Rezeptors ist in c-jun ^{-/-} Zellen ähnlich wie in Wildtyp Zellen.....	86
3.2.10. Die Behandlung der Zellen mit MMS führt zu einem Block im Zellzyklus.	88
4. Diskussion.....	95
4.1. Teil 1: Die Rolle von c-Jun in der Proliferation.....	96
4.1.1. c-Jun ist ein negativer Regulator von p53	97
4.1.2. Mechanismen der Regulation der Expression von p53.....	98
4.1.3. Unterschiedliche Funktionen von c-Jun in der Proliferation und Differenzierung.....	101
4.1.4. Verknüpfung von Signaltransduktion und Zellzyklusregulation	102
4.1.5. Die Rolle von c-Jun in der Transformation	103
4.2. Teil 2: Die Rolle von c-Jun in der Apoptose und im Überleben gegenüber alkylierender Agenzien	104
4.2.1. Die Rolle von c-Jun in der Apoptose.....	105

4.2.2. Die Funktionen von c-Jun in der Apoptose sind abhängig von der Expression von p53.....	107
4.2.3. Die reduzierte Kolonienzahl nach Behandlung mit MMS beruht auf einem Block im Zellzyklus.....	113
5. Literatur	117

Abkürzungen

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serumalbumin ("bovine serum albumine")
cDNA	komplementäre DNA
cpm	"counts per minute"
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium"
DMS	Dimethylsulfonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	"enhanced chemoluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	"extracellular signal regulated kinase"
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HR	Hormonrezeptor
JNK	Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	molar (Mol/Liter)
MAPK	"mitogen activated protein kinase"
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MBq	Megabequerel
MEK	MAPK/ERK-Kinase

Abkürzungen

MEKK	MEK Kinase
MKK	MAP Kinase Kinase
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MOPS	3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	"messenger" RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SAPK	"stress-activated protein kinase"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	"standard saline citrat"
TAD	Transaktivierungsdomäne
TCF	"ternary complex factor"
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit ("unit")
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung

1. Einleitung

In einem multizellulären biologischen System werden sowohl Zellproliferation als auch Zelldifferenzierung durch Veränderung in der Expression spezifischer Gene in Abhängigkeit von extrazellulären Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone oder Tumor-Promotoren gesteuert. Diese Stimuli interagieren nicht direkt mit der DNA, sondern binden an membranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren, wodurch Signaltransduktionskaskaden zum Zellkern ausgelöst werden. Bestandteile dieser Kaskaden sind Proteinkinasen und Phosphatasen, die als Endpunkt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren regulieren. Die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen bzw. die Interaktion der gebundenen Faktoren mit dem RNA-Polymerase II-Initiationskomplex steuert schließlich die Transkription des jeweiligen Zielgens.

1.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1

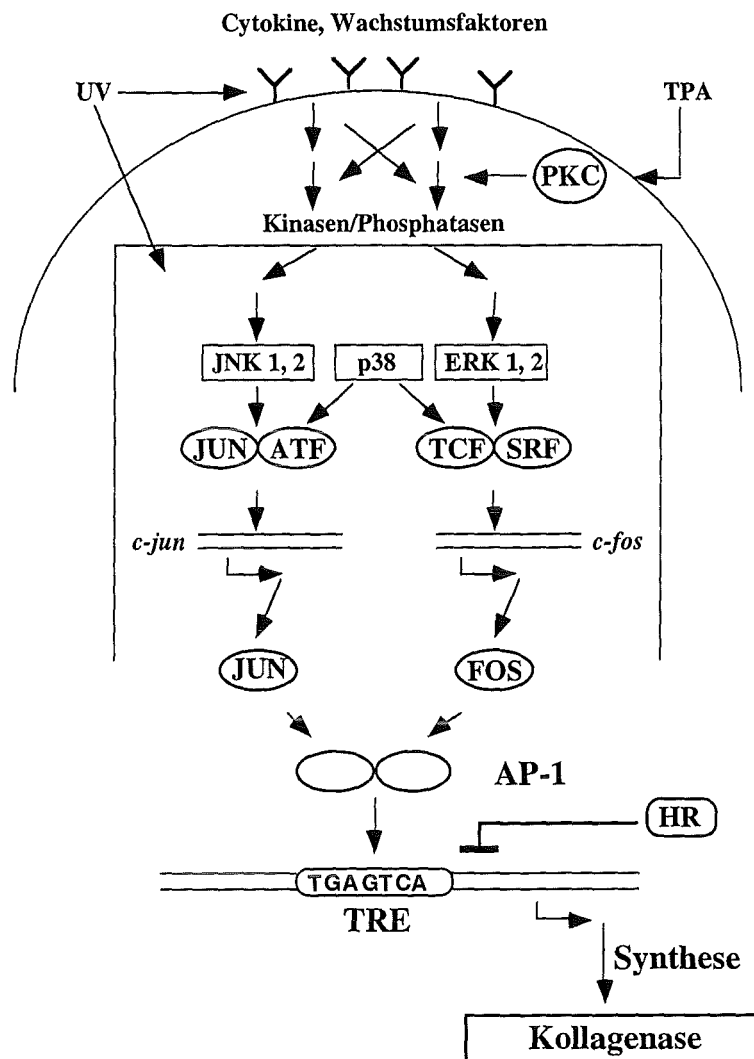
Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der extrazelluläre Signale in Veränderung der Genexpression umsetzt, ist AP-1 (Aktivator Protein-1) (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987a; 1987b). AP-1 vermittelt Genexpression die durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone, UV-Bestrahlung, alkylierende Agenzien oder Tumor Promotoren gesteuert wird (als Übersicht siehe Angel und Karin, 1991). Darüber hinaus führen auch verschiedene Onkogene wie *v-mos*, *v-src*, *v-raf* oder *Ha-ras* zur Aktivierung von AP-1, bzw. benötigen AP-1 um Zelltransformation auszulösen (Angel und Karin, 1991).

AP-1 ist der Sammelbegriff für Proteindimere, deren Untereinheiten sich von den *jun*-, *fos*-, und ATF-Genfamilien ableiten. Die Familie der Jun-Proteine besteht aus c-Jun, JunB und JunD, die der Fos-Familie aus c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2, und die der ATF-Familie aus ATF2, ATF3/LRF1 und B-ATF (als Übersicht siehe Vogt und Bos, 1990; Angel und Karin, 1991; Karin et al., 1997). All diese Proteine werden entsprechend ihrer konservierten strukturellen Organisation, die eine Abfolge von ca. 60 Aminosäuren darstellt (bZIP-Region), als bZIP-Proteine bezeichnet (Landschulz et al., 1988). Diese Region besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten: der basischen Region und dem Leuzin-Zipper. Die basische Region, die sich aus 12 bis 14 basischen Aminosäuren zusammensetzt (Vogt und Bos, 1990), ist für die sequenzspezifische

DNA-Bindung verantwortlich. Die Abfolge der hydrophoben Aminosäuren in der Leuzin-Zipper Region erlaubt die Dimerisierung; die Anordnung der geladenen Aminosäuren bestimmt die Stabilität der Dimere. Jun-Proteine bilden sowohl Heterodimere mit Mitgliedern der Fos- und ATF-Familien als auch Homodimere mit den Mitgliedern der eigenen Familie (Kouzarides und Ziff, 1988; Nishizawa et al., 1989; Smeal et al., 1989; Zerial et al., 1989; Matsui et al., 1990; Ziff, 1990; Hai und Curran, 1991; Hsu et al., 1991; Dorsey et al., 1995). Ähnlich wie die Jun-Proteine können auch Mitglieder der ATF-Familie Homodimere bilden (Ziff, 1990), während die Mitglieder der Fos-Familie nur Heterodimere bilden können. Aufgrund der DNA-Bindenspezifität und der Fähigkeit zur Dimerisierung mit Jun oder Fos wurden einige neue bZIP-Proteine identifiziert (als Übersicht siehe Karin et al., 1997). Dazu gehören die Maf-Proteine (v-Maf, c-Maf) und das Genprodukt des Neuralen Retinaspezifischen Gens (Nishizawa et al., 1989; Swaroop et al., 1992), sowie die beiden Jun-Dimerisierungspartner JDP1 und JPD2 (Aronheim et al., 1997). Eine dritte funktionale Proteindomäne ist die Transaktivierungsdomäne. Sie stellt den direkten oder indirekten Kontakt des Proteins zur basalen Transkriptionsmaschinerie her (Angel und Karin, 1991).

1.1.1. Die Regulation von AP-1

Nach Stimulation mit extrazellulären Signalen werden innerhalb der Zelle Kinasen und Phosphatasen aktiviert, deren Signale in den Kern übertragen werden und in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 enden (siehe Schema 1). Die Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster TPA führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits über Raf-1 den MAP-Kinase („mitogen activated protein kinase“) Weg induziert (als Übersicht siehe Marshall, 1995). Die Bestrahlung der Zellen mit UV C führt zur Aktivierung von Rezeptoren an der Zelloberfläche (Sachsenmaier et al., 1994). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors nach UV-Bestrahlung geschieht über die Hemmung einer Phosphatase (Knebel et al., 1996). Die Aktivierung der Rezeptoren von EGF, TNF α und IL-1 nach Bestrahlung mit UV erfolgt über sogenannte „cluster“-Bildung (Rosette und Karin, 1996). All diese Signale führen letztlich zur Aktivierung von MAP-Kinasen und münden in der Aktivierung von AP-1.



Schema 1: Darstellung der Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und des bekanntesten Zielgenes, der Kollagenase, führt. Erläuterungen siehe Text.

Zu der Familie der MAP-Kinasen gehören ERK1 und ERK2, Jun N-terminale Kinasen (JNK, auch als SAPK bezeichnet, mit mindestens zehn verschiedenen Isoformen) und p38 (als Übersicht siehe Minden und Karin, 1997). Die Aktivierung der MAP-Kinasen nach unterschiedlichen Stimuli ist konserviert und erfolgt nach einem gemeinsamen Schema. MAP-Kinasen (JNKs, p38 oder ERKs) werden durch Phosphorylierung eines Threonins und eines Tyrosins durch MAP-Kinasen-Kinasen aktiviert. Diese wiederum werden von stromaufwärts in der Signalkette liegenden Kinasen (MAPKKK) durch Phosphorylierung an Serinen und/oder Threoninen aktiviert. Die MAPKKKs werden

entweder durch andere Kinasen oder GTP-bindende Proteine, die durch extrazelluläre Signale aktiviert wurden, in ihrer Aktivität stimuliert (Minden und Karin, 1997). JNKs und p38 sind Endpunkte von Signalketten, die durch Cytokine und zellulären Stress wie Hitzeschock, UV-Bestrahlung oder osmotischer Schock aktiviert werden (Galcheva-Gargova et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Raingeaud et al., 1995). ERK1 und ERK2 werden bevorzugt durch Wachstumsfaktoren und Phorbolester aktiviert (Marshall, 1995; Lewis et al., 1998). JNK1 und JNK2 aktivieren durch Phosphorylierung bevorzugt c-Jun, aber auch ATF2 und TCF/Elk1 (Hibi et al., 1993; Derijard et al., 1994; Cavigelli et al., 1995; Gupta et al., 1995; van Dam et al., 1995). ERK1 und ERK2 aktivieren TCF/Elk1 („ternary complex factor“), der ebenfalls von p38 phosphoryliert wird. Zusätzlich phosphoryliert p38 ATF2 (als Übersicht siehe Lewis et al., 1998; Minden und Karin, 1997). Die Aktivierung von TCF/Elk1, der zusammen mit SRF („serum response factor“) an das „serum response element“ (SRE) im *c-fos* Promotor bindet, führt zur transkriptionellen Aktivierung von *c-fos*. Der *c-jun* Promotor enthält zwei AP-1 Bindestellen (Jun1: TGACATCA und Jun2: TTACCTCA), an die bevorzugt c-Jun/ATF Heterodimere oder ATF Homodimere binden (Benbrook und Jones, 1990; Ivashkiv et al., 1990; Hai und Curran, 1991; van Dam et al., 1993). Die Hyperphosphorylierung von c-Jun und ATF2, die schon in unstimulierten Zellen an den *c-jun* Promotor gebunden sind, führt zur Aktivierung von *c-jun* (Herr et al., 1994). Die Phosphorylierung von c-Jun durch die JNKs erfolgt durch Interaktion mit der Delta-Domäne von c-Jun (Hibi et al., 1993; Derijard et al., 1994). Die JNKs binden an die Aminosäuren 30 bis 60 von c-Jun und phosphorylieren die Serine an Position 63 und 73 (Kallunki et al., 1996). Durch diese Bindestelle (auch „docking site“ genannt) kann c-Jun die JNKs rekrutieren und so zur Phosphorylierung von Dimerisierungspartnern (wie JunD), die selbst keine solche Bindestelle besitzen, durch JNKs beitragen (Kallunki et al., 1996). Die Phosphorylierung der Serine 63 und 73 ist wichtig für die verstärkte Transaktivierung von c-Jun (Smeal et al., 1991, 1992 und 1994).

Die verstärkte Synthese von c-Fos und c-Jun führt zur erhöhten DNA-Bindung und somit zur Aktivierung von Zielgenen, wie z.B. der Kollagenase. Die Bindung der c-Fos/c-Jun Heterodimere erfolgt an die Konsensus-Sequenz TGA^C/GTCA, die als TRE („TPA responsive element“) bezeichnet wird, und ursprünglich in der Promotor Region des Kollagenasegens definiert wurde (Angel et al., 1987a und 1987b). Dabei ist die Expression von c-Fos notwendig für die Induktion der Kollagenase, da *c-fos*

spezifische antisense-Oligonukleotide die Transkription des Kollagenasegens hemmen (Schönthal et al., 1988). Zudem kann in *c-fos*^{-/-} Zellen die Kollagenase nicht mehr aktiviert und verstärkt exprimiert werden (Schreiber et al., 1995).

Die Regulation von AP-1 geschieht auf verschiedenen Ebenen: der bereits erwähnten transkriptionellen Aktivierung und der post-translationellen Modifikation (Kyriakis und Avruch, 1996; Minden und Karin, 1997), der Lokalisation in der Zelle (Transport in den Kern) (Chida und Vogt, 1992) oder auf der Ebene der Protein-Protein-Wechselwirkungen (Karin et al., 1997). Die daraus erfolgten Modifikationen können sowohl die DNA-Bindungsaffinität als auch die Transaktivierungskapazität beeinflussen. Zusätzlich können AP-1 Proteine durch Veränderung ihrer Stabilität reguliert werden. Die Phosphorylierungen der Serine 63 und 73 sind aktivierend und haben eine verstärkte Transaktivierung und eine Verlängerung der Halblebenszeit des Proteins (Treier et al., 1994) zur Folge. Zusätzlich führen Phosphorylierungen von Serinen und Threoninen (Serin 243 und 249, sowie Threonin 231 und 239) in der DNA-Bindedomäne von c-Jun zu einer verringerten Bindungsaffinität. Die dafür verantwortlichen Kinasen sind die Caseinkinase II, die Glykogen-Synthase-Kinase 3 und eventuell ERKs (Boyle et al., 1991; Chou et al., 1992; Lin et al., 1992). Nach Behandlung mit TPA wird eine noch zu identifizierende Phosphatase aktiviert; die Dephosphorylierung führt zur verstärkten Bindung an die DNA sowie zur verstärkten Transaktivierung (als Übersicht siehe Karin, 1994).

Die Interaktion von c-Jun mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren kann zur gegenseitigen Hemmung beider interagierenden Faktoren führen. So führt die erhöhte Expression von c-Jun (durch Transfektion eines Expressionsvektors für c-Jun) zur Hemmung der MyoD vermittelten Transaktivierung. Andererseits führt diese Interaktion zwischen MyoD und c-Jun zur Hemmung der c-Jun vermittelten Transaktivierung. Die Interaktion dieser beiden Proteine beruht auf direkten Wechselwirkungen (Su et al., 1991; Bengal et al., 1992). Ähnlich wird die Transaktivierungskapazität von Myogenin durch Expression von c-Jun gehemmt (Li et al., 1992). Dagegen wurden zwischen AP-1 und NF- κ B synergistische Wechselwirkungen festgestellt (Stein et al., 1993).

Die Hemmung von AP-1 durch Hormonrezeptoren (HR) beruht ebenfalls auf direkten Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die durch TPA vermittelte AP-1 abhängige Induktion der Kollagenase kann durch den aktivierten Glukokortikoid-Rezeptor (GR) gehemmt werden (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang Yen et al., 1990a).

Bei dieser Hemmung ist die DNA-Bindung von AP-1 nicht beeinträchtigt, was darauf schließen läßt, daß der GR die Transaktivierung von AP-1 verhindert (König et al., 1992). Die Hemmung erfolgt Dimer-spezifisch: c-Jun/c-Fos Dimere werden gehemmt, wogegen c-Jun/c-Jun Homodimere aktiviert werden (Diamond et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995). Dabei ist die DNA Bindungseigenschaft des Glukokortikoid-Rezeptors für die inhibitorische Wirkung auf AP-1 nicht notwendig (Reichardt et al., 1998).

Die Komplexität der Dimervarianten von AP-1 wird mit zunehmender Zahl der Familienmitglieder immer größer. Die Funktionen der einzelnen Familienmitglieder, die sich nicht nur in ihrer Transaktivierungsspezifität und Bindungsaffinität unterscheiden, können durch unterschiedliche experimentelle Ansätze, wie Überexpression der einzelnen Proteine oder das Einsetzen von dominant-negativ wirkenden Mutanten, untersucht werden. Diese experimentellen Ansätze ermöglichen es jedoch nicht, auf die Funktion des einzelnen Mitgliedes der Familie rückzuschließen, da hierbei auch weitere Mitglieder in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Ein geeignetes System zur Untersuchung der Funktionen der einzelnen AP-1 Mitglieder ist das gezielte Ausschalten des jeweiligen Gens („knock out“) durch homologe Rekombination in der Maus. Dabei zeigte sich, daß die einzelnen Mitglieder der AP-1 Familie in der Tat spezifische Funktionen einnehmen. Die Expression von c-Jun, JunB und Fra1 sind lebensnotwendig, da Mäuse, die die jeweiligen Proteine nicht exprimieren, während ihrer pränatalen Entwicklung sterben (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993; Schorpp-Kistner et al., 1998; M. Schreiber, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz dazu sind *c-fos*^{-/-} *ATF2*^{-/-}, *fosB*^{-/-} oder *junD*^{-/-} Mäuse lebensfähig (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992; Reimold et al., 1993; Gruda et al., 1996; M. Yaniv unveröffentlichte Daten). *fosB* und *junD* defiziente Mäuse zeigen keine postnatalen Entwicklungsstörungen, wobei *fosB*^{-/-} Mäuse ein verändertes Verhalten bei der Aufzucht und Pflege ihrer Nachkommen aufweisen (Brown et al., 1996). Dagegen zeigen *ATF2*^{-/-} Mäuse Defekte im Zentralnervensystem, während *c-fos*^{-/-} Mäuse einen veränderten Knochenmetabolismus aufweisen (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992; Reimold et al., 1993). Diese Tiere entwickeln Osteoporose, da es zu keiner terminalen Differenzierung von Osteoklasten kommt (Wang et al., 1992; Grigoriadis et al., 1994). Diese Befunde verdeutlichen, daß die einzelnen Mitglieder der Jun- und Fos-Familie

essentiell für bestimmte, auch unterschiedliche biologische Prozesse sind und daß es nicht bei allen Proteinen zu einer Kompensation durch andere Mitglieder der Familie kommt. Gleichzeitig sind diese Daten Hinweise dafür, daß die Mitglieder der AP-1 Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung spielen.

1.1.2. Die Rolle von c-Jun in Differenzierung und Proliferation

Die streng kontrollierte Regulation der Aktivität von AP-1 ist Voraussetzung für die postulierte Funktion dieses Transkriptionsfaktors in Proliferation und Differenzierung, zwei Prozesse, die sich oft gegenseitig ausschließen. Differenzierung geht oftmals mit einem Proliferationsstopp einher. So stellen PC12 Zellen nach Behandlung mit dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) ihre Proliferation ein und differenzieren zu Neuron-ähnlichen Zellen (Greene und Tischler, 1976; Wood et al., 1993; Cowley et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, daß eine der ersten Antworten der PC12 Zellen auf NGF die Aktivierung von c-Jun beinhaltet (Sassone Corsi et al., 1989; Wu et al., 1989). Die Differenzierung von omnipotenten Zellen, zu verschiedenen Zelltypen mit spezifischen biologischen Funktionen, beruht auf einer von Transkriptionsfaktoren unterschiedlich gesteuerten Genexpression. Die durch Retinsäure induzierte Differenzierung von undifferenzierten F9 Zellen (Teratokarzinom-Zelllinie) führt zur verstärkten Transkription von *c-jun* und zur Expression von Genen, die als Marker der verschiedenen Stadien der Differenzierung dienen (Ryder et al., 1989; Yang Yen et al., 1990b). Die Expression von c-Jun könnte somit bei der Expression verschiedener Markergene der Differenzierung beteiligt sein. In der Tat werden F9 Zellen durch Überexpression von c-Jun zur Differenzierung und Expression von endodermalen Markern induziert (Yang Yen et al., 1990b). Solche Markergene sind z.B. der Plasminogen Aktivator und Keratin-18, beides Gene die eine AP-1 Bindestelle in ihren Promotoren enthalten (Rickles et al., 1989; Oshima et al., 1990). Andererseits führt die Überexpression von c-Jun durch Hemmung von Myogenin oder MyoD zur Verhinderung der muskelspezifischen Differenzierung (Li et al., 1992; Su et al., 1991). Darüber hinaus ist c-Jun wichtig für die myeloide Differenzierung (Szabo et al., 1994; Patel und Sytkowski, 1995) und die Differenzierung von neuronalen Zellen (de Groot und Kruijer, 1991). Die Funktionen von Mitgliedern der AP-1 Familie in der Differenzierung kann durch „knock out“ Mäuse bestätigt werden. Das Fehlen von c-Fos hemmt die Differenzierung von Osteoklasten, wohingegen das Fehlen von

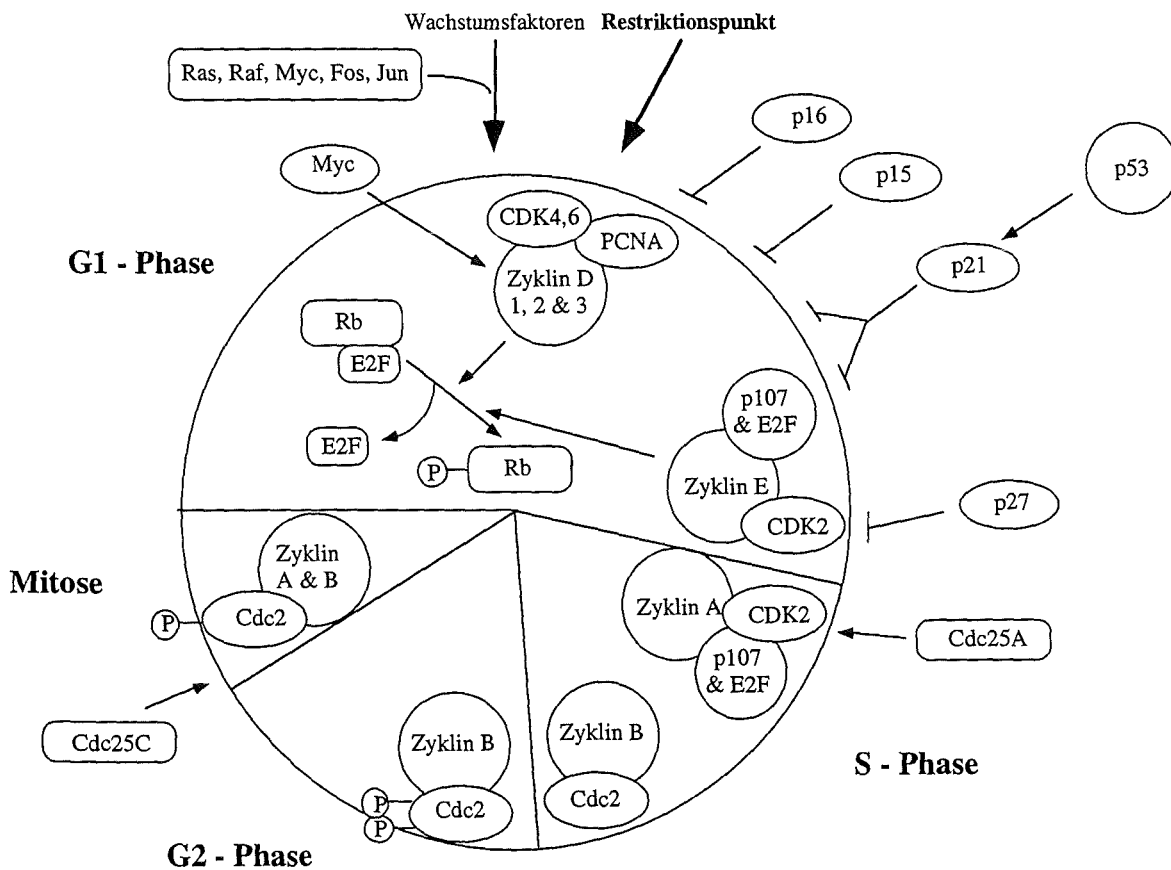
c-Jun zu Defekten in der Differenzierung von Leberzellen führt (Hilberg et al., 1993; Grigoriadis et al., 1994).

In Zellen die durch Entzug von Wachstumsfaktoren in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert wurden, führt die Stimulation mit Mitogenen zu einer schnellen Induktion der „immediate early“ Gene *c-fos* und *c-jun* (als Übersicht siehe Angel und Karin, 1991). Die Expression der *c-jun* RNA in logarithmisch wachsenden Zellen ist im Vergleich zu G₀-arretierten Zellen verstärkt (Angel et al., 1988). Die Mikroinjektionen von Antikörpern gegen c-Jun oder antisense-RNA führen zu einer verminderten DNA-Synthese und einer Arretierung der Zellen in der G₀-Phase (Kovary und Bravo, 1991; Riabowol et al., 1992; Smith und Prochownik, 1992). Zellen, die c-Jun überexprimieren, zeigen eine größere S/G₂-Phase-Population, die durch einen schnelleren Übergang von der G₁- in die S-Phase zustande kommt (Pfarr et al., 1994). All dies sind Hinweise, daß c-Jun in der Proliferation eine wichtige Rolle spielt. Zudem ist AP-1 in der durch Ras vermittelten Transformation beteiligt, da eine transdominant negativ wirkende Mutation von c-Jun diese Transformation hemmen kann (Lloyd et al., 1991 Smeal et al., 1991). Obwohl die Signalübertragung von Mitogenen, die einerseits zur Induktion von c-Jun führt und andererseits den Zellzyklus reguliert, gut untersucht ist, ist die Verknüpfung zwischen c-Jun und der Regulation des Zellzyklus noch unklar (Cano und Mahadevan, 1995; Karin, 1995; Karin und Hunter, 1995). Da dies eine zentrale Fragestellung in der vorliegenden Arbeit ist, werde ich die wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus vorstellen, die als potentielle Ziele von c-Jun abhängigen Kontrollmechanismen dienen könnten.

1.2. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen läßt sich, wie in Schema 2 vereinfacht dargestellt, in vier Abschnitte einteilen: G₁- (Gap=Lücke), S- (Synthese der DNA), G₂- und M- (Mitose) Phase. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt, die dann während der M-Phase zu gleichen Teilen in die beiden Tochterzellen weitergegeben wird. Die Übergänge zwischen den jeweiligen Zellzyklusphasen sind streng kontrolliert - die molekularen Mechanismen dieser Kontrollen werden im nächsten Kapitel genauer erklärt. Zusätzlich gibt es noch zwei Kontrollpunkte, wobei sich der erste in der G₁-Phase befindet und als Restriktionspunkt bezeichnet wird. Der zweite Kontrollpunkt reguliert den Übergang von der G₂- in die M-Phase, allerdings ist

dieser Mechanismus noch nicht aufgeklärt. Zu Beginn der G1-Phase sind die Zellen empfindlich für eine Vielzahl von Stimuli, wie Wachstumsfaktoren oder Cytokine. Erst nach Erreichen des Restriktionspunktes in der zweiten Hälfte der G1-Phase, wenn die Zelle ausreichend für die DNA-Synthese ausgestattet ist (Zellgröße, Proteinstatus, essentielle Aminosäuren und Nukleotide), können die Zellen in die S-Phase eintreten (Pardee, 1989). Ungünstige Wachstumsbedingungen wie Nährstoffmangel oder DNA-Schäden können aber dafür sorgen, daß die Zellen reversibel in der G1-Phase (oft auch als G0-Phase bezeichnet) arretieren (als Übersicht siehe Sherr, 1994).



Hunter, T. and Pines, J. (1994) Cell 79, 573-583

Schema 2: Darstellung der Regulation des Zellzyklus. Erläuterungen siehe Text.

1.2.1. Die Zykline der G1-Phase und ihre Regulation

Schlüsselregulatoren der G1-Phase, der längsten Phase des Zellzyklus, sind die D-Zykline (Zyclin D1, -D2, -D3), die mit den Kinasen (Zyclin-abhängigen Kinasen) CDK4 oder CDK6 einen aktiven Komplex bilden, sowie Zyclin E, das mit CDK2 einen Komplex bildet (Übersicht in Sherr, 1993 und 1994).

Die Zykline D1, D2 und D3 werden nach Mitogenstimulation transkriptionell induziert und so lange exprimiert wie die Stimulation mit Wachstumsfaktoren anhält. Die D-Zykline zeigen keine größeren Schwankungen in ihrer Expression während der einzelnen Zellzyklusphasen, wobei die stärkste Expression kurz vor dem Übergang von der G1- in die S-Phase vorliegt (als Übersicht siehe Sherr, 1994). Werden den Zellen allerdings Wachstumsfaktoren entzogen, so findet ein schneller Abbau der Zykline statt, was zur Folge hat, daß die Zellen nicht mehr von der G1- in die S-Phase gelangen können.

Hinweise, aus transienten Transfektionsstudien, die zeigen, daß die Expression von Zyclin D1 durch c-Jun induziert werden kann, lassen darauf schließen, daß c-Jun die Expression von Zyclin D1 reguliert (Herber et al., 1994). Ob dies jedoch ein physiologisch relevanter Mechanismus ist, muß noch bestätigt werden.

Die Kinasen werden konstant während des Zellzyklus exprimiert, jedoch ist für ihre Aktivität eine Bindung an die jeweiligen Zykline notwendig. Mikroinjektionen von Antikörpern gegen Zyclin D1 in Fibroblasten lassen erkennen, daß Zyclin D und die abhängigen Kinasen in der mittleren bis späten G1-Phase wichtig sind (Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993). Die Aktivität der Zyclin D-abhängigen Kinase-Komplexe tritt während der Mitte der G1-Phase auf und ist bis zum Übergang in die S-Phase nachzuweisen (Matsushime et al., 1994; Meyerson und Harlow, 1994). Im Zyclin D-CDK-Komplex ist auch PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) enthalten.

Im Gegensatz zu den Zyklinen D1, D2 und D3 wird Zyclin E periodisch im Zellzyklus exprimiert (Maximum gegen Ende der G1-Phase). Es bildet zusammen mit CDK2 einen Komplex, der beim Übergang von der G1- in die S-Phase aktiv ist (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992). Sobald sich die Zellen in der S-Phase befinden, wird Zyclin E durch Ubiquitinierung wieder abgebaut und die freie CDK2 bildet mit Zyclin A einen Komplex. Wird die Funktion von CDK2 gehemmt, können die Zellen nicht in die S-Phase übergehen (Pagano et al., 1993; Tsai et al., 1993; van den Heuvel und Harlow, 1993). Die Überexpression der Zykline E und D kann die Dauer der G1-Phase verkürzen, zu einer reduzierten Zellgröße führen und die Abhängigkeit der Zellen

gegenüber Mitogenen reduzieren (Ohtsubo und Roberts, 1993; Quelle et al., 1993; Resnitzky et al., 1994).

Die Zykline der G1-Phase phosphorylieren das Retinoblastom Protein (pRb) und pRb-verwandte Proteine, wie p107 oder p130. Die D-Zykline können im Gegensatz zu Zyklin E oder A direkt an pRb binden (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993), wodurch CDK4 in die Nähe seines Substrates gebracht wird. Zyklin D-CDK4 und Zyklin D-CDK6 phosphorylieren bevorzugt pRb, während Zyklin E- und Zyklin A-CDK2 präferentiell Histon H1 als Substrat benutzen (Matsushime et al., 1992; Meyerson und Harlow, 1994). Andere mögliche Substrate der CDKs sind Komponenten des Prä-Initiationskomplexes der DNA-Replikation (Sherr, 1996). Unphosphoryliertes pRb bildet zusammen mit den Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und den Dimerisierungs-Proteinen (DP) einen Komplex. Durch diese Komplexbildung wird die Aktivität von E2F inhibiert und Zielgene von E2F, zu denen Zyklin E, Zyklin A, cdc2, DNA-Polymerase α , Dihydrofolatreductase und E2F selbst gehören, werden nicht transkribiert (als Übersicht siehe Bartek et al., 1997). Wird nun pRb im Laufe der G1-Phase von Zyklin D-CDK4/6 oder Zyklin E-CDK2 phosphoryliert, so kann E2F aus dem Komplex dissoziieren und zur transkriptionellen Aktivierung seiner Zielgene führen, die wichtig für das weitere Fortschreiten im Zellzyklus sind (als Übersicht siehe Nevins et al., 1991).

Sowohl CDK2, als auch CDK4/6 werden zur Aktivierung an einem einzigen Threonin (160 bei Cdc2 oder 161 bei CDK2) modifiziert. Die dafür verantwortliche Kinase ist die CAK (CDK aktivierende Kinase), die aus einer katalytisch aktiven Untereinheit (als MO15 oder CDK7 bezeichnet) und aus Zyklin H besteht (Fisher und Morgan, 1994). Da diese Kinase-Aktivität sich im Laufe des Zellzyklus nicht verändert, ist anzunehmen, daß die Bindung von CAK an die jeweiligen Zyklin-assoziierten Kinasen im Zellzyklus reguliert ist (als Übersicht siehe Morgan, 1995). Im Gegensatz zu dieser aktivierenden Phosphorylierung werden die CDKs auch an zwei weiteren Aminosäuren (Thr 14 und Tyr 15) innerhalb ihrer ATP-Bindestelle durch noch nicht näher charakterisierte Kinasen phosphoryliert, was auf ihre Kinase-Aktivität inhibitorisch wirkt (De Bondt et al., 1993).

1.2.2. Inhibitoren

Die Aktivität der Zykline und ihrer assoziierten Kinasen -und davon abhängig die Regulation des Zellzyklus- wird zusätzlich über die CKIs (CDK Inhibitoren) kontrolliert. Der erste charakterisierte Inhibitor ist p21 (p21^{WAF, CIP}, im Weiteren nur noch als p21 bezeichnet). p21 bindet bevorzugt an die Zyklin D-CDK4/6- als auch an die Zyklin E-CDK2-Komplexe, die beide während der G1-Phase aktiv sind, und inhibiert deren Kinase-Aktivität (als Übersicht siehe Sherr, 1994; Sherr und Roberts, 1995). p21 kann aber auch an PCNA binden und es dadurch hemmen. Die Bindung von p21 an PCNA oder Zyklin-CDK-Komplexe erfolgt über unterschiedliche Domänen von p21 (Chen et al., 1995; Luo et al., 1995; Nakanishi et al., 1995). Weitere Mitglieder dieser Familie sind p27 (p27^{KIP1}) und p57 (p57^{KIP2}), die ähnlich wie p21 einen ternären Komplex mit einer Vielzahl von Zyklin-CDK-Komplexen (die aus Zyklin A, B, D, und E und den jeweiligen CDKs bestehen) bilden und diese dadurch hemmen (als Übersicht siehe Sherr, 1996). Im Gegensatz zu den Inhibitoren p21, p27 und p57 binden die Mitglieder der INK4-Familie (Inhibitoren der CDK4) in einem binären Komplex an CDK4 oder CDK6 und verhindern somit die Assoziation mit den Zyklinen D1, D2 oder D3 (Übersicht in Harper und Elledge, 1996). Die vier Mitglieder p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} inhibieren somit die Zyklin D-abhängige Kinase-Aktivität, was zur Hemmung der pRb-Phosphorylierung führt und die Zellen in der G1-Phase arretiert.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 könnte in den Zellzyklus über die Regulation der Expression von Zyklinen und CDKs oder auch einiger Inhibitoren eingreifen, z.B. über die Regulation von p21. Dabei wäre eine direkte Bindung von c-Jun an den Promotor von p21 denkbar. Die Transkription von p21 wird abhängig von der Expression des Tumorsuppressors p53 reguliert (El-Deiry et al., 1993). Dadurch wäre auch ein indirekter Mechanismus der c-Jun-abhängigen p21 Regulation, bei der die Expression von p53 verändert wäre, möglich.

1.3. Der Tumorsuppressor p53

Der Einfluß von p53 auf den Zellzyklus beruht auf der transkriptionellen Regulation des Zellzyklusinhibitors p21, der, wie bereits erwähnt, Zyklin-abhängige Komplexe hemmt und somit den Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert.

1.3.1. Funktionen von p53 in der Regulation des Zellzyklus

Nach Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien führt die erhöhte Expression von p53 zur transkriptionellen Aktivierung seines Zielgens p21 (El-Deiry et al., 1993). p21 bindet außer an Zykline und deren assoziierten Kinasen auch an den C-terminalen Bereich von PCNA, wodurch die Aktivität der DNA-Polymerase δ (PCNA ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ) während der Replikation, aber nicht während der Reparatur gehemmt wird. Zellen, denen p21 fehlt, zeigen eine deutliche Verminderung des Arretierens der Zellen in der G1-Phase nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien (Deng et al., 1995). Wildtyp Zellen arretieren in der G1-Phase, um die DNA-Schäden noch vor Eintritt in die S-Phase und Replikation der DNA reparieren zu können. Da bei den p21^{-/-} Zellen keine vollständige Aufhebung des G1-Arrestes vorkommt, liegt die Vermutung nahe, daß es noch andere Signalwege des p53-vermittelten Arrests gibt. So wird in einigen Zelltypen durch eine verstärkte Expression eines anderen Zielgens von p53, GADD45, eine Hemmung der Zellen in der G1-Phase erreicht (Levine, 1997). Jedoch führt das Ausschalten von p21 in der Krebs-Zelllinie HCT116 mit intaktem p53 zu einem fehlenden Arrest der Zellen in der G1-Phase, was darauf schließen läßt, daß in diesem System p21 völlig ausreicht, einen p53-vermittelten G1-Block hervorzurufen (Polyak et al., 1996). Zudem führt das Ausschalten von p21 in diesen Zellen zum Auslösen der Apoptose.

Die Arretierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus geschieht über eine ineffiziente Phosphorylierung von pRb, da die Zyklin-abhängigen Kinasen von p21 gehemmt werden. Daraufhin wird E2F nicht aktiviert, wodurch es zu einer Hemmung des Übergangs von der G1- in die S-Phase kommt. Zusätzlich ist p53 auch an einem Kontrollpunkt beteiligt (G2/M-Phase), der die Replikation der DNA im Falle eines Defekts der mitotischen Spindel hemmt (Cross et al., 1995). Die Zahl der Zentrosomen untersteht unter anderem der Kontrolle von p53 (Fukasawa et al., 1996). So haben p53^{-/-} Zellen eine erhöhte Zahl von Zentrosomen, was dazu führt, daß diese Zellen nach einigen Teilungen in der Zellkultur aneuploid werden (Fukasawa et al., 1996).

Bei DNA-schädigenden Agenzien kommt es aufgrund der post-transkriptionellen Modifikationen zu einer schnellen Akkumulation von p53. Zu diesem Zeitpunkt fällt die Zelle die Entscheidung, ob sie in einen G1-Arrest übergeht oder durch Apoptose stirbt (als Übersicht siehe Ko und Prives, 1996). So führen DNA-Schäden, das Fehlen von Wachstumsfaktoren, oder die Expression von Myc oder E1A zu einer durch p53-

vermittelte Apoptose (Yonish Rouach et al., 1991; Clarke et al., 1993; Debbas und White, 1993; Lowe und Ruley, 1993; Wagner et al., 1994). p53 defiziente Thymocyten gehen nach DNA-Schäden nicht in die Apoptose und unterscheiden sich damit deutlich von den Wildtyp Thymocyten (Lowe et al., 1993). Jedoch muß auch festgehalten werden, daß nicht alle apoptotischen Prozesse zwangsläufig von p53 abhängig sind.

Um die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren, muß p53 als Transkriptionsfaktor aktiv sein. Für die p53-vermittelte Apoptose ist allerdings keine transkriptionelle Aktivität von p53 erforderlich. So führt die Hemmung der Transkription und Translation durch Actinomycin D oder Cycloheximid nicht zu einer verminderten p53-abhängigen Apoptose (Caelles et al., 1994; Wagner et al., 1994).

In einigen Zelltypen löst p53 Apoptose aus, in anderen hingegen führt es nach den gleichen Signalen zu einem Arretieren der Zellen in der G1-Phase. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten sind jedoch noch nicht bekannt. Allerdings verursacht das Ausschalten von p21 in Zellen, die sonst in einem G1-Block arretiert werden würden, die Induktion der Apoptose (Polyak et al., 1996). Die genetische Beschaffenheit einer Zelle spielt somit bei der Entscheidung, in der G1-Phase zu arretieren oder durch Apoptose zu sterben, eine große Rolle (Chen et al., 1996a). Das Zusammenspiel des p53- und pRb-Signalweges ist in der biologischen Entscheidung einer Zelle nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien ebenfalls von Bedeutung. Das Ausschalten von pRb führt nach DNA-schädigenden Agenzien nicht zu einem Block in der G1-Phase, sondern zum Auslösen der Apoptose (Morgenbesser et al., 1994). Darüber hinaus hemmt die Überexpression von pRb p53-vermittelte Apoptose (Haupt et al., 1995).

1.3.2. Die Regulation von p53

In mehr als 50% aller menschlichen Krebsfälle ist das Tumorsuppressorgen p53 mutiert, wobei diese Mutationen in mehr als 50 Zell- und Gewebetypen nachgewiesen wurden (Hollstein et al., 1994; Hollstein et al., 1996). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der neben dem Zellzyklusinhibitor p21 noch weitere Gene reguliert. Dazu gehört MDM2, ein Proto-Onkogen, das p53-vermittelte Transkription hemmt. MDM2, das transkriptionell von p53 aktiviert wird, bindet an p53 und hemmt dadurch dessen transkriptionelle Aktivität (Autoregulation von p53). Weitere p53-regulierte Gene sind GADD45, das nach DNA-Schäden induziert wird und in der

Exzisions-Reparatur von Bedeutung ist; Zyklin G, dessen Funktion noch nicht bekannt ist; Bax, ein Mitglied der Bcl2-Familie, das die Apoptose aktiviert, sowie IGF-BP3, das „Insulin-like growth factor“ bindende Protein, das die Signalübertragung eines mitogenen Wachstumsfaktors hemmt (als Übersicht siehe Ko und Prives, 1996; Levine, 1997). Die oben angeführten Gene enthalten eine DNA-Sequenz, die als Erkennungssequenz für p53 dient. Es wurde jedoch auch eine Vielzahl von p53-abhängigen Genen beschrieben, die keine p53 Konsensus-Bindestelle enthalten (Polyak et al., 1997).

Das menschliche p53 enthält 393 Aminosäuren, wobei der N-terminale Bereich für die transkriptionelle Aktivierung wichtig ist, die durch Bindung von inhibitorischen Proteinen wie E1B-55kD und MDM2 in diesem Bereich gehemmt werden kann (Lin et al., 1994). Die DNA-Bindedomäne von p53 enthält ein Zn^{2+} -Ion, das für die Bindung an die DNA wichtig ist (Cho et al., 1994). p53 bindet als Tetramer an die p53-Konsensus-DNA-Sequenz. Mehr als 90% aller Mutationen von p53 liegen in der DNA-Bindedomäne. Der C-terminale Bereich ist für die Oligomerisierung des Proteins wichtig. Der äußerste C-terminale Bereich enthält 26 Aminosäuren, die eine offene, Protease-sensitive Domäne bilden, die 9 basische Aminosäuren enthält und an die DNA oder RNA bindet (Lee et al., 1995). Die Proteinmengen von p53 in einer Zelle sind relativ gering, sie werden aber durch extrazelluläre Signale wie Gamma-Strahlen oder UV-Bestrahlung erhöht. Der Anstieg der Proteinmenge beruht auf einer Erhöhung der Halblebenszeit von ca. 30 Minuten in unbehandelten Zellen auf ca. 150 Minuten in UV-bestrahlten Zellen (Maltzman und Czyzyk, 1984). Eine erhöhte Initiation der Translation der bereits vorliegenden mRNA könnte auch zum Anstieg der Proteinmengen beitragen (Mosner et al., 1995). MDM2, das wie bereits erwähnt an p53 bindet, beschleunigt den Abbau von p53 wahrscheinlich durch Ubiquitinierung (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Da mutierte p53-Proteine MDM2 transkriptionell nicht aktivieren können, führt die verstärkte Expression von p53 zu keiner erhöhten Expression von MDM2 und somit auch nicht zu einem verstärkten Abbau von p53 durch MDM2, wodurch die verlängerte Halbwertszeit von mutiertem p53 erklärt werden kann.

1.4. Die Apoptose

p53 ist der Regulator, der entscheidet, ob eine Zelle nach DNA-schädigenden Agenzien in die Apoptose geht oder ob während eines G1-Blocks die DNA-Schäden repariert werden. Der Einfluß von p53 auf die Apoptose wird auch dadurch unterstrichen, daß pro-apoptotische Gene als Zielgene von p53 beschrieben wurden. Dazu gehören Bax und IGF-BP3 (Buckbinder et al., 1995; Miyashita und Reed, 1995).

1.4.1. Die Regulation der Apoptose

Die Homöostase des Gewebes beruht auf einem Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung, Wachstumshemmung und Zelltod. Die Zellen können auf zwei verschiedene Weisen absterben, nekrotisch oder apoptotisch (als Übersicht siehe Cohen, 1993). Nekrose ist die passive Form des Absterbens, die aufgrund physikalischer und chemischer Einwirkungen die Zelle zerstört. Während Nekrose beim Absterben der Zelle zu Entzündungsreaktionen führt, ist dies bei der Apoptose nicht der Fall. Apoptose ist also die physiologische Form des Zelltodes, die auf einem endogenen Programm beruht, das in verschiedenen Lebewesen konserviert ist und mit dem Selbstmord der Zelle endet. Die Apoptose kommt in verschiedenen Zelltypen vor und verläuft stets nach dem gleichen Muster (als Übersicht siehe Cohen, 1993). Die sterbende Zelle löst sich von den Nachbarzellen ab, schrumpft und bildet bläschenförmige Ausstülpungen. Das Chromatin im Kern kondensiert und der Zellkern zerfällt in Chromatin enthaltende Fragmente. Diese Fragmente werden zusammen mit intakten Organellen abgeschnürt und von den Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert. Solche Abschnürungen, die apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“), die im Elektronenmikroskop sichtbar sind, können meist nur innerhalb phagozytierender Zellen beobachtet werden, was ein Hinweis dafür ist, daß der Prozeß der Phagozytose sehr schnell abläuft. Doch auch Prozesse wie DNA-Fragmentierung, Vernetzung und Spaltung zellulärer Proteine, wie z.B. Lamin, sind während der Apoptose zu beobachten. Die Aktivierung $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängiger Endonukleasen führt zur DNA-Fragmentierung. Das Enzym Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) wird während der Apoptose gespalten. Die bei der Spaltung beteiligten Proteasen, die sogenannten ICE-Proteasen, zu denen auch das Interleukin-1 β konvertierende Enzym gehört, werden als inaktive Proenzyme synthetisiert und

durch Spaltung aktiviert. ICE spaltet das 31 kDa inaktive Interleukin-1 β (IL-1 β) in die aktive, 17,5 kDa Form. Die Überexpression von ICE führt zur Apoptose in diesen Zellen (Gagliardini et al., 1994), was eine Beteiligung dieser Protease in der Apoptose vermuten läßt. Da die Spaltstellen in den jeweiligen Proenzymen typische Erkennungssequenzen der ICE-Proteasen enthalten, nimmt man eine kaskadenartige Aktivierung der Enzyme während der Apoptose an. Spezifische Peptidinhibitoren und virale Inhibitoren wie CrmA aus Kuhpockenviren und p35 aus Bakuloviren, die die Apoptose hemmen können, unterstreichen die Beteiligung dieser Proteasen in der Apoptose (Ray et al., 1992; Bertin et al., 1996).

1.4.2. Apoptose durch Todesrezeptoren

Wie kann Apoptose ausgelöst werden? Die bisher beschriebenen Vorgänge laufen innerhalb der Zelle ab und lassen darauf schließen, daß es ein Selbstmordprogramm der Zelle ist, das diese selbst auslöst. Jedoch führt die Entdeckung von Todesrezeptoren, die von bestimmten Liganden aktiviert werden können, zu der Annahme, daß es auch ein „Töten von außerhalb“ geben kann. Ein Ligand, der durch die Bindung an seinen Rezeptor Apoptose auslösen kann, ist der CD95 Ligand (auch ApoL oder FasL genannt). Er ist ein Mitglied der TNF-Familie, zu der neben TNF auch Lymphotoxin, CD30 Ligand, TRAIL („TNF-related apoptosis inducing factor“) u.v.a. gehören (als Übersicht siehe Nagata, 1997). In lymphoiden Zellen wird die Expression des CD95 Liganden in Abhängigkeit von AP-1 und NF- κ B reguliert (Kasibhatla et al., 1998). Der Rezeptor CD95 (auch Fas oder APO-1 genannt), an den der CD95 Ligand bindet, gehört zu der umfangreichen Familie der TNF-Rezeptoren. Durch die Bindung des Liganden findet eine Oligomerisierung (wahrscheinlich Trimerisierung) des zytoplasmatischen Bereiches des Rezeptors statt, die dann das Signal weiterleitet. An diesen aktivierten Rezeptor binden nun andere Proteine, die eine sogenannte FADD-Domäne (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) enthalten. Die Interaktion findet über diese „Todesdomäne“ statt (Kischkel et al., 1995). Über weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen werden nun auch die ICE-Proteasen kaskadenartig aktiviert, die zelluläre Proteine spalten, die letztendlich zu der veränderten Morphologie beitragen. Wenn die Apoptose erst einmal ausgelöst wurde, ist sie im Gegensatz zu Proliferation oder Differenzierung, bei denen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen beteiligt sind, irreversibel.

Es gibt Hinweise, daß AP-1 in der Apoptose bzw. im Überleben der Zellen eine Rolle spielt. Die Hemmung von UV-induzierten Signaltransduktionswegen, die AP-1 aktivieren, führt zu einer Sensitivität der Zellen gegenüber UV. So zeigen HeLa Zellen, die mit Thyrosinkinase-Inhibitoren behandelt wurden, ein verringertes Überleben nach Bestrahlung mit UV im Vergleich zu Zellen, die nur mit UV behandelt wurden (Devary et al., 1992). Dies ist ein Hinweis dafür, daß AP-1 im Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit UV eine wichtige Rolle spielen könnte. In der Tat sind Zellen, die kein c-Fos exprimieren hypersensitiv gegenüber UV-Bestrahlung. Diese Zellen weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte UV-induzierte Apoptoserate auf (Schreiber et al., 1995). Andererseits wurde durch die Überexpression von c-Jun in NIH 3T3 Fibroblasten Apoptose ausgelöst (Bossy Wetzell et al., 1997). Umgekehrt führt die Expression einer dominant negativen Mutante von c-Jun in neuronalen Zellen und in Leukämiezellen zu einer Hemmung der Apoptose (Ham et al., 1995; Verheij et al., 1996). Dies läßt vermuten, daß verschiedene AP-1 Untereinheiten unterschiedliche Gruppen von Zielgenen aktivieren können, deren Genprodukte wichtige Funktionen in der Regulation der Apoptose oder im Überleben einnehmen.

1.5. Fragestellung

Gegenwärtig ist nicht bekannt, welche Rolle die einzelnen Mitglieder der AP-1 Familie in der Zellproliferation oder in der Apoptose einnehmen. Die Regulation von AP-1 beruht auf der Phosphorylierung und Aktivierung der einzelnen Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF-Familien, jedoch werden nicht alle Mitglieder im gleichen Maße aktiviert. Andererseits haben die einzelnen Dimere, die aus den verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind, unterschiedliche Bindungsaffinitäten und Transaktivierungskapazitäten. Die Messung der Gesamtaktivität von AP-1 oder die Untersuchung von bisher bekannten AP-1 regulierten Genen bieten jedoch keine Möglichkeit, den Beitrag der individuellen Proteine bei diesen Prozessen zu bestimmen. Auch die Verwendung von transdominant-negativ wirkenden Mutanten von c-Jun erlaubt keine schlüssige Aussage über die Bedeutung eines *einzelnen* Mitgliedes von AP-1. Das am besten geeignete System, um die spezifischen Funktionen von c-Jun in AP-1 abhängigen Prozessen zu untersuchen, sind Zellen, die kein funktionelles c-Jun Protein mehr haben. Mit Hilfe solcher *c-jun*^{-/-} Zellen, die aus

c-jun^{-/-} Mausembryonen isoliert und durch stetiges Kultivieren spontan immortalisiert wurden, können folgende Fragen beantwortet werden:

Welche Rolle spielt c-Jun in der Zellproliferation und im Übergang der einzelnen Phasen des Zellzyklus? Was sind die kritischen Angriffspunkte? Wie wird die transkriptionelle Aktivierung von AP-1 abhängigen Genen durch Strahlung und chemische Mutagene durch das Fehlen von c-Jun beeinflusst und wie wirkt sich dies auf die Apoptose und die zelluläre Schutzfunktion gegenüber genotoxischer Substanzen aus?



2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Bezugsquellen

Allgemein gebräuchliche Chemikalien	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Sigma, München
Acrylamid/N,N'-	
Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Typ I)	Appligene, Heidelberg
APS	BioRad, München
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
dNTPs	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, München
DMEM	Gibco, Eggenstein
Eichproteine, gefärbt	BioRad, München
FCS	Gibco, Eggenstein
Gene Screen-Membran	NEN Life Science Products, Köln
Histon H1	Boehringer, Mannheim
Hybond N ⁺ -Membran	Amersham, Braunschweig
MMS	Serva, Heidelberg
MNNG	Serva, Heidelberg
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
NTPs	Boehringer, Mannheim
pdI/dC	Pharmacia, Freiburg
RNase A	Sigma, München
Röntgenfilme (Fuji RX)	Siemens AG, Stuttgart
Sephadex G25 und G50	Pharmacia, Freiburg
TEMED	Sigma, München

TPA	Sigma, München, bzw. Abt. Prof. Hecker, Heidelberg
Whatman 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen

2.1.2. Radiochemikalien

α ³²P-dCTP 370 MBq/ml

γ ³²P-ATP 370 MBq/ml

Methyl [³H-] Thymidine 37 MBq/ml

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

2.1.3. Antikörper

alle unten genannten Antikörper sind gegen Maus-Antigene gerichtet

α Zyklin A	M. Pagano, New York, USA
α Zyklin D1	DCS11, J. Bartek, Kopenhagen, Dänemark HD11 (sc-246), Santa Cruz, Heidelberg,
α Zyklin D2	M20 (sc-593), Santa Cruz, Heidelberg
α Zyklin D3	C16 (sc-182), Santa Cruz, Heidelberg
α Zyklin E	M20 (sc-481), Santa Cruz, Heidelberg
α CDK2	M2 (sc-163), Santa Cruz, Heidelberg
α CDK4	C22 (sc-260), Santa Cruz, Heidelberg
α CDK6	C21 (sc-177), Santa Cruz, Heidelberg
α p53	CM1 und CM5, Medac, Hamburg
α p21	C19 (sc-397) und M19, Santa Cruz, Heidelberg
α p27	C19 (sc-528), Santa Cruz, Heidelberg
α p16	M157 (sc-1208), Santa Cruz, Heidelberg
α PCNA	PC19 (sc-056), Santa Cruz, Heidelberg
α JNK1	FL (sc-572), Santa Cruz, Heidelberg
α JNK2	C17 (sc-5474), Santa Cruz, Heidelberg
α p38-P	Phospho-specific p38 MAPK, NEB 9211, Biolabs, Schwalbach

α JNK-P	Phospho-specific SAPK/JNK (Thr 183/ Tyr185), NEB 9251 Biolabs, Schwalbach
α JunB	N17, (sc-046) Santa Cruz, Heidelberg
α c-Jun	cJ1.4, M. Yaniv, Paris, Frankreich
α JunD	125.5 JD, M. Yaniv, Paris, Frankreich
α p65/NF- κ B	N. Rice, Frederick, USA
α I κ B α	C21 (sc 371), Santa Cruz, Heidelberg
α CD95R	Jo2, Pharmingen, Hamburg

Sekundäre Antikörper:

Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

2.1.4. Proben für Northern-Blot Analysen

GAPDH:	PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort et al., 1985)
<i>c-jun</i> :	HindIII/PstI-Fragment des Plasmids RSV-c-Jun (Angel et al., 1988)
<i>c-fos</i> :	PstI-Fragment des Plasmids pUC7vfos (Rahmsdorf et al., 1987)
Kollagenase:	PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mColl-1 (Gack et al., 1994)
Stromelysin-1:	PstI/SacII-Fragment des Plasmids pBl-mStrom-1 (Gack et al., 1994)

2.1.5. Oligonukleotide für Gelretardations-Analysen

mKoll AP-1	5'-AGCTAAAGTGGTGACTCATCACTAT-3' 5'-AGCTATAGTGATGAGTCACCACTTT-3'
HIV (-92/-72)	5'-AGCTTG GGGACTTTCCAGCCG-3' 5'-GATCCGGCTGGAAAGTCCCCA-3'

2.1.6. Primer für PCR

CD95L 5'	5'-CAGCAGTGCCACTTCATCTTGG-3'
CD95L 3'	5'-TTCACTCCAGAGATCAGAGCGG-3'

Dieses Primerpaar führt zur Amplifizierung (aus cDNA) eines ca. 550bp großen DNA-Fragments.

β -Tubulin 5' 5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'

β -Tubulin 3' 5'-GGAACATAGCCGTAAACTGC-3'

Dieses Primerpaar führt zur Amplifizierung (aus cDNA) eines 317bp großen DNA-Fragments.

2.1.7. Lösungen und Puffer

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl ₂ ; 0,6 mM MgCl ₂ ; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,6
20x SSC:	3 M NaCl; 0,25 M Na-Citrat; pH 6,5
TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE:	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

2.1.8. Zellen

Wildtyp Fibroblasten

3T3-j56, 3T3-f20

nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963) immortalisierte Mausfibroblasten; von M. Schreiber und E. F. Wagner zur Verfügung gestellt; in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp Fibroblasten bezeichnet

Fibroblasten die kein funktionelles c-Jun mehr haben:

3T3-j55/2, 3T3-j55/3

nach dem 3T3 Protokoll (Todaro und Green, 1963) immortalisierte Mausfibroblasten; von M. Schreiber und E. F. Wagner zur Verfügung gestellt; in der vorliegenden Arbeit als *c-jun*^{-/-} Fibroblasten bezeichnet

2.2. Methoden

2.2.1. DNA- und RNA-Techniken

2.2.1.1. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Einer $OD_{260} = 1$ entsprechen 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA.

Zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wurde außerdem die OD bei 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,6 und 2,0 kann die DNA ohne weitere Reinigung verwendet werden.

2.2.1.2. Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987)

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 ml Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl, 0,1% Antifoam, 100 mM β -Mercaptoethanol) überschichtet. Die so lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst und mittels einer Injektionsspritze nach mehrmaligem Auf- und Abziehen, zur Scherung der genomischen DNA, in ein steriles 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 μl 2 M Ammoniumacetat (pH 4,0) wurde mit 2 ml wassergesättigtem Phenol gut ausgeschüttelt, danach wurden 400 μl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und erneut geschüttelt (ca. 1 Minute). Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 4°C wurde das Gemisch abzentrifugiert (10.000 upm 20 Minuten; 4°C) und die wäßrige Phase mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die RNA wurde ca. 1 Stunde bei -20°C gefällt und erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem Ethanol (80%) getrocknet, in 100 μl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration bestimmt.

2.2.1.3. RT-PCR

Jeweils 1 μg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 20 μl mit den Oligonukleotid-Primern „Random Hexamer“ (Gibco) wie folgt revers transkribiert: 5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM Desoxynukleotid-triphosphate, 50 pmol Primer, 2,5 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 1,7 U RNase-

Inhibitor. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 42°C inkubiert, danach 5 Minuten bei 95°C denaturiert und schließlich auf Eis gestellt. In der daran anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Perkin-Elmer-Cycler (Norwalk, USA): 1/10 Volumen 10xPCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM MgCl₂), 1/10 Volumen 10xdNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10xPrimer (100 pmol), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen (20-25 µl) aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 Minute, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur für 1 Minute und die DNA-Synthese bei 72°C für 1-2 Minuten. Die Amplifikationsprodukte (nach 35 Zyklen) wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

2.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden, je nach Größe der zu trennenden Fragmente, horizontale Agarosegele mit 0,4% bis 2% Agarosegehalt eingesetzt. Die entsprechende Agarosemenge wurde dafür in TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, verdampftes Wasser ersetzt und Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde das Gel in das Gelbett mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 1/10-Volumen 10x Auftragungspuffer (25% (w/v) Ficoll 400, 0,25% (w/v) Bromphenolblau und 0,25% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die ausgesparten Geltaschen aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnten die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

2.2.1.5. Southern-Blot

Vor dem Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Gene Screen-Membran wurde die DNA in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl zu Einzelstängen denaturiert. Danach wurde die DNA mittels Kapillarkräften, in 10x SSC, auf die Membran transferiert (Blot). Der Aufbau des Blots war wie folgt: Glasplatte, 3 Lagen mit

10x SSC getränktem 3MM-Papier, DNA-Gel, Membran, 3 Lagen 3MM-Papier, ein Stapel Kleenex und eine Glasplatte, die mit Gewicht beschwert wurde. Nach dem Blotten (über Nacht) wurde die Membran, zur Fixierung der DNA an die Membran, 2 Stunden bei 80°C inkubiert und danach mit UV C (254 nm, 1.200 Joule) bestrahlt.

2.2.1.6. Isolierung von genomischer DNA

Zum Nachweis der apoptotischen DNA als DNA-Leiter wurde die genomische DNA aus behandelten Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen in Lysispuffer (1% NP-40, 20 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5) aufgeschlossen und 5 Minuten zentrifugiert (500 upm). Danach wurde der Überstand 2 Stunden mit RNase A (1mg/ml, in 1% SDS) und weitere 2 Stunden mit Proteinase K inkubiert. Die DNA wurde mit 5 M Ammoniumacetat und dem 2,5fachen Volumen Ethanol gefällt und danach elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.7. Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung der RNA wurden horizontale Gelkammern verwendet. Dazu wurden 3,5 g Agarose mit 12,5 ml 20x MOPS (400 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure), 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7) in 250 ml Wasser durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, und nach Abkühlen auf 65°C in das Gelbett mit Kamm gegossen. 20-30 µg Gesamt-RNA wurden in der SpeedVac eingetrocknet, in 20 µl Denaturierungspuffer (6% deionisiertes Glyoxal und 50% DMSO) gelöst und acht Minuten bei 50°C denaturiert. Vor dem Laden des Geles wurden die Proben noch mit 4 µl Ladepuffer (50% Glycerin, 0,4% Bromphenolblau und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid) vermengt. Die Auftrennung erfolgte unter Umwälzen des MOPS-Puffers bei konstanter Spannung.

2.2.1.8. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht fotografiert und die 18S- und 28S-RNA markiert. Das Gel wurde auf einer Glasplatte plaziert, worauf sich 3MM-Papier, mit 20x SSC getränkt, befand. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Nylon-Membran (Hybond N⁺) gelegt, auf diese wiederum 3-lagig 3-MM-Papier (ebenfalls mit 20x SSC getränkt), über welches ein Kleenex-Stapel, der mit Gewicht beschwert wurde, geschichtet wurde. Mittels Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Membran transferiert. Das Blotten

erfolgte über Nacht; anschließend wurde die Membran in 20x SSC gewaschen und danach bei 80°C eine Stunde inkubiert. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Membran, wurde die Membran zusätzlich mit UV C (254 nm, 1.200 Joule) bestrahlt.

2.2.1.9. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

A. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Sondenherstellung wurde die „Random Primer“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) benutzt. Hierbei wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen aufgeschmolzen und das Anhybridisieren kurzer DNA-Stücke randomisierter Sequenzen an die resultierenden Einzelstränge erlaubt. Die anhybridisierten Stücke dienen als Startstelle für die nachfolgende Polymerisation durch das Klenow-Fragment aus der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotid-Triphosphate werden die entstehenden Doppelstränge radioaktiv markiert. Verwendet wurde das Protokoll des „rediprime-Kits“ der Firma Amersham: 10-20 ng DNA-Fragment wurden in einem Volumen von 45 µl durch 5 minütige Inkubation bei 100°C und danach 5 minütiger Inkubation bei 4°C denaturiert und in ein rediprime-Röhrchen gegeben. Dieses enthält ein Lyophilisat aus Desoxynukleotidtriphosphaten, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Nach Zugabe von 5 µl alpha ³²P dCTP erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 10 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Zur Trennung des markierten Fragments von nicht eingebauten Nukleotiden wurde der Ansatz über eine Sephadex-G50-Säule geleitet (Gelfiltration). Die Packung dieser Säule mit in TE äquilibriertem Sephadex-G50 und die chromatographische Auftrennung von Fragment und freien Nukleotiden erfolgte unter Zentrifugation bei 1.000 upm für jeweils 4 Minuten. Anschließend wurde 2x mit je 100 µl TE gewaschen. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide wurde durch Messen von 2 µl des Eluates im Szintillationszähler bestimmt.

B. Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Diese Art der Markierung wurde für Oligonukleotid-DNA verwendet, die in Gelretardations-Analysen eingesetzt wurden. Zur Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden wurden jeweils 10 µg komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide in 0,5x TBE 5 Minuten auf 95°C erhitzt und danach langsam in einem mit Wasser gefülltem Becherglas auf RT gebracht. Das weitere Abkühlen auf

4°C erfolgte über Nacht. Die Konzentration der nun doppelsträngigen Nukleotide wurde auf 1 pmol/µl eingestellt.

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide erfolgte mittels Kinasierung. Dazu wurden 2 pmol Nukleotide mit 1/10 Volumen 10x Kinase-Puffer (700 mM Tris pH 7,5, 70 mM MgCl₂), 3 µl γ-ATP und 8 U T4-Polynukleotid-Kinase 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Trennung vom nichteingebautem ATP erfolgte mittels Gelfiltration (Sephadex-G25 Säule).

2.2.1.10. Hybridisierung

Nach der kovalenten Fixierung der RNA an die Membran wurde diese in einer Röhre mit 5 ml Hybridisierungslösung (1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer, 7 % SDS) in einem Ofen bei 65°C unter Rotation prähybridisiert. Danach wurden ca. $1-3 \times 10^7$ cpm radioaktiv-markierter Probe, die zuvor 5 Minuten bei 100°C denaturiert wurde, dazupipettiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotieren der Röhre wie folgt gewaschen: 2x 10 Minuten 2x SSC/0,1% SDS, dann 2x10 Minuten 1x SSC/0,1% SDS. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet. Sollte eine Membran nach Hybridisierung mit einer anderen Probe hybridisiert werden, so wurde die ursprüngliche Probe durch 10 minütige Inkubation in kochender 0,1% SDS-Lösung entfernt. Die erneute Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

2.2.2. Zellkultur

Die Maus-Fibroblasten wurden routinemäßig in DMEM mit 10% FCS auf Plastikschalen kultiviert, auf denen sie adhärent wuchsen. Die Inkubation fand im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ statt.

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitsbank der Klasse 2 (Baker) durchgeführt.

2.2.2.1. Trypsinieren von Zellen

Bei 80% Konfluenz, wurden die Zellen, unter Verdünnung, in neue Schalen transferiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin überschichtet und bis

zum beginnenden Ablösen bei 37°C oder RT inkubiert (ca. 5 Minuten). Durch Zugabe von FCS enthaltendem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (900 upm, 3 Minuten) sedimentiert und nach Absaugen des Überstands in einem entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer oder mit Hilfe des Casy 1-Zählgerätes (Schärfe-System, Reutlingen). Danach wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausplattiert.

2.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert und gezählt, die Zellsuspension in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt und in diesem für 3 Minuten bei 900 upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment (ca. 1×10^6 Zellen) in 1 ml Einfriermedium (20% FCS-Medium + 10% DMSO) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen transferiert. Die Zellen wurden anschließend für 1 Stunde auf Eis inkubiert, dann auf -80°C gebracht (unter diesen Bedingungen können die Zellen bis zu 2 Monate aufbewahrt werden). Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen schnell auf 37°C erwärmt, in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium überführt, 3 Minuten bei 900 upm sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes in Medium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

2.2.2.3. Synchronisation der Zellen

Die Synchronisation von Zellen erfolgte durch Kultivierung in FCS-freiem Medium (für 48-72h) und gleichzeitiger Kontaktinhibition. Diese Art von Kultivierung führt zu einer effizienten reversiblen Arretierung der Zellen in der frühen G1-Phase des Zellzyklus (auch als G0 bezeichnet). Die Aufhebung der Blockierung und der damit induzierte synchrone Durchlauf der Zellen durch die anschließenden Zellzyklusphasen erfolgte durch Trypsinieren der Zellen und erneutem Ausplattieren in 10% FCS-haltigem Medium.

2.2.2.4. Toxizitäts-Test durch Kolonienbildung

Pro 5 cm (Durchmesser) Gewebekulturschale wurden 500 Zellen ausplattiert und einen Tag später mit den zu untersuchenden Agenzien behandelt. Die Zellen wurden

zwölf Tage kultiviert, wobei alle 3 Tage das Medium gewechselt wurde. Die sich jeweils aus einer Zelle bildenden Kolonien wurden wie folgt angefärbt: die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, trocknen lassen und anschließend 1 Stunde mit Methanol fixiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen 2x mit Ethanol gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurden die Zellen mit einer 0,5%igen Kristallviolett-Lösung 20 Minuten angefärbt. Die Gewebekulturschalen wurden danach unter fließendem Wasser gespült und getrocknet. Die Zahl der Kolonien wurde bestimmt, wobei die Anzahl der Kolonien von unbehandelten Zellen einer Überlebensrate von 100% (oder 1) entspricht.

2.2.2.5. Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien

Die Behandlung der Zellen mit MMS, MNNG oder TPA erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Stammlösungen (100 mM MMS, 100 mM MNNG oder 200 mg/ml TPA in DMSO, die bei -20°C aufbewahrt wurden) in den gewünschten Endkonzentrationen ins serumhaltige Medium. Die Zellen wurden je nach Bedarf im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.6. Bestrahlung mit UV C

Für die monochromatische Bestrahlung mit unterschiedlichen UV C-Dosen wurde eine 15 W-Quecksilberlampe der Wellenlänge 254 nm (halbmaximale Bandbreite 2,3 nm) der Firma Vetter (Wiesloch) oder ein Stratalinker der Firma Stratagene benutzt. Die Leistung der Lampe bei einem Abstand von 32 cm beträgt 1,4 W/m². Die Zellen wurden, nach Waschen mit PBS, mit 30 J/m² (21 Sekunden bei 32 cm Abstand) oder der angegebenen Dosis bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das konditionierte Medium (37°C warm) wieder auf die Zellen gegeben und die Petrischale weiter inkubiert. Alle Bestrahlungen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.2.2.7. FACS-Analyse

Die FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“-)Analyse ermöglicht die Detektion von Zellen oder deren DNA-Gehalt anhand von Fluoreszenzmarkierungen. Hierbei werden einzelne Zellen enthaltende Tröpfchen der markierten Zellsuspension mit Laserlicht angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Zudem gestatten Beugung und Streuung des Laserlichtes Aufschluß über Größe beziehungsweise Granularität der Zelle. Verwendet wurde ein FACS-Gerät (FACStar^{Plus}) der Firma

Becton Dickinson, Heidelberg. Zur Fluoreszenzmarkierung dienten FITC-konjugierte Antikörper oder Propidiumjodid als Vitalitäts- oder DNA-Farbstoff.

A. Detektion von Apoptose mittels FACS

Der Farbstoff Propidiumjodid kann als Vitalitätsfarbstoff oder als DNA-färbende Substanz eingesetzt werden. Die Vitalitätsfärbung beruht darauf, daß nur tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und somit angefärbt werden können. Diese Färbemethode heißt Propidiumjodid-Ausschluß. Dazu wurden 1×10^5 Zellen nach dem Trypsinieren mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS aufgenommen. Unmittelbar vor der Messung im FACS wurde das Propidiumjodid zugesetzt (50 ng/ml Endkonzentration). Bei der Messung im FACS-Gerät ist es nicht möglich, nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden.

Bei der DNA-Färbung wurden die Zellen nach Waschen mit PBS über Nacht in einer Detergenz-haltigen Lösung (0,1% Na-Citrat, 0,1% Triton X-100 und 50 ng/ml Propidiumjodid) inkubiert, so daß die Zellen lysieren und der Farbstoff in die DNA interkalieren kann. Mittels der Propidiumjodid-Färbung kann das DNA-Profil der Zellen und somit deren Verteilung in den jeweiligen Zellzyklusphasen, sowie der Anteil apoptotischer DNA bestimmt werden.

B. Detektion von Proteinen mittels Antikörperfärbung

Die Zellen (ca. 1×10^5) wurden trypsinieren, mit PBS gewaschen und in PBS mit 5% FCS, 1% Azid und dem entsprechenden Antikörper 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Waschlösung (5% FCS, 1% Azid in PBS) gewaschen und mit dem FITC-gekoppeltem Zweitantikörper abermals 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 50 μ l PBS aufgenommen und bis zur Messung im FACS-Gerät bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.2.8. Bestimmung der S-Phase-Zellen und der DNA-Reparatur (UDS)

Zur Bestimmung der UDS (ausserplanmäßige DNA-Synthese) und der S-Phase-Zellen wurden die Zellen in einer Dichte von 2.000 Zellen/cm² auf Objektträgern mit 2 Kammern ausplattiert, 24 Stunden anwachsen gelassen und gegebenenfalls mit UV C bestrahlt oder mit MMS behandelt. Danach wurden die Zellen 2 oder 4 Stunden mit Medium inkubiert, das 10 μ Ci Methyl-³H-Thymidin, 1 μ M Fluordesoxyuridin und 10% FCS (dialysiert gegen PBS) enthielt, so daß die Zellen das markierte Thymidin einbauen konnten. Zur Fixierung wurden die Zellen in PBS gewaschen und 5

Minuten in Bouin's Fixierlösung (15 Teile gesättigte Pikrinsäure, 5 Teile 37% Formaldehyd, 1 Teil konz. Essigsäure) inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit Wasser und jeweils 1x mit 70%, 80% und 90% Ethanol gewaschen. Nach dreimaligem Waschen in reinem Ethanol, wurden die Zellen luftgetrocknet, um mit einer 42°C warmen, flüssigen Photoemulsion (Kodak) überschichtet werden zu können. Die so beschichteten Zellen wurden 10 Tage in der Dunkelkammer bei 4°C inkubiert. Vor der Entwicklung wurde die Entwickler-Lösung (Kodak D-19, 300g/1,9 l frisch 1:2 mit Wasser verdünnt) und die Fixier-Lösung (Kodak; 50 ml in 200 ml Wasser) auf 16°C abgekühlt. Die Präparate wurden 2-3 Minuten in der Entwickler-Lösung inkubiert, kurz mit Wasser gespült, danach 4 Minuten in der Fixier-Lösung inkubiert und abermals mit Wasser gewaschen. Die so entwickelten Präparate konnten bei Bedarf mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt werden. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop analysiert.

2.2.3. Präparation und Analyse von Proteinen

Zur Verhinderung von Protease- und Phosphataseaktivitäten wurden, wenn nicht anders angegeben, sämtliche Arbeiten mit Proteinen, deren Isolierung eingeschlossen, stets auf Eis mit kalten Lösungen oder im Kühlraum durchgeführt. Zusätzlich wurden dem Lysispuffer Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden in einer Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt.

2.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen kultiviert und anschließend je nach Gebrauch geerntet. Zur direkten Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Zellen nach Waschen mit PBS direkt im Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β -Mercaptoethanol) lysiert und nach Denaturierung bei 100°C aufs Gel aufgetragen. Zur Detektion von Immunkomplexen wurden die Zellen in dem jeweiligen Lysispuffer geerntet, wonach eine Bestimmung der Proteinkonzentration stattfand.

2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al., 1951

Für die Erstellung der Eichkurve wurden 5 bis 40 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml, gelöst in Lowry-Lösung I) und 5 µl 250 mM Tris-HCl pH 7,5 (oder der jeweilige Lysispuffer) mit Lowry-Lösung I (2% Na₂CO₃, 0,1 M NaOH) auf 150 µl aufgefüllt und mit 250 µl frisch hergestellter Lowry-Lösung IV (10 ml Lowry-Lösung I mit 100 µl 2% NaK-Tartrat und 100 µl 1% CuSO₄) gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 30 µl 50% Folin-Reagens zugegeben und 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Von den zu bestimmenden Proteinextrakten wurden jeweils 5 µl mit 145 µl Lowry-Lösung I und 250 µl Lowry-Lösung IV gemischt, wobei nach Zugabe von 50% Folin-Reagens ebenfalls im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Von den so hergestellten Eichkurven- und den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die OD der Farbreaktion im Elisa-Reader der Firma Titertek („Multiskan PLUS MK II“) bei 600 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Eichkurve.

2.2.3.3. Immunpräzipitation und *in vitro* Kinase-Assay

Zur Herstellung des Proteinextraktes wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl kaltem Lysis-Puffer (für JNK: 20 mM Tris pH 7,5; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 10% Glycerin; 2 mM Natriumpyrophosphat; 25 mM β-Glycerophosphat; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM PMSF; je 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin; da Zyklin D-CDK4/6-Komplexe in Triton-Lösungen nicht stabil sind, wurde 0,1% Tween 20 als Detergenz eingesetzt) aufgeschlossen. Der Extrakt wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und nach 5 minütiger Inkubation auf Eis 20 Minuten bei 0°C und 13000 upm zentrifugiert.

Gleiche Proteinmengen wurden mit 1,5 µl des gewünschten Antikörpers in einem Volumen von 700 µl bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach einer Stunde wurden je Ansatz etwa 20 µl in Lysis-Puffer gequollene Protein A- oder G-Sepharose zugegeben und erneut 1 h bei 4°C rotiert. Die über die spezifischen Antikörper an die ProteinA/G-Sepharose gekoppelten Immunkomplexe wurden zweimal mit 300 µl Lysis-Puffer und einmal mit 300 µl Kinase-Puffer (25 mM HEPES pH 7,4; 25 mM MgCl₂; 25 mM β-Glycerophosphat; 0,1 mM Na₃VO₄, bei Zyklin D zusätzlich noch 2,5 mM EGTA) gewaschen. Zur Bestimmung der Kinase-Aktivität wurde eine Kinase-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden 2 µg des entsprechenden Substrates,

5 μCi γ -ATP, in einem Endvolumen von 25 μl in Kinase-Puffer mit dem Immunkomplex gemischt und 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, der Überstand mit dem phosphorylierten Substrat in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β -Mercaptoethanol) überführt und 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel wobei auf das Gel nach dem Trocknen ein Röntgenfilm aufgelegt wurde.

Erfolgte die Exposition auf „Imaging“-Platten (Fujiphotofilm Co, LTD), so wurde die quantitative Auswertung mit Hilfe des Programms MacBAS V 2.5 anhand der im „Bio-Imaging Analyser“ (Fa. Fuji: FUJI X BAS 1000) gelesenen „Imaging“-Platte durchgeführt.

2.2.3.4. Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen

Eukaryontische Proteine können durch Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden (Smith und Johnson, 1988). Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine milde Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellen Rohlysaten mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion.

Eine Übernachtskultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wurde 1:10 mit LB-Medium (10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 l mit H₂O und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 h wurden die Bakterien zur Produktion des GST-Fusionsproteins mit 0,1 mM IPTG (f.c.) behandelt und 4 weitere Stunden unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3000 upm, 10 Minuten, 4°C) sedimentiert, in eiskaltem Puffer E (50 mM HEPES pH 7,9; 15 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) suspendiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in Gegenwart von 1 mg/ml Lysozym lysiert. Die bakterielle DNA wurde mechanisch im Ultraschall geschert. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (10.000 upm; 15 Minuten; 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in PBS gequollener Glutathion-Agarose für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert (die Menge ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat

1 ml gequollene Glutathion-Agarose die Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein). Die Glutathion-Agarose wurde mit dem gebundenen Fusionsprotein in eine Säule transferiert und mit dem Zehnfachen des Säulenvolumens an PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch 5 mM reduziertes Glutathion (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) in Fraktionen aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch eine Proteinbestimmung nach Lowry und anschließend durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen 20mM Hepes pH 7,5, 10% Glycerin, 1mM DTT dialysiert. So gereinigtes Fusionsprotein wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei richtete sich der Vernetzungsgrad im Trenngel nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins. Hierfür wurde die entsprechende Acrylamid-Lösung (Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid; 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED) zwischen zwei mit Abstandshaltern fixierte Glasplatten (0,75-1,5 mm dicke Abstandshalter) luftblasenfrei bis ca. 4 cm zum oberen Glasrand ausgegossen, mit Isopropanol überschichtet und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Entfernen des Gelüberstandes wurde das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt. Bei der Denaturierung der Proben im Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% β -Mercaptoethanol) wird die Eigenladung der denaturierten Proteine vollständig durch die negativen Ladungen der SDS-Sulfatgruppen überlagert, so daß im elektrischen Feld die Mobilität der SDS-Proteinkomplexe weitestgehend durch den Siebeffekt der Polyacrylamidmatrix bestimmt wird. Dadurch wird eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erreicht. 30 bis 50 μ g Proteinextrakt (je nach nachzuweisendem Protein) wurden mit Lysispuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l eingestellt und mit 5 μ l 5x Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 4 Minuten bei 100°C denaturiert und kurz abzentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer

gut gespült und die Proben mit einer Hamilton-Spritze direkt in die Geltaschen gegeben. Der Sammelgellauf erfolgte bei konstanten 20 mA in 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS), der Trenngellauf erfolgte je nach Größe und Auftrennung des gewünschten Proteins bei konstanten mA für 5-8 Stunden. Der Gellauf wurde beendet, sobald die entsprechenden blau-markierten Molekulargewichtsmarker eine gute Auftrennung aufwiesen. Das Gel wurde zwischen den beiden Glasplatten entfernt und entweder Coomassie-gefärbt, geblottet („Western-Blotting“) oder in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.3.6. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen

Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, können durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel 30 Minuten in 0,5 ml/cm² Gelfläche Färbelösung (0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure) und danach so lange in Entfärbelösung (50% Methanol; 7,5% Essigsäure) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

2.2.3.7. Silberfärbung von Proteingelen

Das Gel wurde nach erfolgter SDS-PAGE in 50% Methanol fixiert und anschließend in 5% Methanol gewaschen. Danach wurde es 20 Minuten in einer frisch zubereiteten DTT-Lösung (5 µg/ml DTT) und anschließend 20 Minuten in 1% AgNO₃ inkubiert. Nach dem Waschen des Gels (mit Wasser) wurde dieses so lange in 3% Na₂CO₃/0,1% Formaldehyd (Entwickler) inkubiert, bis die ersten Proteinbanden sichtbar wurden. Die Anfärbung wurde durch Zugabe von Zitronensäure (5 ml, 2,3 M) gestoppt. Danach wurde das Gel 2x 15 Minuten in Wasser gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

2.2.3.8. Transfer von Proteinen auf Membran und Nachweis von Proteinen (Western-Blot)

Der Transfer der im Polyacrylamidgel immobilisierten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Western-Blot-Apparatur (BioRad) in der folgenden Weise: Das in der Reihenfolge aus Schwamm, 3 Lagen 3 MM Papier, Trenngel, Nitrocellulose-Membran, 3 Lagen 3 MM Papier, Schwamm, luftblasenfrei zusammengesetzte Sandwich wurde mittels Trägers senkrecht in die mit Western-

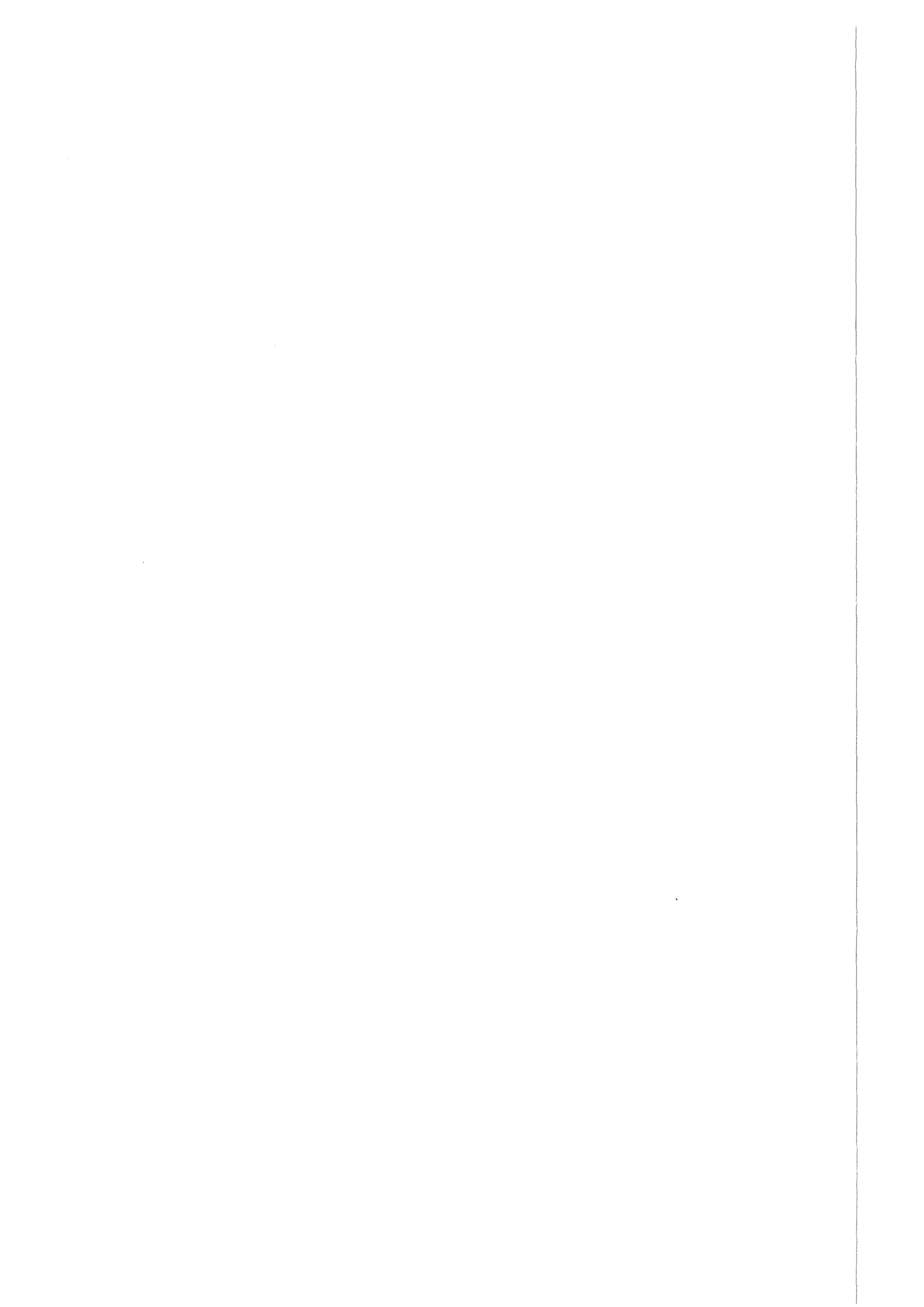
Blotting-Puffer (20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) gefüllte Elektrophoresekammer gebracht. Zuvor wurde die Membran 2 Minuten in Western-Blotting-Puffer äquilibriert, das 3 MM Papier in Western-Blotting-Puffer getränkt und das Gel 2 Minuten in Western-Blotting-Puffer gewaschen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte unter ständigem Rühren des Puffers über Nacht bei 4°C bei einer Spannung von 30 Volt.

Nach Abbau des Sandwiches wurde die Membran 2x 10 Minuten in TBS (20 mM Tris-Base, 137 mM Natriumchlorid; pH 8,1) gewaschen. Danach wurde die Membran 30 Minuten in Blockierungs-Puffer (4% (w/v) Magermilchpulver 0,5% Tween 20 in TBS) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation des jeweiligen Antikörpers (meist 1:1.000 verdünnt in Blockierungs-Puffer) erfolgte mindestens eine Stunde in einer Folie eingeschweißt und unter Rotieren bei RT. Dann wurde die Membran mit Blockierungs-Puffer gewaschen (3x 5 Minuten) und mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper (1:2.500 verdünnt) mindestens 30 Minuten inkubiert. Der erste Waschschrift erfolgte mit Blockierungs-Puffer, die folgenden 4 mit TBS. Schließlich wurde die Membran nach Abtropfen auf der Proteinseite mit 6 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung der beiden ECL-Detektionslösungen genau 1 Minute bedeckt, die Flüssigkeit mit einem Kleenex-Tuch vom Rand her abgesaugt und die Membran, bedeckt mit einer Frischhaltefolie, in eine Filmkassette gelegt. Auflegen des Filmes erfolgte erst für eine Minute und dann, je nach Signalintensität, kürzer oder länger. Das Detektionssystem basiert auf der von Chemolumineszenz begleiteten Oxidation eines cyclischen Diacylhydrazides, die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird.

2.2.3.9. Bestimmung der Bindeaktivität durch Gelretardations-Analyse

Zur Herstellung der Kernextrakte wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS von den Gewebekulturschalen abgeschabt und 5 Minuten bei 4000 upm abzentrifugiert. Das Zellpellet (ca. 1×10^6 Zellen) wurde in 100 µl CE-Puffer (10 mM HEPES pH 7,9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1 mM PMSF) aufgenommen und zur Lyse der Zellen 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden 5 Minuten bei 3.000 upm abzentrifugiert. Der Überstand (Zytoplasma-Extrakt) mit 50 µl NE-Puffer (250 mM Tris pH 7,8, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) versetzt und nach einer erneuten Zentrifugation in flüssigem

Stickstoff schockgefroren. Die Kerne (das Pellet) wurden nach Waschen mit CE-Puffer ohne NP-40 unter dem Mikroskop überprüft, um anschließend wieder 5 Minuten zentrifugiert zu werden. Das Kernpellet wurde in 100 µl NE-Puffer aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 15 Minuten Zentrifugation bei 13000 upm abgetrennt. Die Konzentration der Proteine wurde nach Lowry bestimmt. Die DNA-Bindungsreaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 2-5 µg Kernextrakt mit 4 µl 5x Reaktionspuffer (20% Glycerin, 60 mM Hepes pH 7,9, 25 mM MgCl₂, 29 mM Tris HCl pH 7,9, 3 mM DTT, 3 mM EDTA) 1 µg poly dI/dC und 2 µg BSA auf Eis gemischt und 5 Minuten bei RT stehen gelassen. Nach Zugabe von 2 µl markierter Oligonukleotid-DNA (10 fmol) erfolgte die Komplexbildung 30 Minuten bei RT. Wurden zum Nachweis der Komplexe Antikörper verwendet, so wurden diese mit dem Proteinextrakt und den anderen Bestandteilen 1 Stunden auf Eis vorinkubiert, bevor die markierte Probe hinzugefügt wurde (wie oben beschrieben). Die Auftrennung der Komplexe erfolgte in einem 4% Polyacrylamid-Gel in 0,5 x TBE bei konstanter Stromstärke, wobei das Gel 30 Minuten vorlaufen sollte. Nach Trocknen des Geles wurde ein Film aufgelegt.



3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von c-Jun in der Zellproliferation und in der Apoptose untersucht werden. Dazu wurden Mausfibroblasten benutzt, die kein funktionelles *c-jun* Gen mehr besitzen: durch homologe Rekombination wurde zunächst ein *c-jun* Allel in der Keimbahn von Mäusen inaktiviert. Um dies zu erzielen, wurde in embryonalen Stammzellen die DNA-Bindedomäne von *c-jun*, bestehend aus basischer Region und Leuzin-Zipper, durch homologe Rekombination gegen das Resistenzmarkergen *neo* ersetzt (was zu einem c-Jun-neo Fusionsprotein führt) (Hilberg und Wagner, 1992). Homozygote Mäuse, bei denen beide Kopien dieses Gens inaktiviert sind (*c-jun*^{-/-}), sterben um Tag 13 ihrer pränatalen Entwicklung an einem Leberdefekt (Hilberg et al., 1993). Zur Isolierung von primären Fibroblasten wurden Mausembryonen vom Tag 12 der Embryonalentwicklung verwendet. Diese Zellen wurden durch Kultivieren nach dem 3T3-Protokoll (Todaro und Green, 1963) spontan zur Immortalisierung gebracht. In den hier vorgestellten Experimenten wurden ausschließlich solche immortalisierten Mausfibroblasten verwendet. Sie werden als Wildtyp bzw. *c-jun*^{-/-} Zellen bezeichnet, wenn sie aus Wildtyp Embryonen bzw. homozygoten *c-jun*^{-/-} Embryonen isoliert wurden.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Rolle von c-Jun in der Proliferation. Der zweite Teil untersucht die Rolle von c-Jun beim Überleben der Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien und in der Apoptose.

3.1. Teil 1: Die Rolle von c-Jun in der Zellproliferation

3.1.1. Zellen, die kein c-Jun exprimieren, zeigen eine verlangsamte Proliferation

Um die Proliferationsrate der Fibroblasten zu bestimmen, wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden 2×10^5 Wildtyp sowie *c-jun*^{-/-} Zellen ausplattiert, alle vier Tage von der Platte gelöst, gezählt und mit der gleichen Zellzahl abermals ausplattiert. Die kumulative Zellzahl ergibt sich aus der ermittelten Zellzahl und dem eingerechneten Verdünnungsfaktor. In Abbildung 1 ist die Wachstumskurve von jeweils zwei Wildtyp und zwei *c-jun*^{-/-} Zelllinien gezeigt. Während die Wildtyp Fibroblasten sich jeden Tag einmal teilten, benötigten die *c-jun*^{-/-} Fibroblasten etwa drei Tage für eine Verdopplung ihrer Zellzahl. Die beiden verwendeten *c-jun*^{-/-} Zelllinien unterschieden

sich leicht in ihrem Wachstum, proliferierten aber beide signifikant langsamer als Wildtyp Zellen. Die Proliferationsrate der hier verwendeten Wildtyp Fibroblasten war von der der NIH-3T3 Fibroblasten, einer etablierten käuflichen Zelllinie, nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt; und Schreiber et al., 1998).

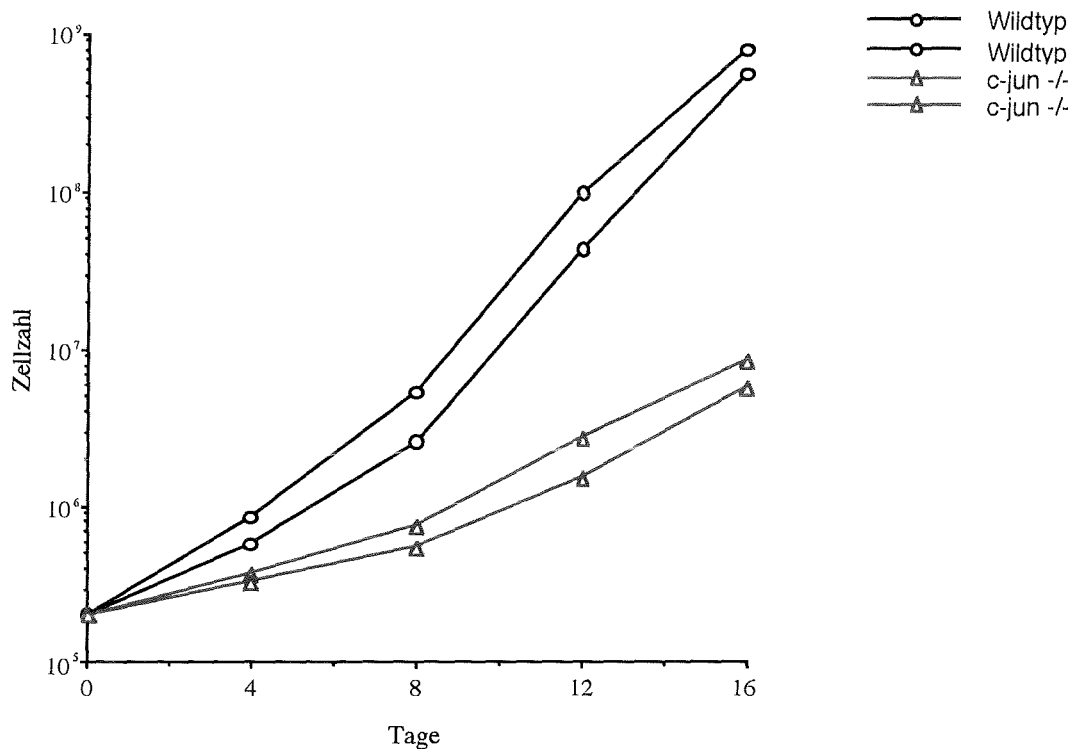


Abb. 1: Der Verlust von c-Jun führt zu einer verlangsamten Proliferation der Zellen

Jeweils 2×10^5 Zellen von zwei Wildtyp (O) und zwei *c-jun*^{-/-} (Δ) Zelllinien wurden ausplattiert, alle vier Tage abgelöst, gezählt und abermals ausplattiert. Die kumulative Zellzahl wurde daraus errechnet und graphisch dargestellt.

3.1.2. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, ist in Abwesenheit von c-Jun verringert

Die verringerte Verdopplungsrate der c-Jun defizienten Zellen könnte auf einem verlangsamten Durchlaufen des Zellzyklus beruhen. Um die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, zu bestimmen, wurden die Zellen mit ³H-markiertem Thymidin inkubiert. Das ³H-Thymidin wird von den Zellen während der DNA-Synthese, d.h. der S-Phase in die neu synthetisierte DNA eingebaut und kann auf Einzelzellebene nachgewiesen werden (Abb. 2 A). Die Anzahl der Zellen, die sich in

der S-Phase befanden, wurde prozentual im Verhältnis zur Gesamtzellzahl errechnet und in Abbildung 2 B dargestellt. In Abwesenheit von c-Jun war die Anzahl der Zellen in der S-Phase verringert: bei Wildtyp Zellen befanden sich $70\% \pm 5\%$ und bei *c-jun*^{-/-} Zellen $24\% \pm 3,8\%$ der Zellen in der S-Phase, sowohl nach zwei als auch nach vier Stunden Inkubation in Anwesenheit von ³H-Thymidin. Inkubierte man die Zellen über einen längeren Zeitraum mit ³H-Thymidin, so zeigte sich, daß die gesamte Population der *c-jun*^{-/-} Zellen deutlich mehr Zeit als Wildtyp Zellen benötigten um in die S-Phase einzutreten (Abb. 2 C). Die Zellen, bei denen c-Jun fehlt, scheinen einen Defekt im Übergang von der G1- in die S-Phase zu haben. Die Länge der S-Phase betrug in Abwesenheit von c-Jun ca. 12 Stunden und ein vollständiger Zellzyklus ca. 72 Stunden, wohingegen Wildtyp Zellen ca. 23 Stunden für das Durchlaufen eines Zellzyklus benötigten, was gut mit den Daten der Proliferation übereinstimmt (siehe auch Abb. 1).

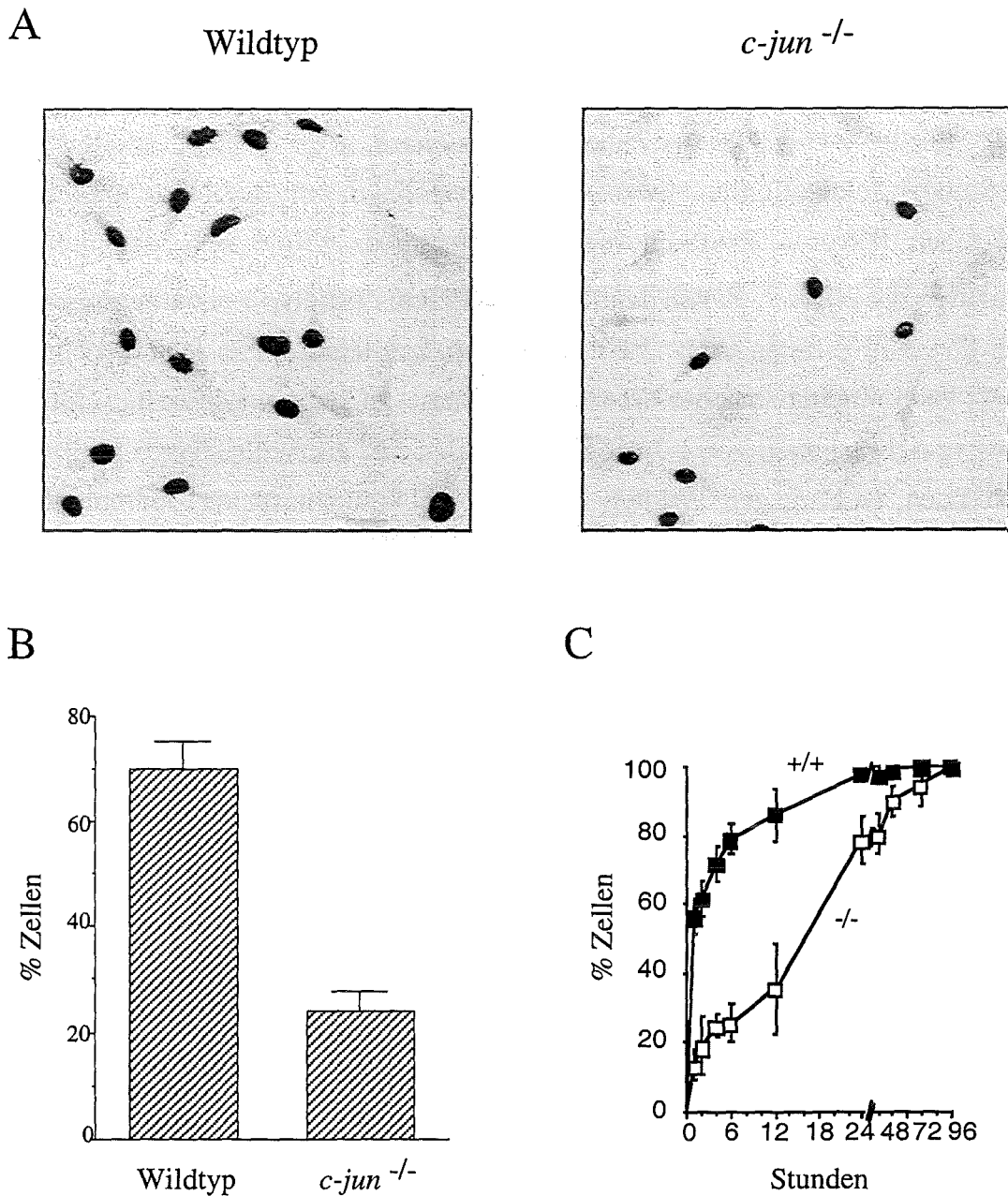


Abb. 2: In Abwesenheit von c-Jun sind weniger Zellen in der S-Phase

A. Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden zwei Stunden mit ³H-Thymidin inkubiert, fixiert und mit einer Filmemulsion überschichtet. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellen anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Videokamera aufgenommen.

B. Prozentuale Verteilung der Kerne, die sich in der S-Phase befinden. Mindestens 2x100 Kerne (mit Hämatoxylin gefärbt) wurden gezählt (Gesamtzahl aus radioaktiv markierten und nicht markierten Kernen) und der prozentuale Anteil der radioaktiv markierten S-Phase Kerne dargestellt. Die Zahlen setzen sich aus jeweils zwei Wildtyp und zwei *c-jun*^{-/-} Zelllinien zusammen.

C. ³H-Thymidineinbau über einen Zeitraum von 96 Stunden. Jeweils zwei Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien wurden bis zu 96 Stunden in Anwesenheit von ³H-Thymidin kultiviert und wie unter A beschrieben, behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befanden, wurde graphisch dargestellt. (Teil C aus Schreiber et al., 1998)

Die Unterschiede in der Anzahl der Zellen in der S-Phase zwischen Wildtyp und *c-Jun* defizienten Zellen lassen darauf schließen, daß sich die Verteilung der Zellen im Zellzyklus unterscheidet. Mit Hilfe von FACS („Fluorescence activated cell sorter“)-Analysen kann man die Verteilung der Zellen im Zellzyklus bestimmen. Dazu werden die Zellen in einem Puffer mit Propidiumjodid, das in der DNA interkaliert, aufgenommen und der DNA-Gehalt im FACS-Gerät gemessen. Diese FACS-Analysen belegen, daß bei asynchron wachsenden *c-jun*^{-/-} Zellen sich 88% der Zellen in der G1-Phase und 12% der Zellen in der G2- und S-Phase befanden. Bei Wildtyp Zellen konnten dagegen 74% der Zellen in der G1-Phase und 26% der Zellen in der G2- und S-Phase nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Fibroblasten kann man durch Kontaktinhibition, das heißt über eine Hemmung der Proliferation durch eine hohe Zelldichte und durch den Entzug von Wachstumsfaktoren in der G0-Phase arretieren, was als G0-Block bezeichnet wird. Um nachzuprüfen, ob beide Zelltypen mit der gleichen Effizienz aus diesem G0-Block in die G1- bzw. S-Phase übergehen, wurde die Verteilung der Zellen im Zellzyklus nach Stimultaion mit Serum, das viele Wachstumsfaktoren enthält, bestimmt. Dazu wurden die Zellen zur Synchronisierung bis zur Kontaktinhibition wachsen gelassen, und 48 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert, um eine effiziente Arretierung in G0 zu erreichen. Die Aufhebung des Zellzyklus-Blocks und der infolgedessen induzierte synchrone Durchlauf der Zellen durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus erfolgte durch Ablösen der Zellen und erneutes Ausplattieren in serumhaltigem Medium. Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde durch Messung im FACS-Gerät bestimmt. Im arretierten Zustand befanden sich Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen in der G0-Phase, die in FACS-Messungen nicht von der G1-Phase zu unterscheiden ist (Abb. 3). 21 Stunden nach Serumstimulation befanden sich bereits ein Teil der Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen in der S-Phase; es blieb jedoch ein wesentlich größerer Anteil an *c-jun*^{-/-} Zellen als Wildtyp Zellen in der G1-Phase. Nach 24 Stunden waren Zellen mit Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Genotyp in der G2-Phase auffindbar. Nach 30 Stunden Serumstimulation war eine Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ähnlich wie bei asynchron wachsenden Zellen vorzufinden (Abb. 3 und nicht gezeigt).

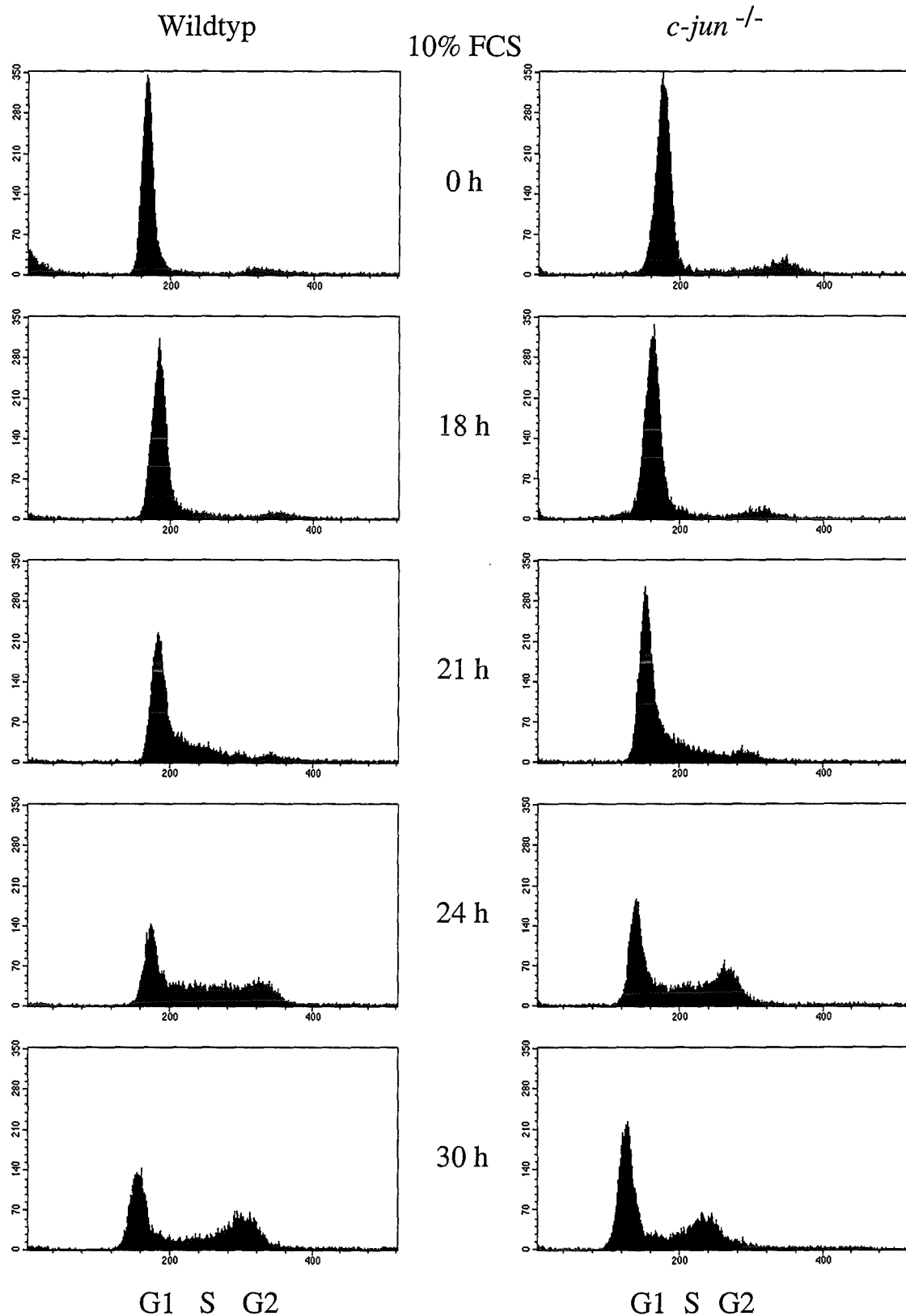


Abb. 3: Die Verteilung der Fibroblasten in den einzelnen Phasen des Zellzyklus

Zur Synchronisierung wurden Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen ausplattiert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und somit in der G0-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Aufhebung dieses G0-Blocks und der damit synchronisierte Durchlauf der Zellen durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus erfolgte durch Trypsinieren der Zellen und Ausplattieren in serumhaltigem Medium (10% FCS). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsiniert, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und im FACS-Gerät gemessen. Die Anzahl der Zellen ist gegen deren DNA-Gehalt aufgetragen. G1, S und G2 zeigen den DNA-Gehalt von Zellen an, die sich in der G1-, S- oder G2-Phase befinden.

In *c-Jun* defizienten Zellen entsprach die Kinetik, mit der die Zellen nach einem G0-Block die einzelnen Phasen des Zellzyklus durchliefen, der von Wildtyp Zellen. Jedoch war die Anzahl der Zellen, die in der G1-Phase verharrten, in Abwesenheit von *c-Jun* deutlich erhöht. 30 Stunden nach Serumstimulation befanden sich 47% der Wildtyp Zellen in der G1-, 11% der Zellen in der S- und 42% der Zellen in der G2-Phase. Bei *c-jun*^{-/-} Zellen waren zu dem gleichen Zeitpunkt 59% der Zellen in der G1-, 11% in der S- und 30% in der G2-Phase. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß *c-Jun* defiziente Zellen nicht mit der gleichen Effizienz in die S-Phase gehen wie Wildtyp Zellen, da die Anzahl der *c-jun*^{-/-} Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt noch in der G1-Phase befanden, höher als die der Wildtyp Zellen war. Zellen ohne *c-Jun* haben somit einen Defekt im Übergang von der G1- in die S-Phase.

3.1.3. Das Fehlen von *c-Jun* führt zu einer deutlich verminderten Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen

Die Übergänge der einzelnen Phasen des Zellzyklus werden durch Zykline und deren assoziierten Kinasen (CDK) kontrolliert. Die Zykline werden nur in den Phasen des Zellzyklus exprimiert in denen sie auch eine Funktion ausüben und danach durch Ubiquitinierung abgebaut, während die Kinasen unabhängig von den einzelnen Zellzyklusphasen konstant exprimiert werden. Wichtig für die Regulation der Phasenübergänge im Zellzyklus sind die aktiven Komplexe, die sich aus Kinasen und Zyklinen zusammensetzen. Sie besitzen die Fähigkeit das Protein des Retinoblastom-Gens (pRb) zu phosphorylieren, das im nichtphosphorylierten Zustand an den Transkriptionsfaktor E2F und das Dimerisierungs-Protein (DP) gebunden ist und die transkriptionelle Aktivität von E2F verhindert. Wird pRb durch die aktiven Kinasen, die aus Zyklinen und CDKs zusammengesetzt sind, phosphoryliert, so dissoziiert dieser Komplex. E2F wird als Transkriptionsfaktor aktiv und transkribiert Gene, die im Übergang von der G1- in die S-Phase wichtig sind (Übersicht in Grana und Reddy, 1995; Harper und Elledge, 1996). Um die Ursache für den verringerten Übergang von der G1- in die S-Phase in den *c-jun*^{-/-} Zellen biochemisch zu analysieren, wurde die Expression bzw. Aktivität der Zellzyklusregulatoren, die in diesen Phasen des Zellzyklus wichtig sind, untersucht. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben, in der G0-Phase des Zellzyklus arretiert und nach Serumstimulation zu den angegebenen Zeitpunkten aufgearbeitet. Mit Hilfe von spezifischer Antikörpern

gegen die Zykline D1 und E wurden die Zyklin D1- oder Zyklin E-assoziierten Komplexe durch Immunpräzipitation isoliert. Diese Ko-Immunkomplexe wurden in Anwesenheit der jeweiligen Substrate und γ -ATP inkubiert. Für die Zyklin D1-assoziierten Kinasen (CDK4/6) wurde das aufgereinigte bakterielle Fusionsprotein GST-Rb und für Zyklin E-assoziierte Kinasen (CDK2) Histon H1 als Substrat eingesetzt. Die Produkte dieses *in vitro* Kinase-Tests wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktive Markierung der jeweiligen Substrate stellt dabei ein direktes Maß für die Aktivität der Kinasen dar. In Wildtyp Zellen konnte 12 Stunden nach Serumstimulation eine Zunahme der Aktivität der Zyklin D1-assoziierten Kinasen festgestellt werden, die weiterhin anstieg und nach 24 Stunden maximal war. Im Gegensatz dazu war in den *c-Jun* defizienten Zellen die Aktivität der Zyklin D1-assoziierten Kinasen deutlich verringert und auch nach Serumstimulation kaum induzierbar (Abb. 4).

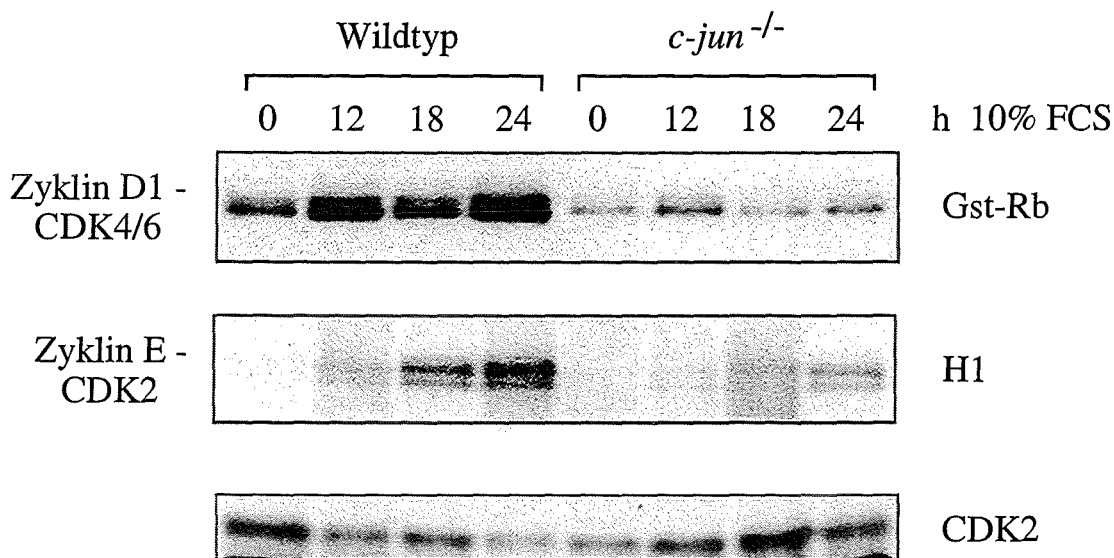


Abb. 4: Das Fehlen von *c-Jun* führt zu einer verringerten Aktivität von Zyklin-assoziierten Kinasen

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden nach erfolgreicher Synchronisierung trypsiniert und in Medium mit 10% FCS ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte präpariert und damit eine Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Zyklin D1 (DCS11) und Zyklin E (M20) durchgeführt. Die Aktivität der ko-präzipitierten Kinasen CDK4/6 (Zyklin D1-assoziiertes Komplex) und CDK2 (Zyklin E-assoziiertes Komplex) wurde an Hand der Substratphosphorylierung bestimmt. Für Zyklin D1-assoziierte Komplexe wurde aufgereinigtes, bakteriell exprimiertes GST-Rb und für Zyklin E-assoziierte Komplexe Histon H1 als Substrate eingesetzt. Die Auftrennung der phosphorylierten Substrate erfolgte durch SDS-PAGE. Zum Nachweis der präzipitierten Mengen von CDK2 wurde ein Western-Blot nach erfolgter Immunpräzipitation durchgeführt. Nur die für den Zellzyklus maßgebende 33 kDa Form von CDK2 ist gezeigt.

Die Präzipitation von den Zyklin E-assoziierten Komplexen ergab ein ähnliches Bild: die Aktivität der assoziierten Kinase war in Wildtyp Zellen 18 und 24 Stunden nach Serumstimulation deutlich verstärkt, wohingegen die Aktivierung in Zellen ohne c-Jun viel schwächer war (Abb. 4). Parallele FACS-Analysen belegten, daß sich die Zellen zu diesen Zeitpunkten in der späten G1- bzw. frühen S-Phase befanden (nicht gezeigt; siehe auch Abb. 3).

Die niedrigen Kinase-Aktivitäten könnten auf unzureichender Expression der einzelnen Zykline oder Kinasen beruhen. Die Proteinmenge der Zykline der G1-Phase (Zyklin D1, D2, D3, E) sowie der S-Phase (Zyklin A) und deren assoziierten Kinasen (CDK2, 4 und 6) wurden im Western-Blot nachgewiesen. In Abbildung 5 sind die Proteinmengen der CDKs in synchronisierten und serumstimulierten (5A), als auch asynchron wachsenden (5B) Zellen gezeigt. Die Menge an Zyklin D1 war in Abwesenheit von c-Jun im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert, die Werte waren sogar leicht erhöht. Auch waren keine erheblichen Unterschiede in der Menge an Zyklin D2 und D3 in den verschiedenen Zelltypen festzustellen. Zyklin D3 war in asynchron wachsenden *c-jun*^{-/-} Zellen sogar leicht erhöht. Die Menge an Zyklin E war in c-Jun defizienten Zellen nicht erniedrigt; hier konnte in den asynchron wachsenden Zellen ebenfalls geringfügig mehr Protein als in Wildtyp Zellen detektiert werden. Zyklin A war in den asynchron wachsenden Wildtyp Zellen etwas stärker exprimiert, wobei aber die größte Proteinmenge zu den gleichen Zeitpunkten in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen nach Seruminduktion auftrat. Da sich in Abwesenheit von c-Jun weniger Zellen in der S-Phase befanden, war die eigentliche Menge an Zyklin A in dieser Zellpopulation etwas geringer als in Wildtyp Zellen. Die Proteinmengen aller untersuchten Kinasen (CDK2, CDK4 und CDK6) war in beiden Zelltypen gleich und zeigten wie erwartet keine Schwankungen während des Zellzyklus. Lediglich bei der Kinase CDK2 war die aktivierte Form, die nach Phosphorylierung im SDS-PAGE eine erhöhte elektrophoretische Mobilität aufweist, in den Wildtyp Zellen schon nach 12 Stunden, in den *c-jun*^{-/-} Zellen aber erst 24 Stunden nach Serumgabe nachweisbar (Abb. 5 A).

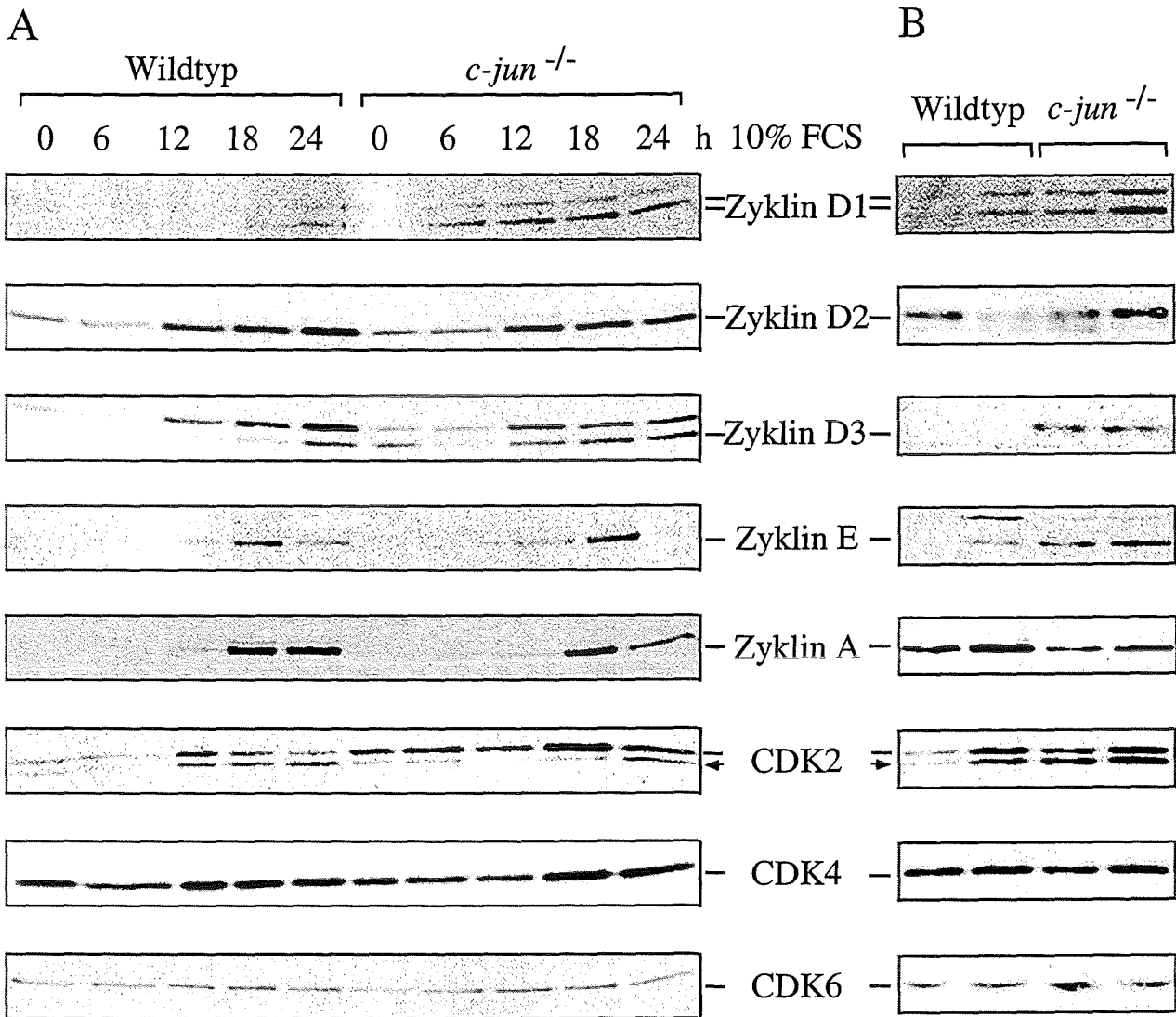


Abb. 5: Keine signifikanten Unterschiede in den Mengen der Zykline und ihrer assoziierten Kinasen in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Fibroblasten

Die Menge der angezeigten Zykline wurde im Western-Blot nachgewiesen. Dazu wurden Proteinextrakte von synchronisierten und Serum(10% FCS) -behandelten (A) wie auch asynchron (B) wachsenden (jeweils 2) Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien durch 12% SDS-PAGE aufgetrennt und die angegebenen Proteine im Western-Blot nachgewiesen. Bei Zyclin D3 ist die spezifische Bande angezeigt; die obere, unspezifische Bande kommt durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Zyclin D2 zustande. Da nur die 33 kDa Form von CDK2 im Zellzyklus wichtig ist, ist die 40 kDa Form von CDK2, deren Expression in den beiden Zelllinien nicht verändert war, nicht gezeigt. Der Pfeil kennzeichnet die phosphorylierte Form von CDK2.

Um auszuschließen, daß die Unterschiede in der Kinase-Aktivität auf unterschiedlichen Mengen der ko-präzipitierten Kinase beruhen, wurde die Menge an CDK2 nach erfolgter Immunpräzipitation von Zyklin E-assoziierten Komplexen im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 4). In beiden Zelllinien wurden vergleichbare Mengen an CDK2 ko-immunpräzipitiert. Diese Untersuchungen zeigen, daß in *c-jun*^{-/-} Zellen die reduzierte Aktivität der Kinasen nicht auf unterschiedlichen Mengen der präzipitierten Kinasen beruhen und daß c-Jun für die seruminduzierte Aktivierung der Kinasen der G1-Phase wichtig ist.

3.1.4. Der Inhibitor p21 ist in Abwesenheit von c-Jun erhöht

Die obigen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die geringfügigen Unterschiede in den Zyklinmengen oder deren assoziierten Kinasen nicht für die zuvor beobachtete reduzierte Aktivität der Kinasen und den unzureichenden Übergang von der G1- in die S-Phase verantwortlich sein. Aufgrund dessen wurden die Proteinmengen einiger spezifischer Kinase-Inhibitoren gemessen. Drei wichtige Inhibitoren, die an CDKs binden und dadurch deren Aktivität hemmen, sind die Proteine p16, p21 und p27 (Sherr und Roberts, 1995).

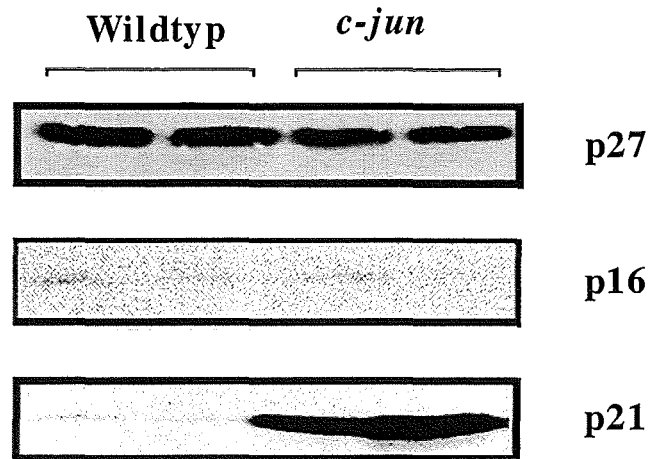


Abb. 6: Erhöhte Mengen an p21 in Abwesenheit von c-Jun

Zellextrakte von jeweils zwei asynchron wachsenden Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge der Zellzyklusinhibitoren p16, p21 und p27 durch Western-Blot bestimmt.

In den Proteinmengen von p16 und p27 waren in den beiden verschiedenen Zelltypen keine Unterschiede festzustellen (Abb. 6), im Gegensatz dazu war die Menge an p21 in *c-jun*^{-/-} Zellen deutlich erhöht (Abb. 6). Der Inhibitor p21, der in

Abwesenheit von c-Jun viel stärker exprimiert ist, könnte somit für die geringe Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen und den damit verbundenen geringeren Übergang von der G1- in die S-Phase der Zellen verantwortlich sein. Die Transkription des p21 Gens wird von dem Protein des Tumorsuppressorgens p53 nach Induktion mit verschiedenen Stimuli induziert (Levine, 1997). Um nachzuprüfen, ob die erhöhten Werte von p21 auf einer verstärkten Expression von p53 beruhen, wurden die Proteinmengen von p53 in den verschiedenen Zelllinien mittels Western-Blot bestimmt. Die basale Expression von p53 war in c-Jun defizienten Zellen höher als in Wildtyp Zellen (Abb. 7 A, jeweils Ko). Ein bekannter Mechanismus zur Regulation von p53 ist die Stabilisierung des Proteins durch Phosphorylierung und der dadurch verhinderte Abbau durch Ubiquitinierung, was zu einer Verlängerung der Halbwertszeit führt. Um nachzuprüfen, ob die Proteinmengen von p53 noch zusätzlich stabilisiert werden können, wurden Zellen mit UV C oder γ Strahlen behandelt und die Menge an p53 im Western-Blot nachgewiesen.

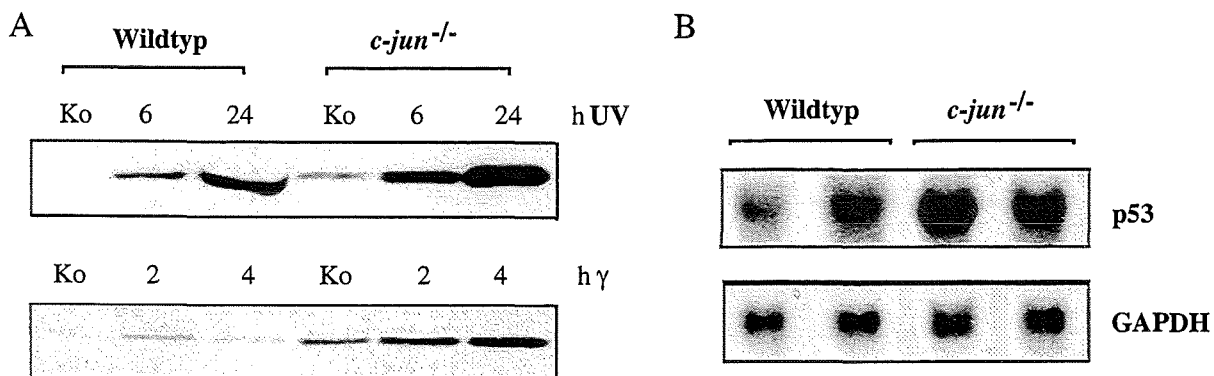


Abb. 7: Der Verlust von c-Jun führt zu einer verstärkten Expression von p53

A. Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit UV C (30 J/m²; UV) oder γ -Strahlen (20 Gray; γ) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Nach Behandlung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Zellextrakte präpariert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Proteinmengen von p53 erfolgte durch Western-Blot. B. Gesamt-RNA wurde von jeweils zwei asynchron wachsenden Zelllinien mit Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Genotyp präpariert, elektrophoretisch aufgetrennt und die Menge an p53 Transkripten mittels Northern-Blot gemessen. Zur Kontrolle für die Qualität und Quantität der RNA wurde mit GAPDH als interner Standard hybridisiert.

Die Bestrahlung mit UV C führte nach sechs und 24 Stunden in beiden Zelltypen zu erhöhten Proteinmengen von p53 (Abb. 7A, 6 und 24). Auch zwei und vier Stunden nach Gamma-Bestrahlung der Zellen konnte in beiden Zelltypen eine erhöhte Menge an p53 gemessen werden (Abb. 7A, 2 und 4). Die gleiche effiziente Induktion der Proteinmengen von p53 in Wildtyp und in *c-jun*^{-/-} Zellen ist ein Hinweis darauf, daß

die verstärkte Expression von p53 in Abwesenheit von c-Jun auf einer erhöhten, nicht aber auf einer maximalen Induktion beruht, die unabhängig von dem bekannten Mechanismus der Proteinstabilisierung sein könnte.

Um die Transkription von p53 in den beiden Zelltypen zu bestimmen, wurde aus asynchron wachsenden Zellen RNA isoliert und die Menge an Transkripten von p53 im Northern-Blot nachgewiesen. Wie aus Abbildung 7 B hervorgeht, waren in beiden untersuchten Zelllinien ohne c-Jun erhöhte Mengen an p53 RNA im Vergleich zu den beiden untersuchten Wildtyp Zelllinien festzustellen. Damit konnte gezeigt werden, daß der Verlust von c-Jun zu einer erhöhten Menge an p53 Transkripten führt. Dies konnte auch in einem transienten Transfektionsexperiment bestätigt werden. Die Transkription eines p53 Promotor-Luciferase Reporter Konstruktes war in *c-jun*^{-/-} Zellen, im Vergleich zu Wildtyp Zellen zwei bis dreifach erhöht (Schreiber et al., 1998). Zusammen genommen bedeutet dies, daß die erhöhten Mengen an p53 in den c-Jun defizienten Zellen somit auf eine verstärkte Transkription von p53 zurückzuführen ist; ein Mechanismus, der für die Regulation von p53 bisher völlig neu ist. c-Jun inhibiert die Expression von p53, so daß in Abwesenheit von c-Jun die basale Expression von p53 erhöht ist. Als direkte Konsequenz wird das Zielgen von p53, p21, verstärkt exprimiert, was zu einer Inhibierung der Zyklin-abhängigen Kinasen führt. Diese verringerte Aktivität von Zyklin D-CDK4/6 und Zyklin E-CDK2 führt zu einem verzögerten Übergang von der G1- in die S-Phase (Abb. 8).

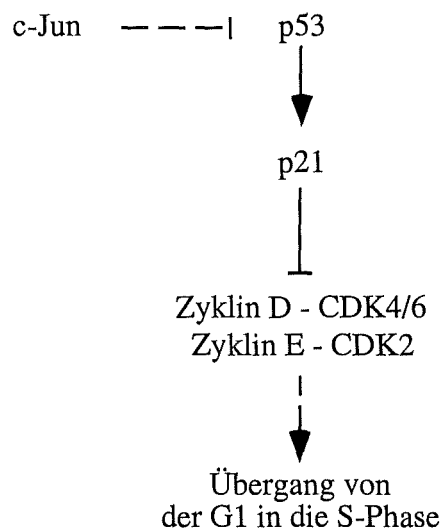


Abb. 8: c-Jun ist ein negativer Regulator der p53 Expression

Fehlt c-Jun, ist die Expression von p53 erhöht. Dadurch werden auch direkte Zielgene von p53, wie der Zellzyklusinhibitor p21, vermehrt synthetisiert. p21 inhibiert die Aktivität der Zyklin D- wie auch Zyklin E-assoziierten Kinasen. Als Folge wird der Übergang von der G1- in die S-Phase beeinträchtigt.

3.1.5. Die Effekte von c-Jun sind abhängig von p53

Es stellt sich nun die Frage, ob die erhöhte Expression von p53 kausal für die verminderte Proliferation von Zellen in Abwesenheit von c-Jun ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Zellen untersucht, denen neben c-Jun noch zusätzlich p53 fehlt. Nach Kreuzung von *c-jun* heterozygoten und p53 heterozygoten Mäusen wurden Embryonen vom Genotyp *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} isoliert. Aus diesen Embryonen wurden, ähnlich wie bei den *c-jun*^{-/-} Embryonen, Fibroblasten isoliert (Schreiber et al., 1998). Die Proliferation der Fibroblasten wurde anhand von Wachstumskurven bestimmt. Dazu wurden 2×10^5 Zellen der unterschiedlichen Zelltypen ausplattiert und alle vier Tage nach Ablösen gezählt und abermals ausplattiert. Die kumulative Zellzahl ist in Abbildung 9 dargestellt.

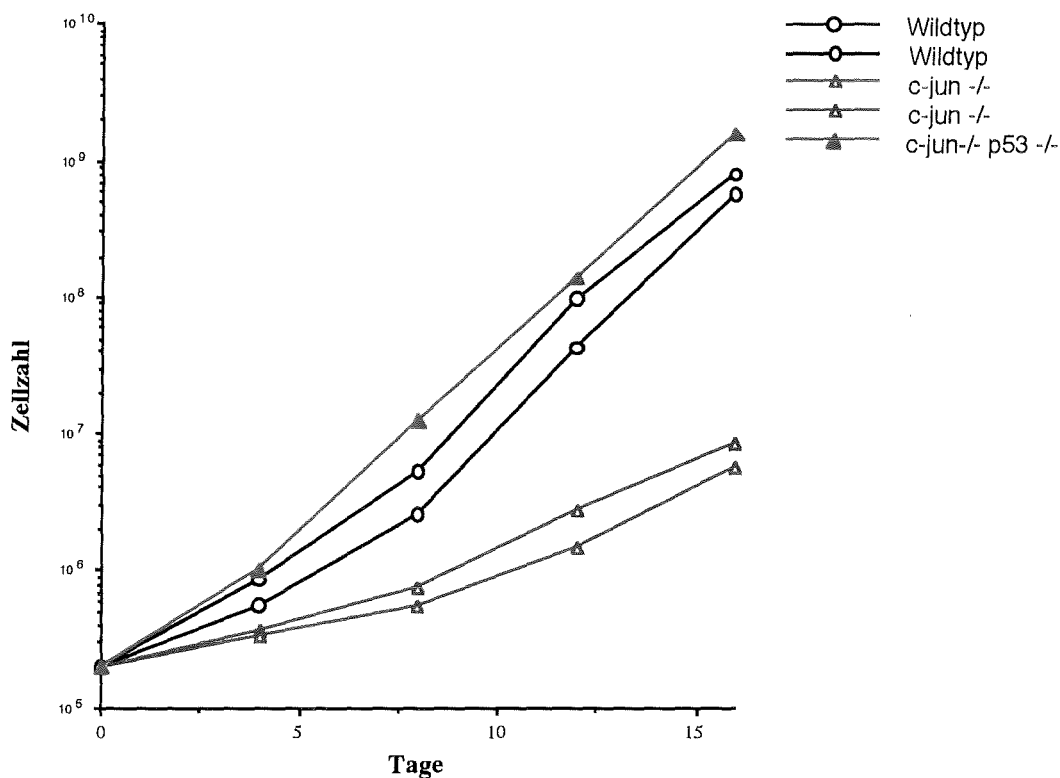


Abb. 9: Das zusätzliche Fehlen von p53 hebt den Proliferationsdefekt von *c-jun*^{-/-} Zellen wieder auf.

Von einer *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} (Δ gefüllt), und jeweils zwei Wildtyp (O) und *c-jun*^{-/-} (Δ) Zelllinien wurden 2×10^5 Zellen ausplattiert, alle vier Tage abgelöst, gezählt und abermals ausplattiert. Die kumulative Zellzahl wurde daraus errechnet und graphisch dargestellt.

Die Proliferation der *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-} Zellen war im Vergleich zu den Wildtyp Zellen leicht und im Vergleich zu Zellen, bei denen nur c-Jun fehlt, deutlich erhöht (Abb. 9). Dies bedeutet, daß das zusätzliche Fehlen von p53 die verminderte Zellproliferation von c-Jun defizienten Zellen wieder aufhebt. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, war mit dem von Wildtyp Zellen vergleichbar (nicht gezeigt). Die Aktivität der Zyklin D1- und Zyklin E-abhängigen Kinasen war nach Synchronisierung der Zellen und anschließender Serumgabe wieder erhöht (Abb. 10):

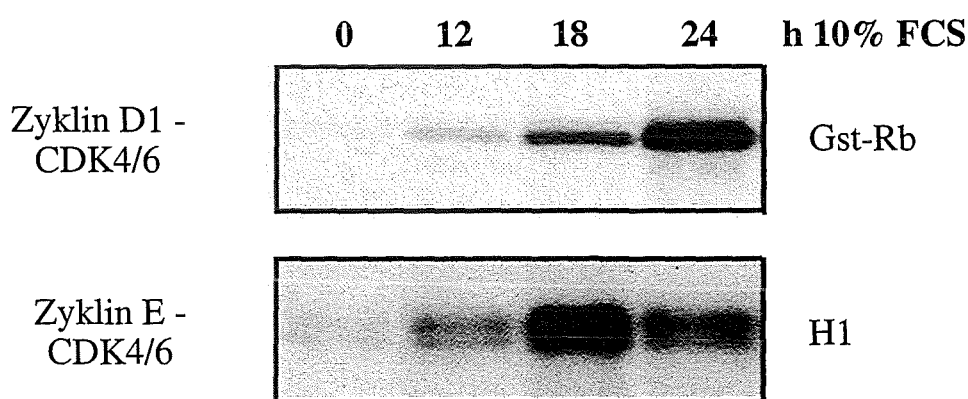


Abb. 10: Die Zyklin-abhängigen Kinasen sind in Abwesenheit von c-Jun und p53 wieder aktiv
Die Zellen, denen sowohl c-Jun als auch p53 fehlt, wurden nach erfolgter Synchronisierung trypsinisiert und in Medium mit 10% FCS ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte präpariert. Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Zyklin D1 (DCS11) und Zyklin E (M20) wurden durchgeführt. Die Aktivität der präzipitierten Kinasen CDK4/6 (Zyklin D1-assoziierter Komplex) und CDK2 (Zyklin E-assoziierter Komplex) wurde wie in Abb. 4 bestimmt.

In synchronisierten, d.h. in der G0-Phase arretierten *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-} Zellen waren die Zyklin D1- und Zyklin E-abhängigen Kinasen nicht aktiv. 12 Stunden nach Seruminduktion war eine leichte, nach 18 und 24 Stunden eine deutlich gesteigerte Zunahme der Aktivität zu sehen (Abb. 10). Die Expression der Zykline D2 und D3 war in den Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien ähnlich, wobei Zyklin D2 in Abwesenheit von c-Jun und p53 leicht erhöht war (Abb. 11A und B). Die Menge an den Zyklin-assozierten Kinasen CDK2 und 4 war nicht verändert, CDK6 hingegen war in den *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-} Zellen, im Vergleich zu den Wildtyp oder *c-jun*^{-/-} Zellen, erhöht (Abb. 12; CDK2 nicht gezeigt). Die Aktivität der Zyklin D1- und Zyklin E-abhängigen Kinasen war in Abwesenheit von c-Jun und p53 vergleichbar mit den Aktivitäten der Kinasen in Wildtyp Zellen (Abb. 10 und Abb. 4).

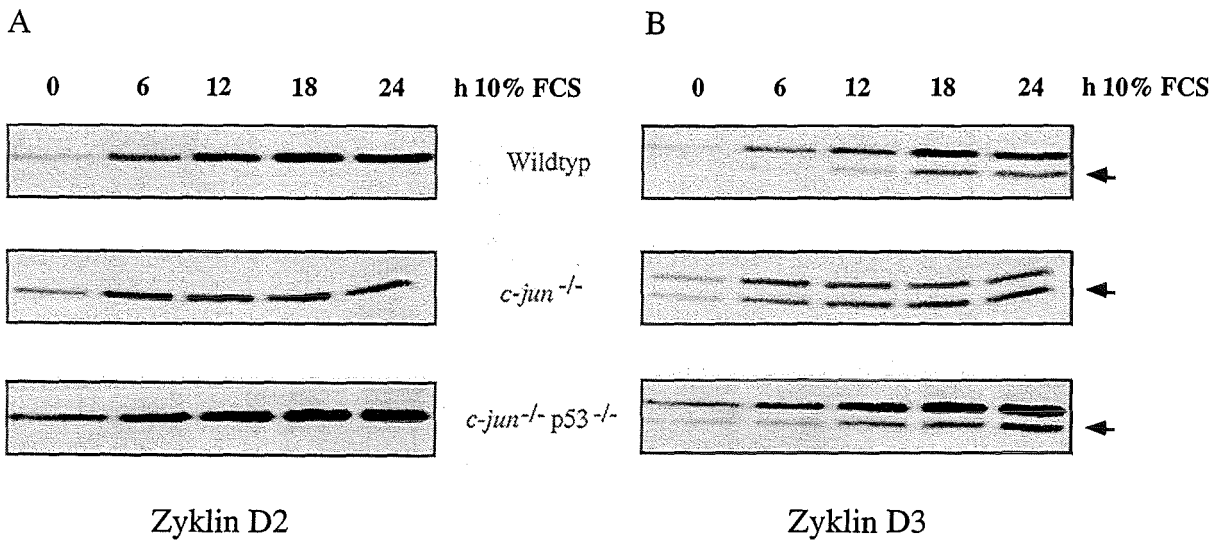


Abb. 11: Die Menge der Zykline D2 und D3 ist unabhängig von c-Jun

Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-} Zelllinien wurden nach Synchronisierung trypsinisiert und in Medium mit 10% FCS ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellextrakte präpariert und die Menge an Zyklin D2 (A) und Zyklin D3 (B) durch Western-Blot nachgewiesen. Der Pfeil zeigt Zyklin D3 an.

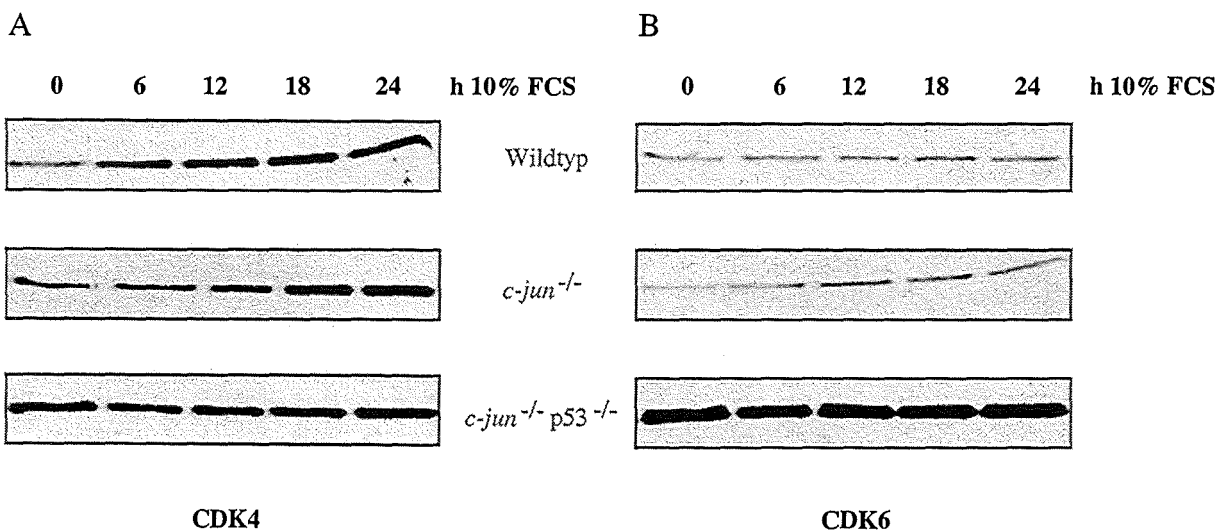


Abb. 12: Die Menge der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6

Die Zellen (Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-}) wurden, wie in Abb. 11 beschrieben, behandelt und die Expression der Kinasen mittels Western-Blot nachgewiesen.

Da sich in den *c-Jun* defizienten Zellen im Vergleich zum Wildtyp nur die Proteinmengen des Inhibitors p21, aber nicht p16 und p27 unterschieden, wurde nur die Menge an p21 im Western-Blot überprüft. Die Proteinmengen des Inhibitors p21 waren in den Zellen ohne *c-Jun* und p53 so gering, daß sie nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 13). Wie bereits erwähnt, ist die Expression von p21 in *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verstärkt. p21, das ein bekanntes Zielgen von p53 ist (El-Deiry et al., 1993), kann auch unabhängig von p53 exprimiert werden (Macleod et al., 1995). Um nachzuprüfen, ob es sich bei der hier untersuchten Expression von p21 um einen p53 abhängigen Effekt handelt, wurden als Kontrolle Zellen untersucht, denen nur p53 fehlt. Auch in diesen Zellen konnte kein p21 nachgewiesen werden (Abb. 13). Die fehlende Expression des Inhibitors in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen ist daher ein Effekt, der eindeutig auf die Expression von p53 zurückgeführt werden kann.

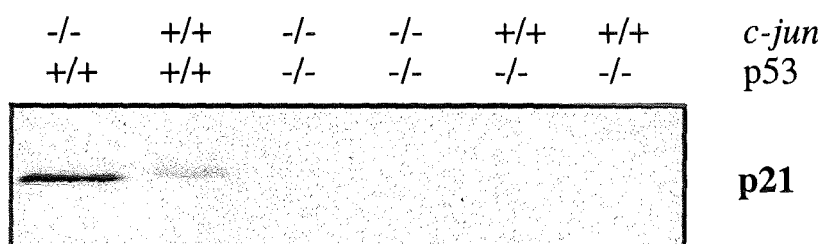


Abb. 13: p21 wird in Abwesenheit von p53 nicht exprimiert

Zellextrakte von asynchron wachsenden Wildtyp (+/+ +/+), *c-jun*^{-/-} (-/- +/+), *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} (-/- -/-) und p53^{-/-} (+/+ -/-) Zelllinien wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Anwesenheit von p21 mittels Western-Blot bestimmt. (Abb. aus Schreiber et al., 1998)

Erhöhte Expression von p53 führt zur erhöhten Menge an p21, das die Zyklin-abhängigen Kinasen hemmt (siehe auch Abb. 8). Aufgrund dessen wird der Transkriptionsfaktor E2F in der frühen G1-Phase des Zellzyklus durch die Bindung von pRb in seiner Aktivität gehemmt. Erst nach der Phosphorylierung von pRb durch die Zyklin-abhängigen Kinasen dissoziiert der E2F/pRb Komplex und E2F kann transkriptionell aktiv werden. Zur Kontrolle der Aktivität von E2F wurde die Expression eines Zielgens von E2F, PCNA, einer Untereinheit der DNA-Polymerase δ , auf Proteinebene mittels Western-Blot ermittelt. Wildtyp Zellen hatten im arretierten

weniger PCNA, nach Serumstimulation war die Proteinmenge an PCNA erhöht (Abb. 14). Die Expression von PCNA war in Zellen, in denen c-Jun fehlt, im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert; eine leichter Anstieg der Proteinmengen von PCNA konnte 18 und 24 Stunden nach Serumstimulation nachgewiesen werden.

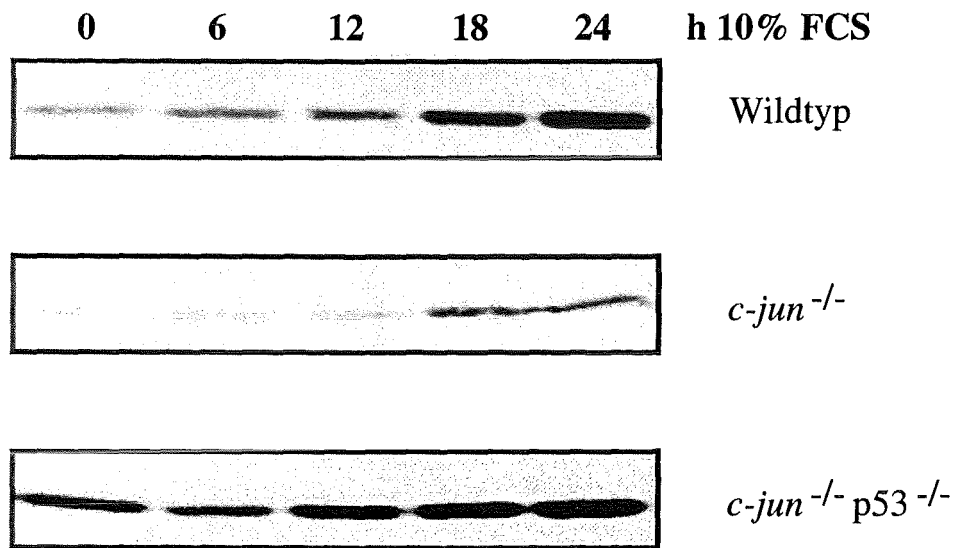


Abb. 14: PCNA ist in c-Jun defizienten Zellen vermindert

Zellextrakte von synchronisierten und serumstimulierten Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wurden präpariert und die Expression von PCNA nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Western-Blot bestimmt.

In c-Jun und p53 defizienten Zellen war die Expression von PCNA im Vergleich zu den *c-jun*^{-/-} Zellen deutlich erhöht (Abb. 14), ähnlich den Mengen in Wildtyp Zellen. Die verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F in *c-jun*^{-/-} Zellen kann durch zusätzliches Fehlen von p53 wieder erhöht werden. Damit konnte zusätzlich gezeigt werden, daß ein weiterer c-Jun abhängiger Defekt, der von der Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen und der Phosphorylierung von pRb gesteuert wird, durch die zusätzliche Inaktivierung von p53 behoben werden kann.

3.2. Teil 2: Die Rolle von c-Jun in der Apoptose und in der Etablierung von zellulären Schutzmechanismen gegenüber alkylierenden Agenzien

3.2.1. In Abwesenheit von c-Jun ist die AP-1 abhängige Genexpression nach genotoxischen Substanzen verringert

Extrazelluläre Faktoren wie Cytokine, Wachstumsfaktoren, UV-Bestrahlung oder alkylierende Agenzien sind Induktoren von Signaltransduktionswegen, die in der Aktivierung von AP-1 enden. Als Folge davon kommt es zu Veränderungen in der Transkription von AP-1 abhängigen Genen. Um die Rolle von c-Jun in der Induktion dieser Gene zu analysieren, wurden c-Jun defiziente Zellen mit AP-1 aktivierenden Induktoren behandelt und mit Zellen verglichen, die ein intaktes *c-jun* Gen besitzen. Die Induktion von AP-1 abhängigen Genen ist auf die Bindung und Transaktivierungsfunktion von Dimeren von c-Jun mit ATF und anderen Mitgliedern der Jun- und Fos-Familien zurückzuführen. c-Jun/ATF Heterodimere oder ATF Homodimere induzieren Gene mit einer 8 bp Konsensus AP-1 Bindesequenz, wie sie im Promotor von *c-jun* vorkommt, binden aber nicht an die 7 bp AP-1 Konsensus-Sequenz. Beispiele für die Klasse von Genen, die eine 7 bp AP-1 Konsensus-Sequenz enthalten, sind die Matrix Metalloproteinasen Kollagenase und Stromelysin; sie werden durch die Bindung von Jun/Fos Heterodimeren transkriptionell aktiviert. Die Expression der einzelnen Vertreter AP-1 induzierbarer Gene wurde mittels Northern-Blot Analyse nachgewiesen. Da *c-jun* selbst ein AP-1 reguliertes Gen ist, wurde als erstes die Expression von *c-jun* untersucht. Wildtyp Zellen zeigten eine signifikante basale Expression von *c-jun*, die sowohl durch UV C als auch nach TPA-Behandlung stark induzierbar war (Abb. 15A). Die basale Expression von *c-jun* (eine Fusions-RNA aus *c-jun* und dem Markergen *neo*) war in Abwesenheit von c-Jun im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert. Nach Behandlung mit UV C oder TPA war eine leichte Induktion zu erkennen (Abb. 15A). Die Aktivierung von *c-jun*, die durch die Bindung an die 8 bp AP-1 Bindestelle zustande kommt, wird in *c-jun*^{-/-} Zellen höchstwahrscheinlich durch ATF Homodimere, die somit die Funktion von c-Jun teilweise übernehmen, vermittelt. Im Gegensatz dazu war die Expression der Kollagenase- und Stromelysin-Gene in c-Jun defizienten Zellen nicht nachweisbar.

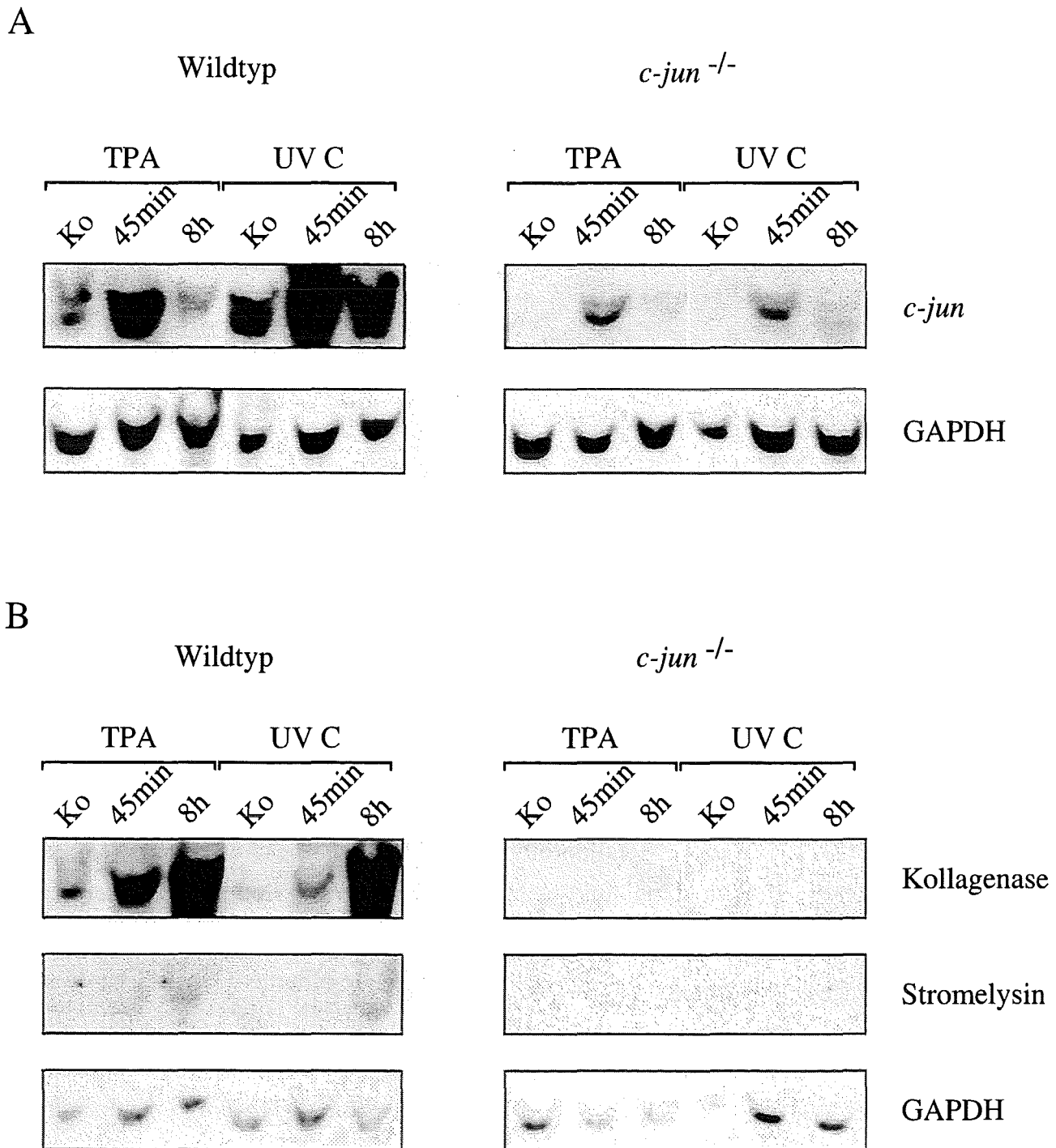


Abb. 15: Die Expression AP-1 abhängiger Gene nach Behandlung mit UV C oder TPA ist in *c-Jun* defizienten Zellen reduziert

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit TPA (100 ng/ml) oder UV C (30 J/m²) behandelt (TPA, UV C) oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Filter verbracht und mit den spezifischen Sonden der angegebenen Gene hybridisiert (Northern-Blot). Zur Kontrolle für die Qualität und Quantität der RNA wurde mit GAPDH als interner Standard hybridisiert.

Wildtyp Zellen wiesen nach jeweils achtstündiger UV C und TPA Behandlung eine deutlich erhöhte Expression der Kollagenase- und Stromelysin-Gene auf (Abb. 15B). In Abwesenheit von c-Jun können offensichtlich die anderen Mitglieder der Jun-Familie keine kompensatorischen Aktivitäten ausüben.

Ein sehr ähnliches Bild ergab sich nach Behandlung der Zellen mit dem alkylierenden Agens MMS (Methylmethansulfonat), einem der stärksten Induktoren der *c-jun* Expression (Abb. 16).

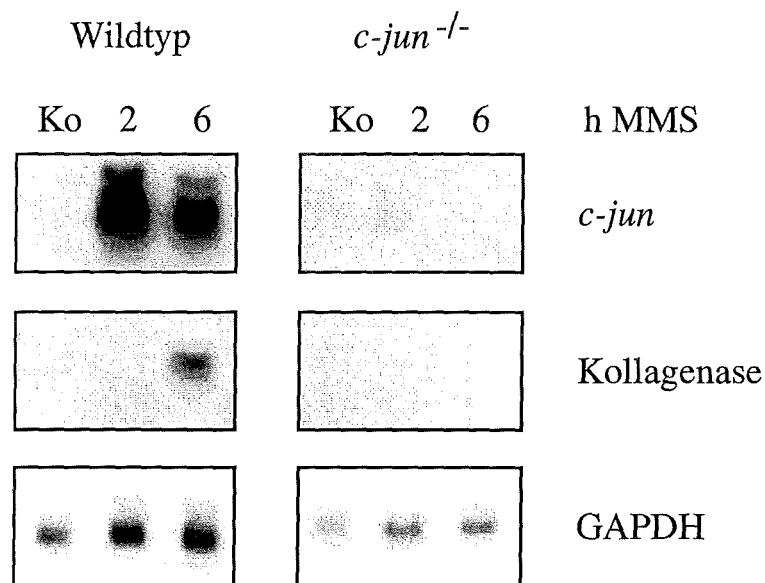


Abb. 16: Die Expression AP-1 abhängiger Gene nach Behandlung mit MMS ist in c-Jun defizienten Zellen reduziert

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit MMS (0,4 mM) behandelt (MMS) oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Menge der angezeigten Transkripte mittels Northern-Blot gemessen. Zur Kontrolle für die Qualität und Quantität der RNA wurde mit GAPDH als interner Standard hybridisiert.

3.2.2. Der Verlust von c-Jun erzeugt Hypersensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien

Die sehr effiziente Induktion der Expression des *c-jun* Gens nach Behandlung mit MMS läßt vermuten, daß die verstärkte Neusynthese von c-Jun eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort auf dieses Mutagen spielen könnte. Es wäre denkbar, daß die starke Aktivierung von *c-jun* bzw. c-Jun regulierter Gene einen Schutzmechanismus für die Zelle und somit für deren Überleben darstellt. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen mit genotoxischen Agenzien behandelt und das klonale Überleben gemessen.

Eine definierte Anzahl von Zellen von jeweils zwei Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien wurde ausplattiert, einen Tag später mit unterschiedlichen Konzentrationen MMS oder einem zweiten Vertreter von Alkylanzien, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) behandelt. Nach 12 Tagen wurden die Kolonien, die sich aus einer einzelnen Zelle gebildet hatten, mit Kristallviolett angefärbt und gezählt. Die Kolonienzahl der unbehandelten Kontrolle stellt ein Überleben von 1, d.h. 100% dar und dient als Referenz für die Zahl der Kolonien der behandelten Zellen.

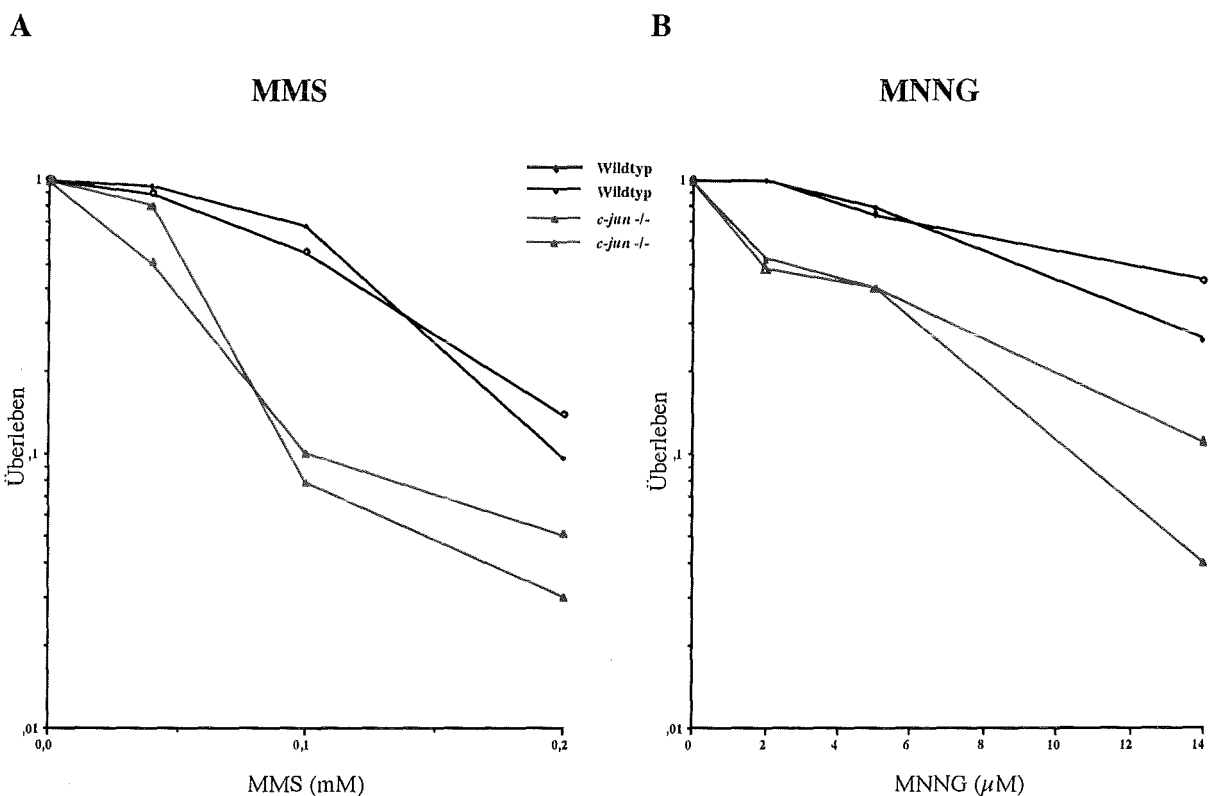


Abb. 17: *c-jun*^{-/-} Zellen sind hypersensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien

Fünfhundert Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Fibroblasten wurden ausplattiert und nach 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an MMS oder MNNG behandelt. Die Zellen wurden zwölf Tage kultiviert, wobei alle vier Tage das Medium gewechselt wurde. Danach wurden die Kolonien mit Kristallviolett angefärbt und gezählt. Das Überleben ist gegen die verwendete Konzentration der alkylierenden Substanzen aufgetragen, wobei die Kolonienzahlen der unbehandelten Kontrollen jeweils ein Überleben von 1 darstellen. Die Abb. zeigt exemplarisch eines von jeweils vier Experimenten mit jeweils zwei verschiedenen Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien.

Nach Behandlung mit 0,04 mM MMS zeigten beide *c-jun*^{-/-} Zelllinien ein Überleben von 50% und 80%. Dies ist deutlich geringer als die Überlebensrate der Wildtyp Zellen (mehr als 90%) bei derselben Konzentration (Abb. 17). Bei einer

Konzentration von 0,1 mM MMS wird der Unterschied in der Anzahl der Kolonien von Wildtyp und *c-Jun* defizienten Zellen noch deutlicher: Wildtyp Zellen zeigten ein Überleben von über 60%, *c-jun*^{-/-} Zellen hingegen von weniger als 10%. Bei einer Konzentration von 0,2 mM MMS war auch bei den Wildtyp Zellen eine reduzierte Anzahl von Kolonien zu beobachten (13 bzw. 17% Überleben), die bei den *c-jun*^{-/-} Zellen wiederum niedriger ausfiel (3 bzw. 4% Überleben). Abbildung 17 zeigt eine Zusammenfassung aus mindestens vier Experimenten mit jeweils zwei Wildtyp und zwei *c-jun*^{-/-} Zelllinien. In allen Fällen waren die Zellen, bei denen *c-Jun* fehlt, im Vergleich zu Wildtyp Zellen hypersensitiv gegenüber MMS.

Ein sehr ähnliches Bild war nach Verwendung von MNNG zu beobachten. Die Unterschiede in der Kolonienbildung traten bereits bei einer Konzentration von 2 µM MNNG auf (Abb. 17). Während bei Wildtyp Zellen kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen auftrat, war die Anzahl der Kolonien bei den *c-jun*^{-/-} Zellen auf 50% reduziert. Mit höheren Konzentrationen nahm die Zahl der sich bildenden Kolonien zunehmend in beiden Ansätzen ab, die Anzahl der Kolonien der Wildtyp Zellen war aber stets höher als die der *c-jun*^{-/-} Zellen.

Während das Fehlen von *c-Jun* auch eine Hypersensitivität gegenüber UVC hervorruft (Schreiber et al., 1995), führte die Gamma-Bestrahlung in den *c-jun*^{-/-} Zellen zu keinen verringerten Kolonienzahlen im Vergleich zum Wildtyp (nicht gezeigt).

3.2.3. Die DNA-Reparatur ist in *c-jun*^{-/-} Zellen nicht beeinträchtigt

Alkylierende Agenzien wie MMS und MNNG führen zur Methylierung der DNA und somit zu DNA-Schäden, die normalerweise von den Zellen durch Reparaturmechanismen behoben werden können. Dies geschieht vor allem durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur, bei der nach dem Ausschneiden der DNA-Läsionen eine DNA-Neusynthese außerhalb der S-Phase stattfindet, die als außerplanmäßige DNA-Synthese ("unscheduled DNA-synthesis": UDS) bezeichnet wird. Eine Methode, um UDS zu messen, ist die Markierung der neu synthetisierten DNA mit ³H-Thymidin. Die neusynthetisierten, radioaktiv markierten DNA-Stücke, die während der Reparatur der DNA, aber auch während der normalen Replikation entstehen, können nach Beschichtung mit einer Fotoemulsion aufgrund der Schwärzung der Silberkörnchen im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden.

Um auszuschließen, daß die Hypersensitivität gegenüber MMS auf eine unzureichende oder fehlende Reparatur der DNA zurückzuführen ist, wurde die UDS nach Behandlung mit MMS bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit UV bestrahlt wurden. Es ist bekannt, daß UV-induzierte Thymidindimere mittels UDS entfernt werden (Wegner et al., 1989). Die radioaktive Markierung der UDS-DNA ist proportional zur Effizienz der DNA-Reparatur und erlaubt dadurch die Messung der Reparaturfähigkeit.

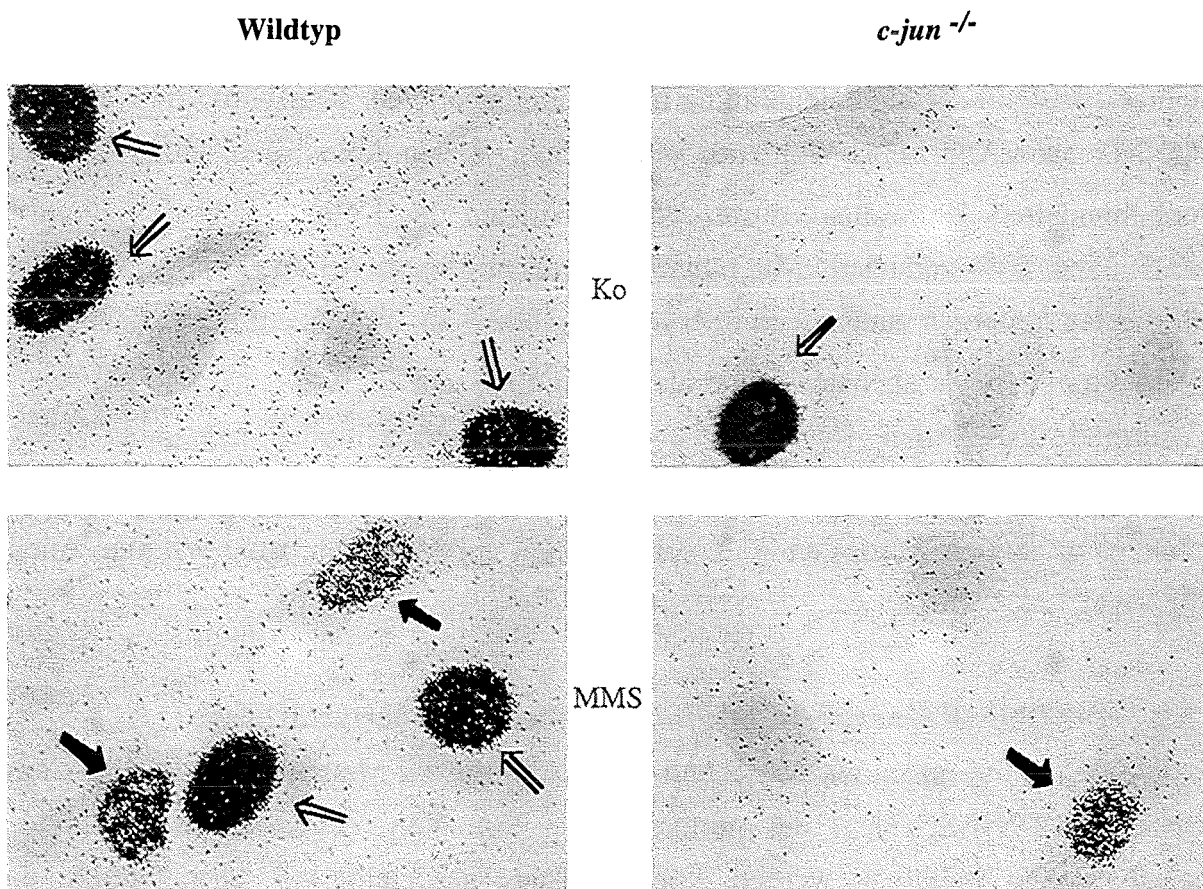


Abb. 18: In situ Detektion der DNA-Reparatur in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen

Zellen wurden auf Objektträger ausplattiert und für zwei Stunden mit MMS (1 mM) behandelt (MMS) oder blieben unbehandelt (Ko). Die Zellen wurden gleichzeitig mit ³H-Thymidin-haltigem Medium inkubiert, nach den zwei Stunden fixiert und mit einer Fotoemulsion im Dunkeln überschichtet und so zehn Tage inkubiert, um die Schwärzung der Silberkörnchen sichtbar zu machen. Nach Entwickeln der Fotoemulsion wurden die Zellen zur Visualisierung mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die Aufnahme erfolgte mittels einer Videokamera. Die leeren Pfeile stellen die Kerne dar, die sich in der S-Phase befanden, die ausgefüllten Pfeile die Kerne, in denen UDS stattfand. In dieser Abb. sind exemplarisch jeweils nur eine Wildtyp und eine *c-jun*^{-/-} Zelllinie gezeigt.

Die Zellkerne, die sich in der S-Phase befanden (Pfeil), sind aufgrund des ^3H -Thymidin-Einbaus in die gesamte neusynthetisierte DNA intensiv schwarz gefärbt und somit leicht von den Kernen der anderen Zellzyklusphasen, die keine Schwärzung aufweisen, zu unterscheiden (Abb. 18, Ko). Zur Visualisierung der nichtmarkierten Kerne wurden die Zellen mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Nach Behandlung mit 1 mM MMS zeigten einige dieser nicht S-Phase-Kerne punktierte Schwärzungen der Silberkörnchen (ausgefüllter Pfeil), die auf eingebautes ^3H -Thymidin aufgrund DNA-Reparatur zurückzuführen sind (Abb. 18, MMS). Sowohl Wildtyp als auch *c-jun*^{-/-} Zellen zeigten diese Schwärzungen sowohl nach Bestrahlung mit UV C als auch nach Behandlung mit MMS, was auf eine stattfindende UDS zurückzuführen ist (Abb. 18). Um die UDS zu quantifizieren, wurden die Zellen mittels einer Videokamera am Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe eines Computerprogramms (NIH-Image) densitometrisch ausgewertet. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt, wobei die Intensität der Schwärzung der Kerne ein Maß für den Gehalt des eingebauten radioaktiv markierten Thymidins ist. Die UDS nach Behandlung mit MMS war in beiden Zelltypen nicht signifikant verschieden (Abb. 19). Die Bestrahlung der Zellen mit UV C führte auch zu keiner unterschiedlichen UDS in Wildtyp oder *c-jun*^{-/-} Zellen (Abb. 19). Der Verlust von c-Jun führt also nicht zu einer verminderten Reparatur der DNA nach Behandlung mit MMS oder UV C und kann daher als Ursache für die Hypersensitivität gegenüber MMS (und UV C) ausgeschlossen werden.

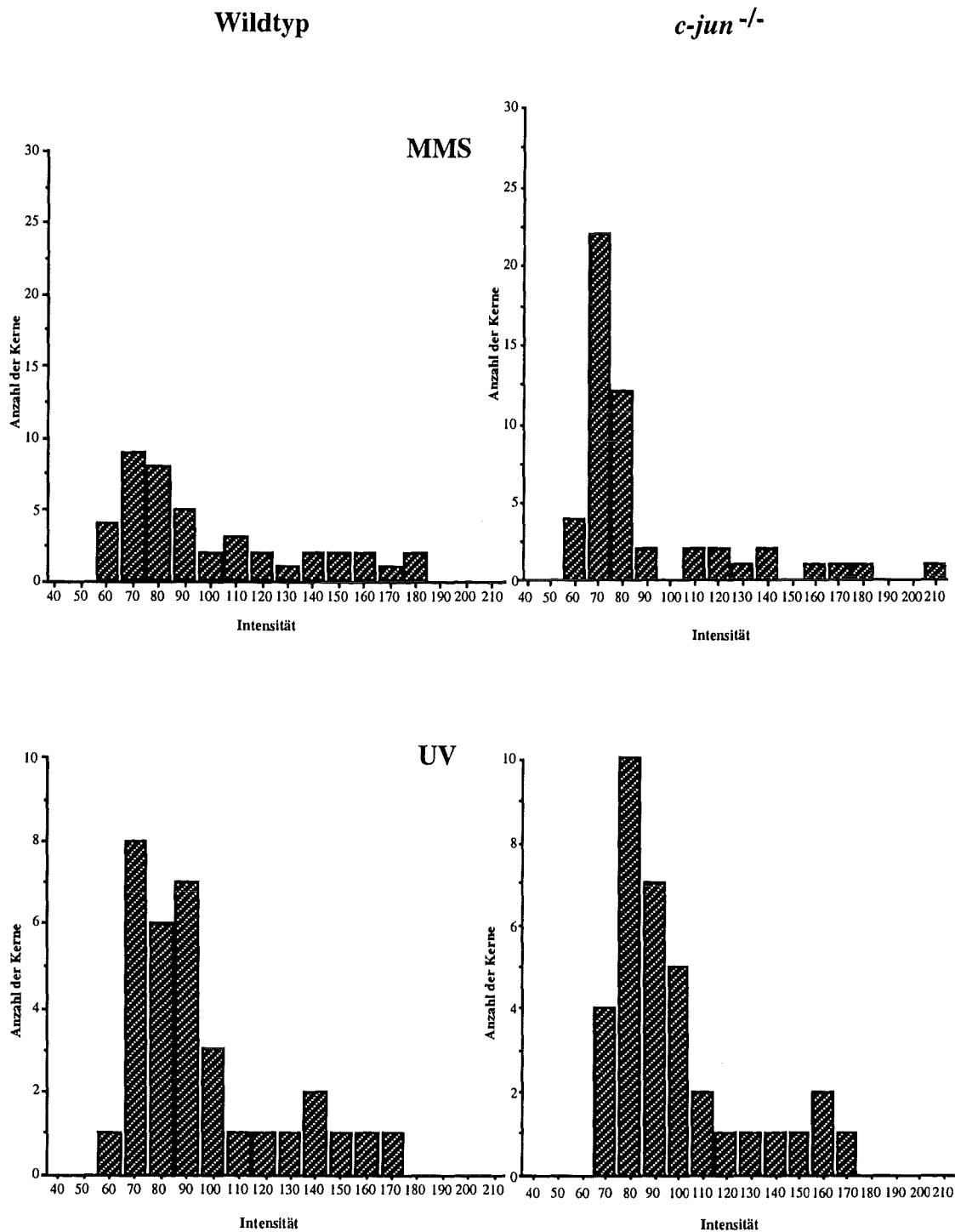


Abb. 19: Die DNA-Reparatur ist in *c-Jun* defizienten Zellen nicht vermindert

Die UDS der *in situ* Autoradiographien der mit MMS (1 mM; MMS) oder UV C (30 J/m²; UV) behandelten Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurde mit Hilfe des Computerprogramms NIH-Image ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Anzahl der Kerne ist gegen die Intensität der Schwärzung der sich nicht in der S-Phase befindenden Kerne dargestellt. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte von jeweils zwei Zelllinien und zwei verschiedenen Experimenten. (Um die Auswertung nicht voreingenommen durchzuführen, wurden die Objektträger mit den *in situ* Autoradiographien von einer dritten Person beschriftet. Erst nach erfolgter Auswertung wurden die jeweiligen Zelltypen und Behandlungen zugeordnet.)

3.2.4. Der Verlust von c-Jun führt zu verringerter Apoptose

Eine weitere Möglichkeit für eine Erhöhung der Hypersensitivität der *c-jun*^{-/-} Zellen kann vermehrte Apoptose (programmierter Zelltod) sein. Erhöhte Apoptose wurde kürzlich als Ursache der Hypersensitivität von c-Fos defizienten Zellen gegenüber UVC identifiziert (Schreiber et al., 1995). Deshalb wurde untersucht, ob c-Jun defiziente Zellen, ähnlich wie Zellen bei denen c-Fos fehlt, eine erhöhte Apoptose aufweisen. Ein Endpunkt bei der Apoptose ist die Fragmentierung der genomischen DNA, die als apoptotische DNA bezeichnet wird, und die nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel ein typisches Leitermuster aufweist. Diese Leiter kommt durch das Schneiden der Nukleasen zwischen den Nukleosomen zustande, wobei gleichmäßige, oligo-Nukleosomen große Stücke ($n \times 180$ bp) entstehen. Als Kontrolle für diese Nachweismethode wurden lymphoide Zellen benutzt, da diese nach Behandlung mit dem Steroidhormon Dexamethason eine DNA-Leiter aufweisen (Weaver et al., 1993).

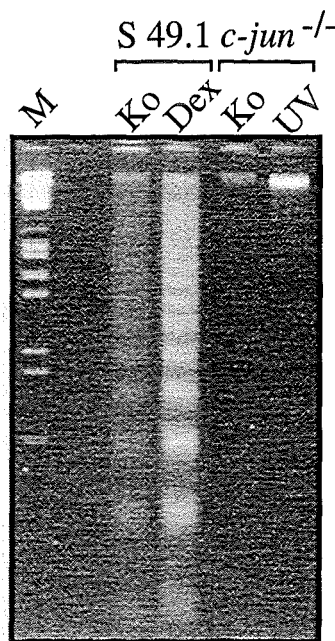


Abb. 20: Die apoptotische DNA-Leiter kann in Fibroblasten im Gegensatz zu lymphoiden Zellen nicht detektiert werden

Lymphoide Zellen (S 49.1) wurden mit Dexamethason (10^{-7} M; Dex) und *c-jun*^{-/-} Fibroblasten (*c-jun*^{-/-}) mit UV C behandelt (30 J/m^2 ; UV) oder blieben unbehandelt. 24 Stunden später wurde die genomische DNA isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. M: Eco RI/HindIII geschnittene λ -DNA als Größenstandard.

Aus Fibroblasten, die mit UV oder MMS behandelt wurden, und lymphoiden Zellen, die mit Dexamethason behandelt wurden, wurde genomische DNA isoliert. Nach Auftrennung der isolierten DNA im Agarosegel konnte bei den lymphoiden Zellen eine DNA-Leiter nachgewiesen werden, während in Fibroblasten keine DNA-Leiter detektiert werden konnte (MMS-Behandlung nicht gezeigt und Abb. 20). Diese Methode eignet sich daher nicht als Standardmethode zum Nachweis der Apoptose in Fibroblasten.

Eine geeignetere Nachweismethode der Apoptose, die zudem noch den Vorteil der genaueren Quantifizierung bietet, ist die Messung der apoptotischen DNA im FACS-Gerät. Um diese Methode zu optimieren, wurden *c-fos*^{-/-} Zellen verwendet, die, wie bereits erwähnt, eine erhöhte Apoptose nach Bestrahlung mit UV C aufweisen (Schreiber et al., 1995). Wildtyp und *c-fos*^{-/-} Zelllinien wurden ausplattiert, mit UV C bestrahlt, 24 Stunden später abgelöst und in PBS aufgenommen. Zur Anfärbung der DNA wurden die Zellen mit einem Puffer, der ein Detergenz und Propidiumjodid enthält, versetzt. Die Intensität des Propidiumjodids ist gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. In den Histogrammen der FACS-Analyse (Abb. 21) ist die apoptotische DNA aufgrund ihrer Position von dem charakteristischen DNA-Profil der G1-, S- oder G2-Phase des Zellzyklus deutlich zu unterscheiden. Die DNA-Fragmente, die während der Apoptose entstehen und 30-50 bzw. 200-300 kb groß sind, sind kleiner als die DNA der G1-Phase und somit links vor dieser im Zellzyklusprofil zu sehen (Marker M1). Um kleinere Bruchstücke und Trümmer der Zellen nicht in die Messung einfließen zu lassen (kleiner als 10), wurde die apoptotische DNA in einem Bereich von 10-1000 gemessen (Marker M1). Die DNA der G1-Phase erscheint als erster Peak mit einer Intensität von 10^3 , gefolgt von dem G2-Phase Peak (innerhalb des Markers M2). Die Zellen in der S-Phase erscheinen als Tal zwischen G1- und G2-Phase. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen ist jeweils angegeben. Wie erwartet, führte das Fehlen von c-Fos zu einer erhöhten Apoptose im Vergleich zum Wildtyp. In Abwesenheit von c-Fos starben 38% der Zellen nach Bestrahlung mit UV C, wohingegen bei Wildtyp Zellen 11% in die Apoptose gingen (Abb. 21).

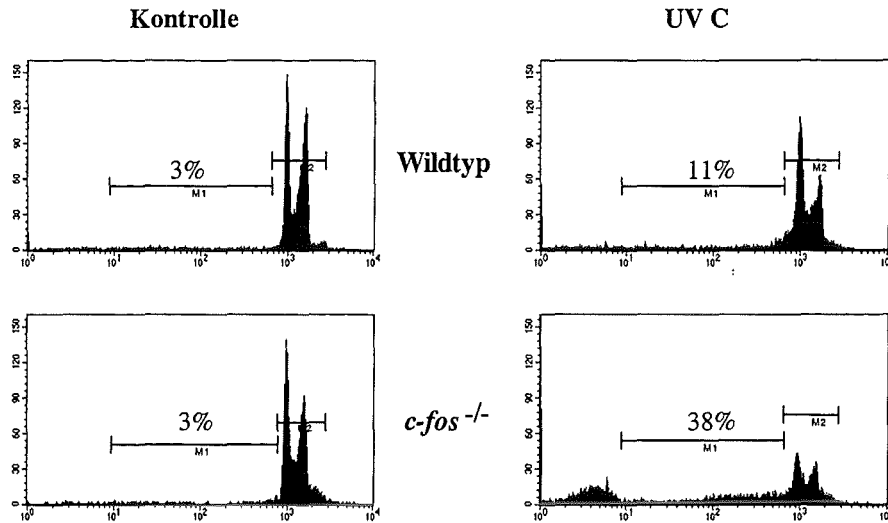


Abb. 21: Messung der Apoptose mittels FACS-Analyse

Wildtyp und *c-fos*^{-/-} Zellen wurden mit UV C bestrahlt (30 J/m²; UV C) oder bleiben unbehandelt (Kontrolle). 24 Stunden später wurden die Zellen abgelöst, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und die Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die DNA Menge ist gegen die Zellzahl aufgetragen. Im Bereich des Markers M1 liegen jene Zellen, die apoptotische DNA enthalten. Der prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen ist als Zahl oberhalb des Markers M1 angegeben. Im Bereich des Markers M2 liegt die DNA der G1-, S- und G2-Phase.

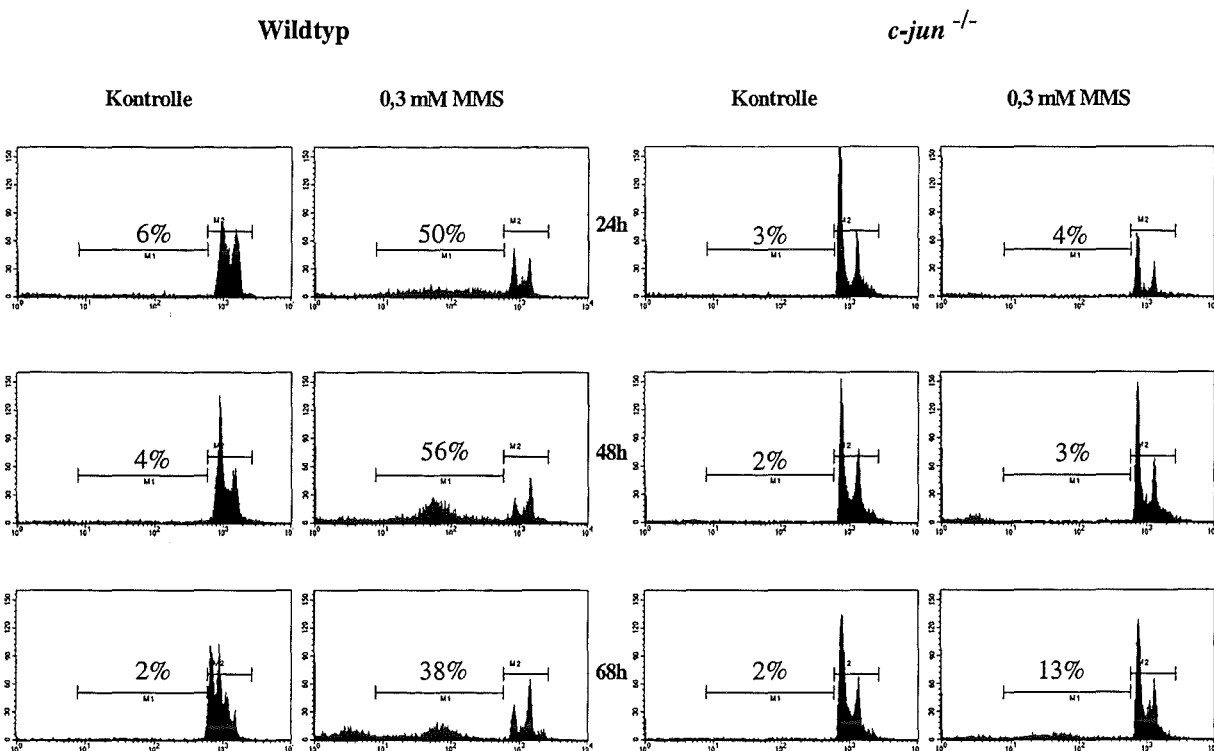


Abb. 22: In den *c-jun*^{-/-} Zellen ist die Apoptoserate nach Behandlung mit MMS reduziert

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit MMS behandelt (0,3 mM MMS) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen abgelöst, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und die Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die DNA Menge ist gegen die Zellzahl aufgetragen. Im Bereich des Markers M2 liegt die DNA der G1-, S- und G2-Phase. Der prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen ist als Zahl oberhalb des Markers M1. Die Abb. steht repräsentativ für jeweils einen Genotyp.

Um die Apoptose in Wildtyp und *c-Jun* defizienten Zellen nach Behandlung mit MMS zu messen, wurden die Zellen ausplattiert, mit MMS behandelt, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Messung im FACS-Gerät erfolgte 24, 48 und 68 Stunden nach Behandlung mit MMS. Wildtyp Zellen zeigten bereits nach 24 Stunden eine erhöhte Apoptose (50%), wobei nach 48 Stunden die Zahl der toten Zellen auf 56% stieg (Abb. 22). Nach 68 Stunden waren nur 38% apoptotische Zellen detektierbar, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß zu diesem Zeitpunkt ein Großteil der Zellen schon lysiert war, und somit als Trümmer gemessen (zwischen 1 und 10), aber nicht in die Berechnung der apoptotischen Zellen miteinbezogen wurden. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen in Abwesenheit von *c-Jun* verringerte Apoptose. So waren 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit MMS nur 4% bzw. 3% der Zellen tot, nach 68 Stunden 13%. Das Experiment wurde mit jeweils zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt; eines davon ist als Beispiel in Abbildung 22 gezeigt. Die beiden nicht gezeigten Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien ergaben ein sehr ähnliches Bild, wobei nach 68 Stunden über 62% des Wildtyps aber nur 5% der *c-jun*^{-/-} Zellen tot waren. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß in Abwesenheit von *c-Jun* das Sterben durch Apoptose nach Behandlung mit dem alkylierenden Agens MMS in den Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp stark verringert ist.

Zellen, denen *c-Jun* fehlt proliferieren langsamer als Wildtyp Zellen. Um auszuschließen, daß die ebenfalls auftretende, verminderte Apoptose auf das verlangsamte Durchlaufen des Zellzyklus zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen MMS behandelt und die Apoptose über einen längeren Zeitraum bestimmt. 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von MMS zeigten die Wildtyp Zellen einen Anstieg der Apoptose, die mit der MMS-Konzentration korrelierte (Abb. 23, 48h und 72h). Bei der höchsten Konzentration (0,4 mM) MMS starben deutlich weniger *c-jun*^{-/-} als Wildtyp Zellen (z.B. nach 72 Stunden: 6% bzw. 14% verglichen mit 20% bzw. 37%). Nach 144 Stunden (sechs Tagen) war der Anteil der apoptotischen Zellen beim Wildtyp immer noch höher im Vergleich zu den *c-jun*^{-/-} Zellen (54% bzw. 48% verglichen mit 9% bzw. 16%). Zu diesem Zeitpunkt hatten die Wildtyp Zellen bereits eine hohe Zelldichte erreicht, aufgrund dessen ein erhöhtes Sterben auftrat (Abb. 23, 144h).

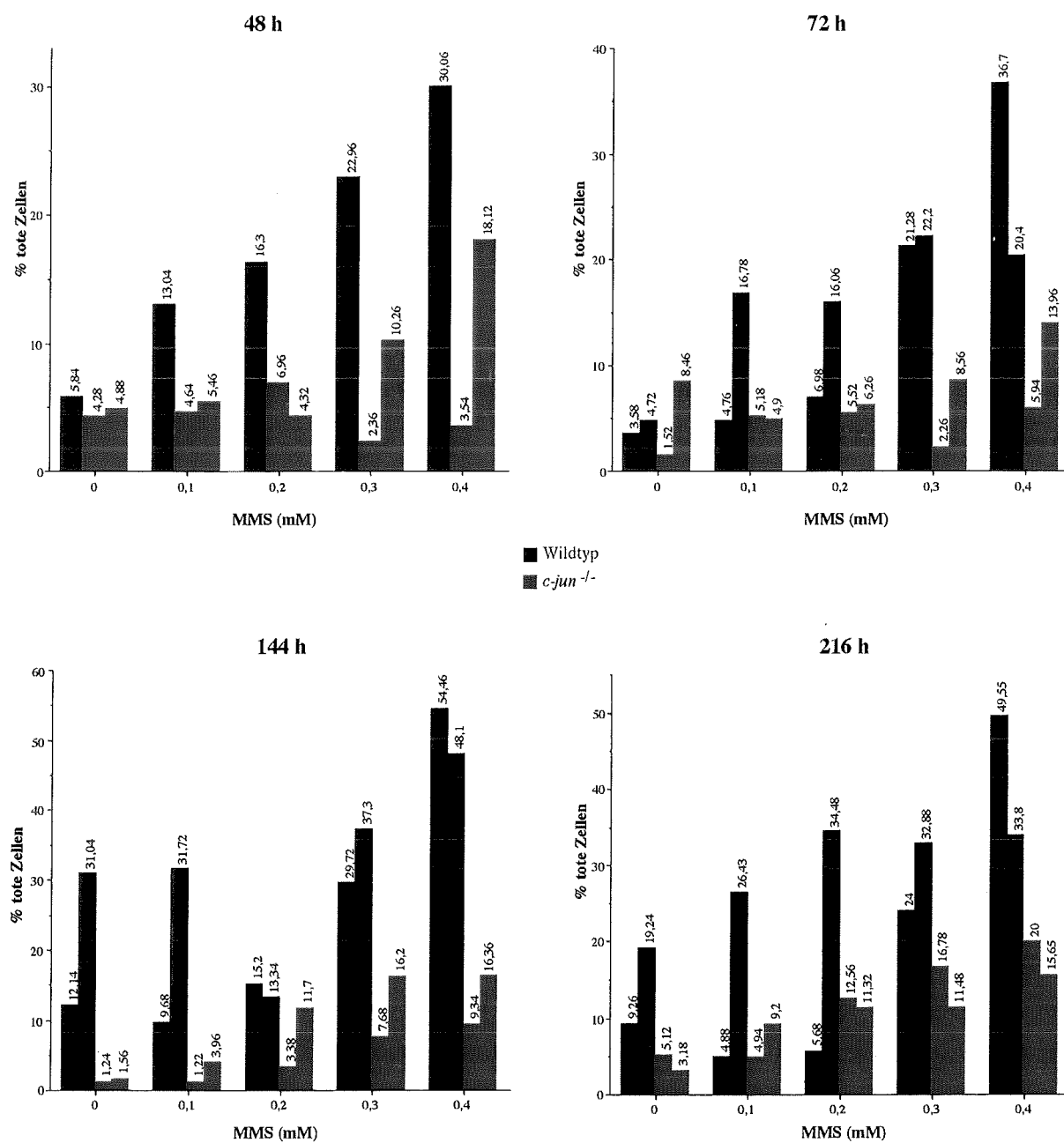


Abb. 23: Apoptoserate in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an MMS behandelt. 48, 72, 144 bzw. 216 Stunden später wurden die Zellen abgelöst, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und die Zellen im FACS-Gerät gemessen. Der prozentuale Anteil der toten Zellen ist gegen die unterschiedlichen MMS-Konzentrationen aufgetragen.

Auch nach 216 Stunden (neun Tagen) zeigten die c-Jun defizienten Zellen eine deutlich reduzierte Apoptose im Vergleich zum Wildtyp (20% und 16% gegenüber 50% und 39%; Abb. 23, 216h). Selbst nach mindestens drei durchlaufenen Zellzyklusphasen der *c-jun*^{-/-} Zellen zeigten diese im Vergleich zum Wildtyp (bei dem drei Zellzyklusphasen bereits nach 72 Stunden durchlaufen waren) weiterhin eine reduzierte Apoptose. Die verringerte Apoptose in c-Jun defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen nach Behandlung mit MMS beruht daher nicht auf dem verlangsamten Durchlaufen des Zellzyklus.

3.2.5. Ist die reduzierte Apoptose in den *c-jun*^{-/-} Zellen abhängig von der Expression von p53?

In Abwesenheit von c-Jun ist die Expression des Tumor Suppressors p53 deutlich erhöht (siehe ersten Teil). p53 ist an der Induktion der Apoptose und des G1-Blocks im Zellzyklus beteiligt (als Übersicht Hansen and Oren, 1997; Levine, 1997; Agarwal et al., 1998). Zellen, die einen p53 induzierten G1-Arrest eingehen, verharren in diesem Stadium und sterben nicht durch Apoptose. Dieser G1-Arrest wird durch die erhöhte Expression des Targetgens von p53, dem Zellzyklusinhibitor p21, hervorgerufen. Zellen, die in Anwesenheit von p21 durch einen Zellzyklusblock nicht in die Apoptose gehen, sterben nach dem Ausschalten von p21 durch Apoptose (Polyak et al., 1996). Das Genprodukt des Wilms-Tumor Gens, WT1, kann p53 stabilisieren und dadurch sowohl die Transrepression als auch die Induktion der p53 abhängigen Apoptose verhindern (Maheswaran et al., 1995). Diese Studien deuten darauf hin, daß die Entscheidung, ob eine Zelle in den Zellzyklusblock geht oder durch Apoptose stirbt, vom Zustand des p53 Proteins abhängt. Daher stellte sich die Frage, ob die verringerte Apoptose in den *c-jun*^{-/-} Zellen im Zusammenhang mit der erhöhten Expression von p53 steht. Um diese Frage zu beantworten, wurden (wie im ersten Teil der Arbeit) Fibroblasten benutzt, denen zusätzlich zu c-Jun auch p53 fehlt. Um die Apoptose im Vergleich zu den beiden anderen Zelltypen zu bestimmen, wurden Wildtyp, *c-jun*^{-/-} wie auch *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen MMS behandelt. 48 Stunden nach Behandlung wurden die Zellen trypsiniert, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und der DNA-Gehalt der Zellen im FACS-Gerät gemessen. In Abbildung 24 sind die apoptotischen Zellen von einer Wildtyp und jeweils zweier *c-jun*^{-/-} sowie *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zelllinien

als % tote Zellen dargestellt. Nach Behandlung mit 0,1 mM MMS starben 13% der Wildtyp, 5% der *c-jun*^{-/-}, sowie 7% der *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen. Erhöhte man die Konzentration auf 0,2 mM MMS, war der Anteil der toten Zellen bei den Wildtyp (16%) sowie den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen (11% und 17%) deutlich größer als der der *c-jun*^{-/-} Zellen (7% und 4%). Dieser Unterschied war auch bei 0,4 mM MMS deutlich sichtbar, wo 30% der Wildtyp Zellen und 28% der *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen apoptotisch waren. Bei den *c-jun*^{-/-} Zellen konnten 18% bzw. 4% tote Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten weisen darauf hin, daß nach Behandlung mit MMS in Abwesenheit von c-Jun die Apoptose verringert ist, diese Reduktion aber durch zusätzliches Ausschalten von p53 wieder aufgehoben wird.

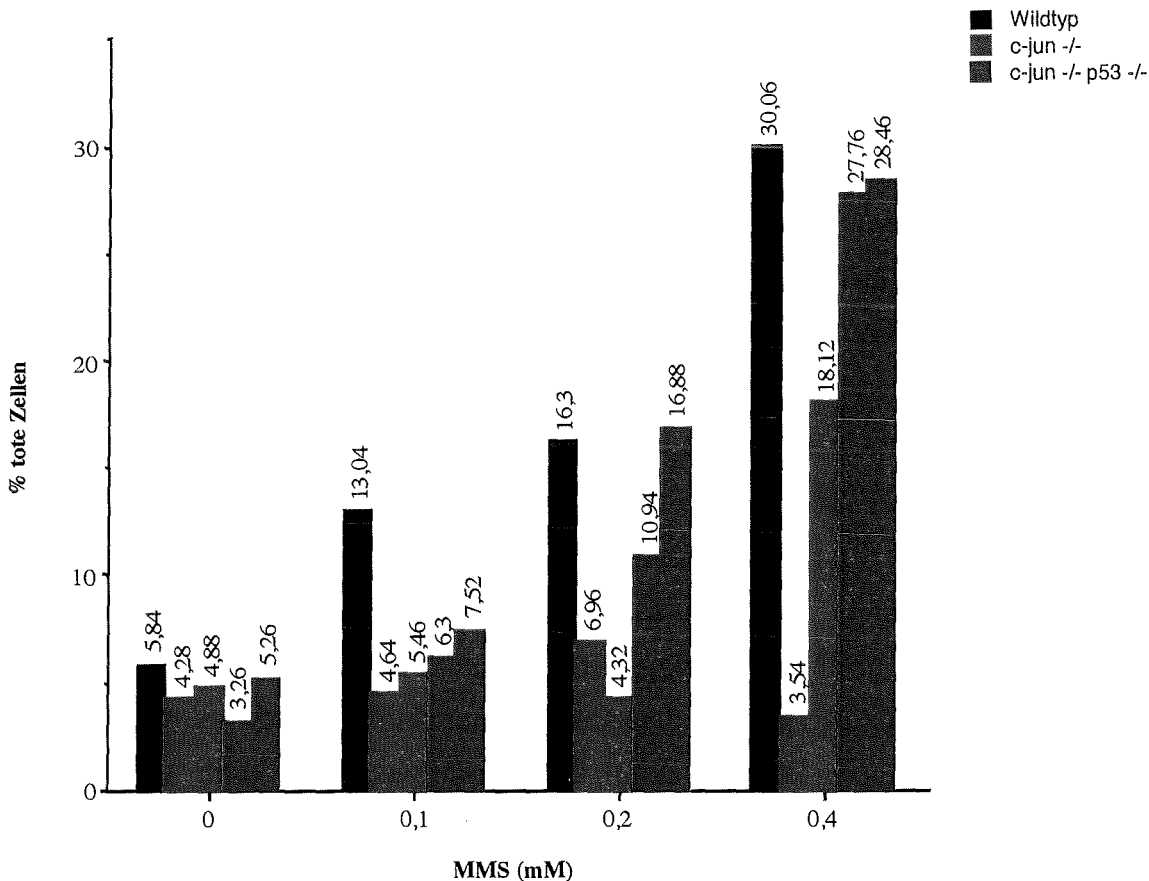


Abb. 24: Graphische Darstellung der Apoptoserate in Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS

Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an MMS behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen abgelöst, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und die Zellen im FACS-Gerät gemessen. Der prozentuale Anteil der toten Zellen ist gegen die unterschiedlichen MMS-Konzentrationen aufgetragen.

3.2.6. In *c-jun*^{-/-} Zellen ist die Aktivität von NF-κB deutlich reduziert

Die c-Jun abhängige verminderte Apoptoserate könnte zum einen darauf beruhen, daß die Expression von solchen c-Jun abhängigen Genen beeinträchtigt ist, die wichtig sind die für die Signalkaskade, die zur Apoptose führt. Andererseits könnte der Verlust von c-Jun zu einer spontanen Aktivierung von Genen führen, deren Genprodukte anti-apoptotisch wirken. Das bekannteste Beispiel von anti-apoptotischer Wirkung ist die Aktivierung von NF-κB (Beg and Baltimore, 1996 Liu et al., 1996 Van Antwerp et al., 1996 Wang et al., 1996) . Der Transkriptionsfaktor NF-κB besteht aus Homo- oder Heterodimeren, die sich aus unterschiedlichen Kombinationen von p65 (RelA), p50, p52 oder Rel (c-Rel) und RelB zusammensetzen. Die Dimer-Komplexe liegen im Zytoplasma vor und werden durch den Inhibitor IκB, dessen häufigster Vertreter IκBα ist, aktiv zurückgehalten. Nach Stimulation der Zellen wird der Inhibitor phosphoryliert und durch einen Ubiquitin-abhängigen Prozeß abgebaut. So kann der nun aktive NF-κB Komplex in den Zellkern gelangen, um dort an die DNA zu binden und die Transkription anzuschalten (Übersicht in Thanos and Maniatis, 1992). Um zu prüfen ob der Verlust von c-Jun eine erhöhte NF-κB Aktivität hervorruft, die der Apoptose entgegenwirkt, wurden Zellen mit dem Phorbolster TPA, einem sehr effizienten Aktivator von NF-κB, behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Anschließend wurde die Bindung von NF-κB an die Erkennungssequenz des HIV-Promotors, die indikativ für die Aktivierung von NF-κB ist (Stein et al., 1989), durch *in vitro* Bindungsstudien (Gelretardationsassay) bestimmt. Extrakte aus Wildtyp Zellen zeigten im unbehandelten Zustand eine leichte Bindung von NF-κB an seine Erkennungssequenz, die nach Behandlung mit TPA deutlich verstärkt wurde und nach 90 Minuten bzw. zwei Stunden eine maximale Bindeaktivität aufwies (Abb. 25A). Mit Hilfe von Antikörpern kann man im Gelretardationsassay durch sogenannte „Supershifts“ (Antikörper-Protein-DNA-Komplex) nachprüfen, welche Proteine in den Protein-DNA-Komplexen enthalten sind. So führte die Inkubation der Zellextrakte mit einem Antikörper gegen die transkriptionell kompetente Untereinheit von NF-κB, p65, zu einem deutlichen „Supershift“, der ein verzögertes Laufverhalten bei der elektrophoretischen Auftrennung aufweist (Abb. 25B). Da der gesamte Protein-DNA-Komplex ein verzögertes Laufverhalten zeigte, bedeutet dies, daß alle Komplexe, die an dieses DNA-Element binden, p65 enthielten. Die Inkubation mit

einem Antikörper gegen p50 führte ebenfalls zu einem „Supershift“, jedoch zeigte dieses mal nur ein Teil der Protein-DNA-Komplexe ein verzögertes Laufverhalten (nicht gezeigt). Sehr wahrscheinlich beinhalten die verbleibenden DNA-Protein-Komplexe ein anderes NF- κ B-Mitglied, wie z.B. c-Rel. Die Hauptkomponente, die zu der Bindungsaktivität von NF- κ B führt, ist somit p65.

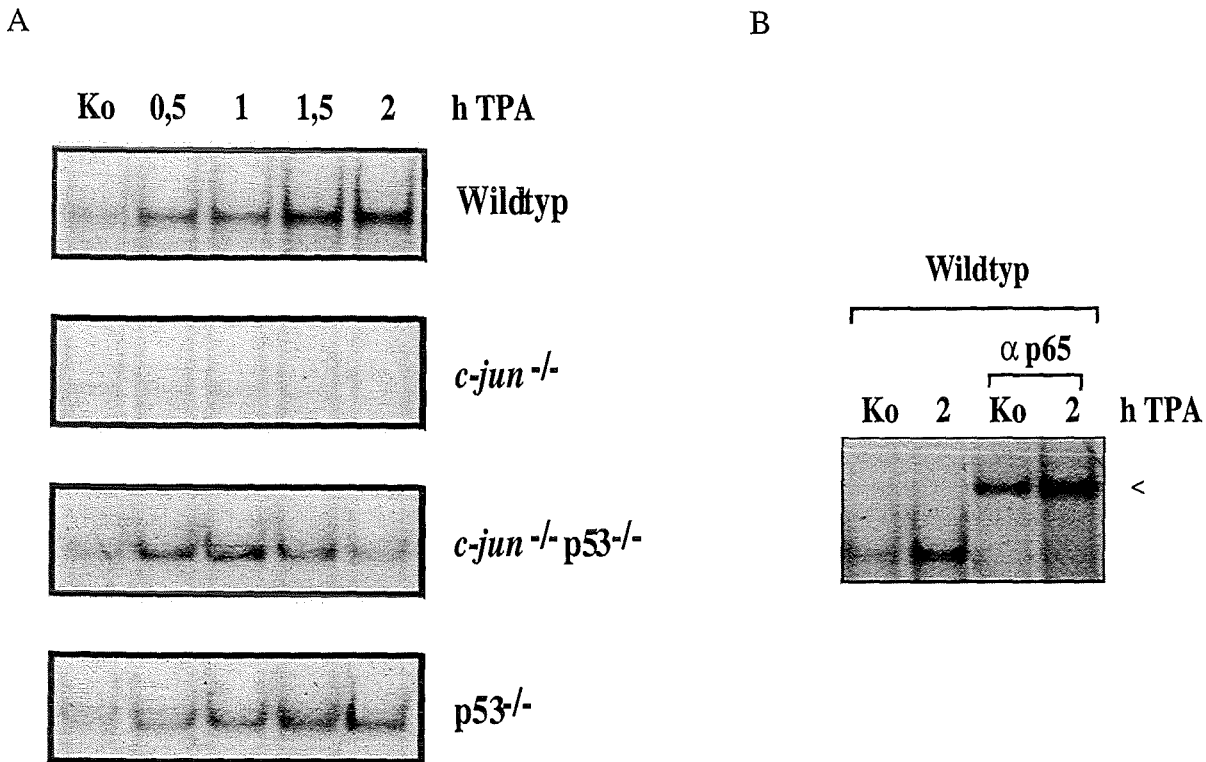


Abb. 25: In *c-jun*^{-/-} Zellen ist die DNA-Bindung von NF- κ B reduziert

A. Wildtyp, *c-jun*^{-/-}, *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} und p53^{-/-} Zellen wurden mit TPA (100 ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Kernextrakte präpariert. Je 5 μ g Proteinextrakt wurde mit 10 fmol radioaktiv markiertem HIV-Oligonukleotid 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde in einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Der NF- κ B-DNA-Komplex ist gezeigt. B. Extrakte von Wildtyp Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit eines Antikörpers gegen die p65 Untereinheit von NF- κ B (α p65), wie in A beschrieben, inkubiert und aufgetrennt. < zeigt den Antikörper-NF- κ B-DNA-Komplex, der ein verlangsamtes elektrophoretisches Laufverhalten vorweist.

Extrakte aus *c-jun*^{-/-} Zellen, zeigten keine Bindeaktivität, auch nicht nach Behandlung mit TPA. Im Gegensatz dazu konnte bei *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen eine Bindung an die DNA festgestellt werden, wobei die Kinetik der Induktion im Vergleich zu Wildtyp Zellen etwas schneller war. In diesen Zellen trat die stärkste Bindung an die DNA bereits nach 60 bzw. 90 Minuten auf, wobei zwei Stunden nach Behandlung mit TPA die Aktivität wieder schwächer wurde (Abb. 25A).

Extrakte von Zellen, bei denen nur p53 fehlt, aber c-Jun vorhanden ist ($p53^{-/-}$) zeigten die gleiche Kinetik wie Wildtyp Zellen (Abb. 25A).

Um nachzuweisen, daß die fehlende NF- κ B Bindeaktivität in c-Jun defizienten Zellen nicht auf eine fehlende Expression von p65 zurückzuführen ist, wurde in Gesamtzell-Proteinextrakte aus Wildtyp, $c-jun^{-/-}$ wie auch $c-jun^{-/-}$ $p53^{-/-}$ Zellen die Proteinmengen von p65 im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 26A).

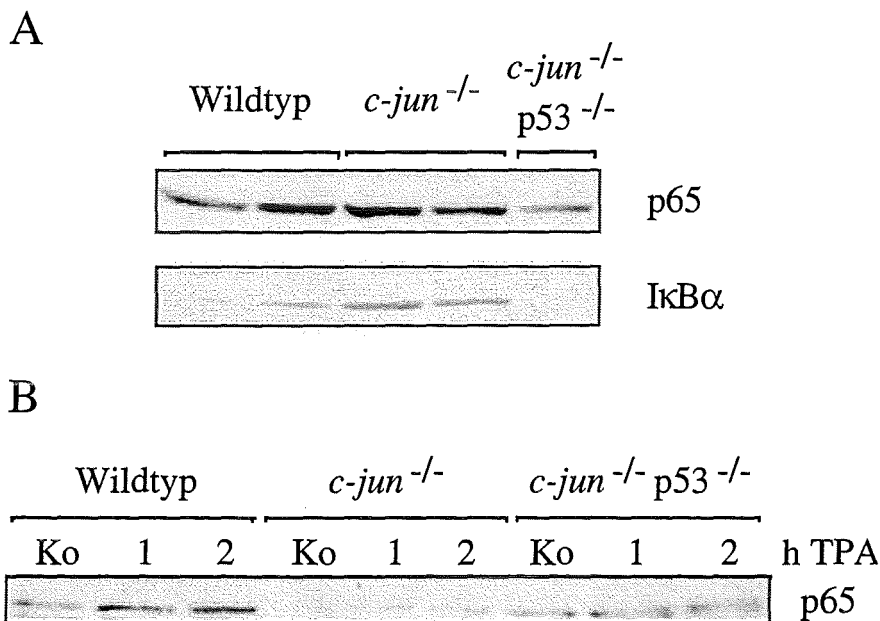


Abb. 26: Erhöhte Mengen an I κ B α in $c-jun^{-/-}$ Zellen verringern Translokation von p65 in den Zellkern

A. Gesamt-Proteinextrakte von Wildtyp, $c-jun^{-/-}$ und $c-jun^{-/-}$ $p53^{-/-}$ Zellen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und die Menge an p65 und I κ B α mittels Western-Blot bestimmt. **B.** Die Lokalisation von p65 im Kern wurde in Kernextrakten der angegebenen Zellen mittels Western-Blot bestimmt.

Die Analyse macht deutlich, daß keine drastischen Unterschiede in der Expression von p65 in den verschiedenen Zelllinien auftritt. Vielmehr waren leicht erhöhte Mengen von p65 in den $c-jun^{-/-}$ Zellen festzustellen. Die Proteinmenge von p65 kann also nicht für die fehlende DNA-Bindung an eine NF- κ B-Bindestelle verantwortlich sein. Allerdings war die Menge an Inhibitor I κ B α in c-Jun defizienten Zellen höher als in Wildtyp oder $c-jun^{-/-}$ $p53^{-/-}$ Zellen. Die erhöhte I κ B α Menge in den $c-jun^{-/-}$ Zellen könnte dazu führen, daß der Transkriptionsfaktor NF- κ B nach Aktivierung sich nicht hinreichend vom Inhibitor I κ B α löst und dadurch im Zytoplasma zurückgehalten wird. Als Indiz für die Translokation von NF- κ B aus dem

Zytoplasma in den Zellkern, wurde der Gehalt von p65 im Zellkern mittels Western-Blot bestimmt. Wie aus Abbildung 26B hervorgeht, ist die Proteinmenge von p65 im Zellkern in Abwesenheit von c-Jun im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Auch nach Behandlung mit TPA sind in den Zellkernen von Wildtyp oder *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen größere Mengen an p65 als in *c-jun*^{-/-} Zellen vorzufinden (Abb. 26B). Die reduzierte Bindeaktivität von NF-κB kann also auf der deutlich verringerten Translokation von NF-κB aus dem Zytoplasma in den Zellkern beruhen. Zusammenfassend machen diese Befunde deutlich, daß das Fehlen von c-Jun nicht zu einer basal erhöhten NF-κB Aktivität führt, die anti-apoptotisch wirken könnte, sondern zu einer erhöhten IκBα Menge die der effizienten Translokation von NF-κB in den Zellkern entgegenwirkt.

3.2.7. Sind Signaltransduktionswege in Abwesenheit von c-Jun noch funktionsfähig?

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, daß die reduzierte Apoptoserate in den *c-jun*^{-/-} Zellen nicht auf eine spontane Erhöhung von NF-κB und die damit verbundene Aktivierung von anti-apoptotischen Genen zurückzuführen ist, wurde nachgeprüft, ob andere Signaltransduktionswege, die an der Apoptose beteiligt sind, in Abwesenheit von c-Jun noch intakt sind. Die Induktion der Apoptose umfaßt verschiedene Kinasen-enthaltende Signaltransduktionswege. So sind auch die Signaltransduktionswege, die p38 und JNK (Jun N-terminale Kinase oder SAPK) aktivieren, an der Apoptose beteiligt (Xia et al., 1995; Verheij et al., 1996; Seimiya et al., 1997; Yang et al., 1997b; Faris et al., 1998; Kasibhatla et al., 1998). Um zu überprüfen, ob diese Signaltransduktionswege in Abwesenheit von c-Jun noch intakt sind, wurde die Aktivierung von den koregulierten Kinasen p38, JNK1 und JNK2 in Zellen, die mit MMS oder UV C behandelt wurden, mittels Western-Blot bestimmt. Dazu wurden Antikörper verwendet, die jeweils nur die phosphorylierten und somit aktiven Formen der jeweiligen Kinasen erkennen. Die Phosphorylierung von p38 war nach Induktion mit MMS oder UV C in Wildtyp wie auch in *c-jun*^{-/-} Zellen ähnlich hoch und in Abwesenheit von c-Jun nicht reduziert (Abb. 27). Sowohl MMS als auch UV führten in *c-jun*^{-/-} und Wildtyp Zellen zu einer Phosphorylierung, also Aktivierung von JNK1 und JNK2. Jedoch war die Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 in den *c-jun*^{-/-} Zellen schwächer als in den Wildtyp Zellen (Abb. 27).

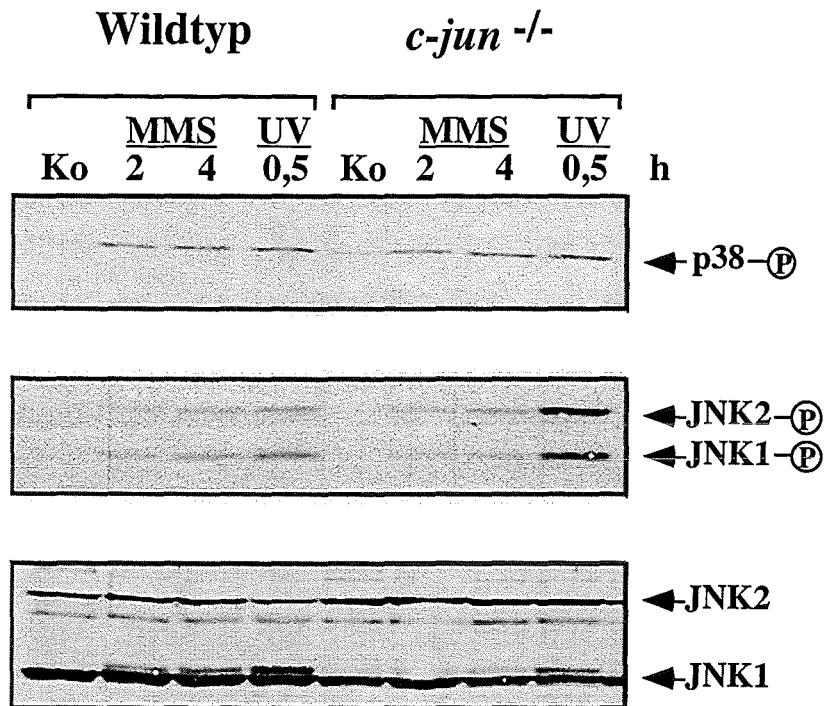


Abb. 27: Die Phosphorylierung von p38 sowie JNK1 und JNK2 wird durch das Fehlen von c-Jun nicht negativ beeinflusst

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit MMS (1 mM, MMS) oder UV C (30 J/m², UV) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proteinextrakte präpariert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Phosphorylierung von p38 bzw. JNK1 und JNK2 (-P) oder die Menge an JNK1 und JNK2 wurde mittels Western-Blot bestimmt.

Um zu überprüfen, ob diese verringerte Phosphorylierung der JNKs auf unterschiedlichen Mengen von JNK-Molekülen basiert, oder reduzierten Phosphorylierungsaktivitäten der JNK-aktivierenden Kinasen beruht, wurde in *c-jun*^{-/-} wie auch Wildtyp Zellen die Mengen an JNK1 und JNK2 im Western-Blot bestimmt. Die Proteinmenge von JNK1 war in Abwesenheit von c-Jun verringert, während die Menge von JNK2 im Vergleich zum Wildtyp unverändert war (Abb. 27). Die schwächere Phosphorylierung der JNKs, besonders JNK1, in den *c-jun*^{-/-} Zellen beruht wahrscheinlich darauf, daß weniger JNK-Moleküle mit der gleichen Effizienz wie in Wildtyp Zellen phosphoryliert wurden. Da in *c-jun*^{-/-} Zellen p38 und die JNK-Moleküle mit der gleichen Effizienz phosphoryliert werden, scheint die Expression und Aktivität von Mitgliedern der Signaltransduktionskaskade die stromaufwärts von p38 und JNK liegen, durch das Fehlen von c-Jun nicht beeinflusst zu sein.

Um die Aktivität der JNKs direkt zu bestimmen wurde *in vitro* die Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem GST-c-Jun (als Substrat) getestet. Als Positivkontrolle für eine effiziente Induktion der JNK-Aktivität wurde UV C verwendet (van Dam, et al., 1995). Mit Hilfe von JNK1-spezifischer Antikörper wurde JNK1 aus den Extrakten durch Immunpräzipitation isoliert. Dieser Immunkomplex wurde mit GST-c-Jun in Anwesenheit von γ -ATP inkubiert und die Produkte durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktive Markierung von GST-c-Jun stellt dabei ein direktes Maß für die Aktivität von JNK1 dar.

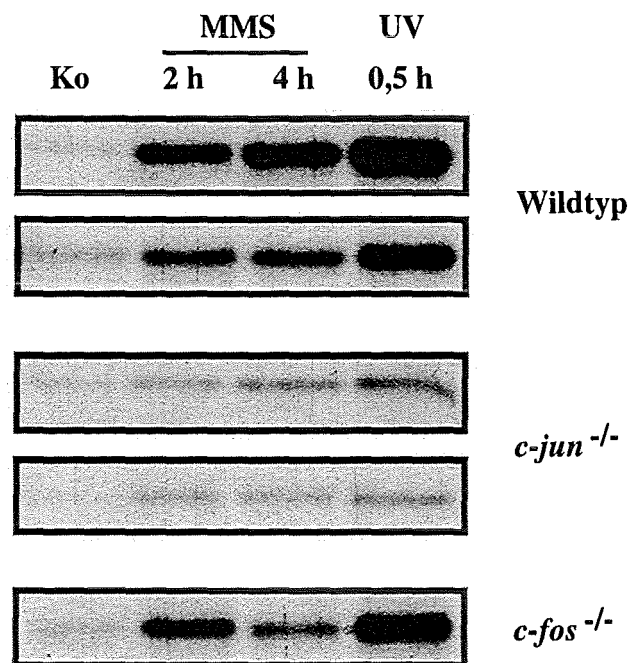


Abb. 28: Die JNK1 Aktivität ist in *c-jun*^{-/-} Zellen reduziert

Jeweils 2 Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zelllinien und eine *c-fos*^{-/-} Zelllinie wurden mit MMS (1 mM, MMS) oder UV C (30 J/m², UV) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte präpariert und daraus JNK1 mittels Immunpräzipitation mit einem JNK1-spezifischen Antikörper isoliert. Die Aktivität von JNK1 wurde durch *in vitro* Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem GST-c-Jun getestet. Die Auftrennung des phosphorylierten GST-c-Jun erfolgte durch SDS-PAGE.

In beiden Wildtyp Zelllinien führte die Behandlung mit MMS zu einer starken Aktivierung von JNK1 (Abb. 28), wobei die Aktivierung durch UV C etwas stärker war. In den *c-jun*^{-/-} Zellen war die Aktivierung der JNK1 im Vergleich zum Wildtyp sowohl nach UV C als auch nach MMS deutlich reduziert (Abb. 28). Als zusätzliche Kontrolle dienten *c-fos*^{-/-} Zellen, die, wie bereits erwähnt, nach UV-Behandlung eine erhöhte Apoptoserate und somit einen intakten Apoptose-Signalweg aufweisen. In

diesen Zellen führte sowohl die Bestrahlung mit UV C als auch die Behandlung mit MMS zu einer ähnlich starken Aktivierung von JNK1 wie in Wildtyp Zellen. Die maximale Aktivierung mit MMS trat bereits nach zwei Stunden auf und nahm nach vier Stunden wieder ab (Abb. 28). Die Untersuchung von JNK2 führte zu einem ähnlichen Bild wie die von JNK1; die Aktivität von JNK2 war in *c-jun*^{-/-} Zellen etwas geringer als in Wildtyp Zellen (nicht gezeigt), obwohl in der Expression von JNK2 keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen zu verzeichnen war. Im Vergleich zu der Aktivität von JNK1 war die Aktivität von JNK2, unabhängig vom Genotyp der Zellen, aber deutlich geringer. Dies deutet darauf hin, daß in diesen Zellen JNK1 den Hauptbeitrag zur JNK Aktivität leistet (nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß die verminderte Expression von JNK1 sich auch in der verringerten Aktivität der Kinase widerspiegelt.

In einem der oben dargestellten Experimente konnte ich nachweisen, daß das zusätzliche Ausschalten von p53 die reduzierte Apoptose in den *c-jun*^{-/-} Zellen wieder umkehren kann. Deshalb stellte sich die Frage, ob dies auch für die Aktivität der JNKs zutrifft. Um dies zu überprüfen, wurde die Aktivität der JNKs (JNK1 und JNK2) in Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS bestimmt.

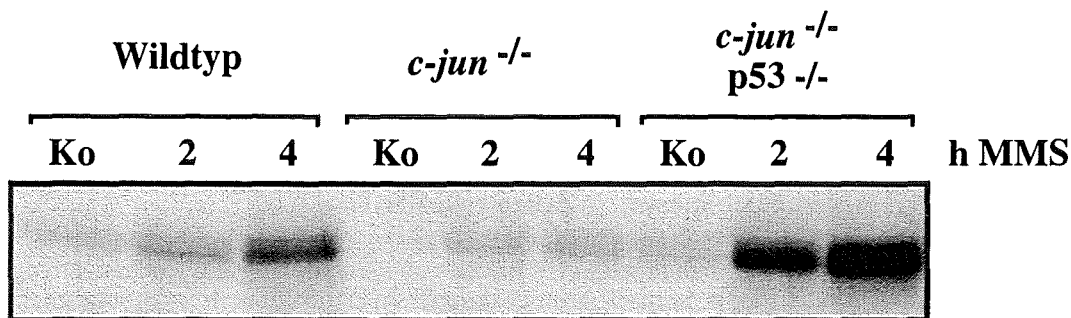


Abb. 29: Die Aktivität der JNKs ist in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wieder verstärkt

Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wurden mit MMS (MMS, 1 mM) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte präpariert und daraus JNK1 und JNK2 mittels Immunpräzipitation mit JNK1- und JNK2-spezifischer Antikörper isoliert. Die Aktivität der JNKs wurde durch *in vitro* Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem GST-c-Jun getestet. Die Auftrennung des phosphorylierten GST-c-Jun erfolgte durch SDS-PAGE.

Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, ist die JNK Aktivität (JNK1 und JNK2) in Zellen, in denen c-Jun fehlt, im Vergleich zum Wildtyp sowohl basal als auch nach

Behandlung mit MMS deutlich vermindert, in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen ist die Aktivität der JNKs jedoch wieder so stark wie in Wildtyp Zellen. Western-Blots zeigten, daß die Menge an JNK Proteinen in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wieder so hoch wie in Wildtyp Zellen war (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, daß durch die zusätzliche Inaktivierung von p53 in den *c-jun*^{-/-} Zellen die Aktivität der JNKs, vermutlich über verstärkte Expression, wieder hergestellt werden kann.

3.2.8. Die Aktivierung von AP-1 abhängigen Genen in Abwesenheit von c-Jun und p53

c-jun^{-/-} p53^{-/-} Zellen zeigen im Gegensatz zu den *c-jun*^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS eine erhöhte Apoptoserate. Darüber hinaus ist die Aktivität der JNKs in diesen Zellen wieder so stark wie die der Wildtyp Zellen. Es wäre möglich, daß in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen Effekte auftreten, die den Verlust von c-Jun kompensieren und über die effiziente Aktivität der JNKs wieder volle Induzierbarkeit von AP-1 abhängigen Genen hergestellt ist. Um dies festzustellen, wurde zunächst die DNA-Bindeaktivität von AP-1 mittels *in vitro* Bindungsstudien gemessen. Dazu wurden Zellen mit einem Aktivator von AP-1, dem Phorbolster TPA behandelt und eine bzw. zwei Stunden später Kernextrakte präpariert. Mit Hilfe der TRE-Sequenz der Kollagenase (mKoll) wurde die Bindeaktivität von AP-1 in *c-jun*^{-/-}, *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} und Wildtyp Zellen bestimmt. Bereits im unbehandelten Zustand wiesen die Zellen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, wodurch bereits eine erhöhte Expression der AP-1 Mitglieder vorlag, eine basale AP-1 Aktivität auf (Abb. 30A). Nach Behandlung mit TPA war in Wildtyp Zellen die basale Bindeaktivität nach einer Stunde leicht erhöht und nach zwei Stunden deutlich verstärkt. Extrakte aus c-Jun defizienten Zellen zeigten erwartungsgemäß im unbehandelten Zustand eine deutlich schwächere Bindung von AP-1 an die DNA als Extrakte aus Wildtyp Zellen. Nach Behandlung mit TPA war eine leichte Zunahme der Bindeaktivität festzustellen, die aber im Vergleich zum Wildtyp immer noch viel geringer war (Abb. 30A). Die Bindeaktivität in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen war sowohl basal als auch nach Behandlung mit TPA im Vergleich zu Zellen, denen nur c-Jun fehlt, deutlich verstärkt. Allerdings war die basale Aktivität in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen schwächer als in Wildtyp Zellen, jedoch führte die Behandlung mit TPA zu einer ähnlich starken Bindeaktivität (Abb. 30A).

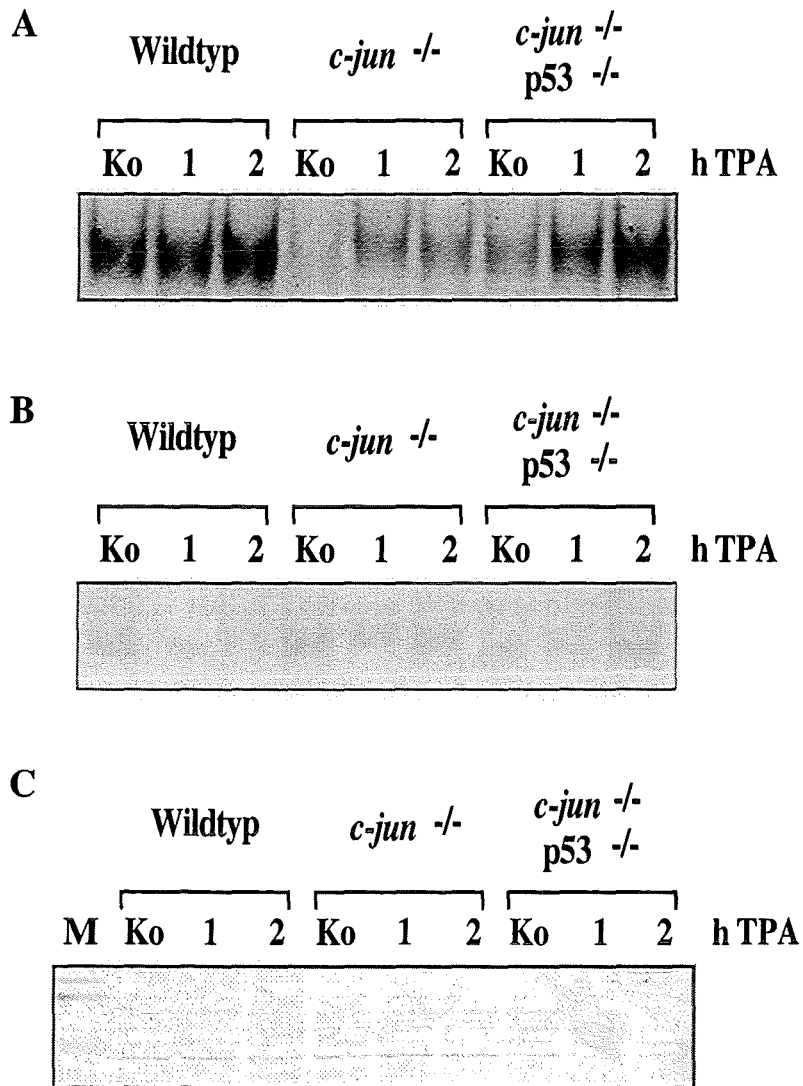


Abb. 30: In *c-jun* ^{-/-} Zellen ist die Bindeaktivität von AP-1 reduziert

Wildtyp, *c-jun* ^{-/-} und *c-jun* ^{-/-} *p53* ^{-/-} Zellen wurden mit TPA (100 ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Kernextrakte präpariert. **A.** Je 2 µg Proteinextrakt wurde mit 10 fmol radioaktiv markiertem mKoll-Oligonukleotid 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde in einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Der AP-1-DNA-Komplex ist gezeigt. **B.** Zur Qualitätskontrolle der verwendeten Proteinextrakte wurde parallel eine Gelretardations-Analyse mit einem SP-1 Oligonukleotid durchgeführt. **C.** Die in A. eingesetzten Proteinmengen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert. M: Molekulargewichtsmarker.

Die Bindung an das TRE in *c-Jun* defizienten Zellen muß somit von einem anderen Mitglied der Jun-Familie übernommen worden sein. Als Kontrolle für gleiche Proteinmengen, die in den Gelretardationsexperimenten eingesetzt wurden, wurde die Bindung an den konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktor SP-1 ebenfalls durch Gelretardation überprüft. Die Bindung der einzelnen Zellextrakte der verschiedenen Zelllinien zeigten eine fast gleichmäßige Bindeaktivität, nur in Wildtyp Zellen schienen die beiden TPA-Werte etwas schwächer zu sein (Abb. 30B). Als zusätzliche Kontrolle zum Nachweis gleicher Menge an eingesetztem Protein wurde die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Auch hier bestätigte sich, daß gleiche Proteinmengen von unterschiedlichen Extrakten der verschiedenen Zellen verwendet wurden (Abb. 30C).

Um die Untereinheiten der Jun-Familie, die an das TRE binden zu identifizieren, wurden in einem Gelretardationsexperiment Antikörper eingesetzt, die die Mitglieder der Jun-Familie *c-Jun*, *JunD* oder *JunB* erkennen. Die Inkubation mit einem Prä-Immunsereum (PIS) diente als Kontrolle für unspezifische Bindung von Serumkomponenten an Proteine oder DNA. In Wildtyp Zellen waren im AP-1 Komplex sowohl *c-Jun* als auch *JunD* und *JunB* enthalten (Abb. 31). Nach Behandlung mit TPA nahm der Anteil an *c-Jun* und *JunB* deutlich zu, was durch größere Mengen eines langsamer migrierenden Komplexes zu erkennen ist (intensiveren „Supershift“). Zellen, denen *c-Jun* fehlt, enthielten wie erwartet nur *JunD* und *JunB* als Komponenten im AP-1 Komplex. Nach Behandlung mit TPA war ausschließlich *JunB* für eine Bindung an die DNA verantwortlich, da fast der gesamte Protein-DNA-Komplex durch Inkubation mit dem Antikörper langsamer migrierte (fast vollständiger „Supershift“; Abb. 31). Extrakte aus *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-} Zellen zeigten nach Behandlung mit TPA eine stärkere Bindung von AP-1 an die DNA als Extrakte von *c-Jun* defizienten Zellen. Die Bindeaktivität der *c-jun*^{-/-} *p53*^{-/-} Zellen war ähnlich stark wie die Bindeaktivität des Wildtyps. In den AP-1 Komplexen waren sowohl *JunD* als auch *JunB* enthalten; nach Behandlung mit TPA war der Anteil von *JunB* etwas erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Bindung von AP-1 an das TRE in *c-jun*^{-/-} Zellen hauptsächlich durch *JunB* zustande kommt. In Zellen ohne *c-Jun* und *p53* binden zusätzlich zu *JunB* und *JunD* eventuell noch weitere, hier nicht näher identifizierte Proteine, da mit den eingesetzten Antikörpern der AP-1 Komplex nicht vollständig zu einem langsamer migrierenden Komplex gebracht werden konnte.

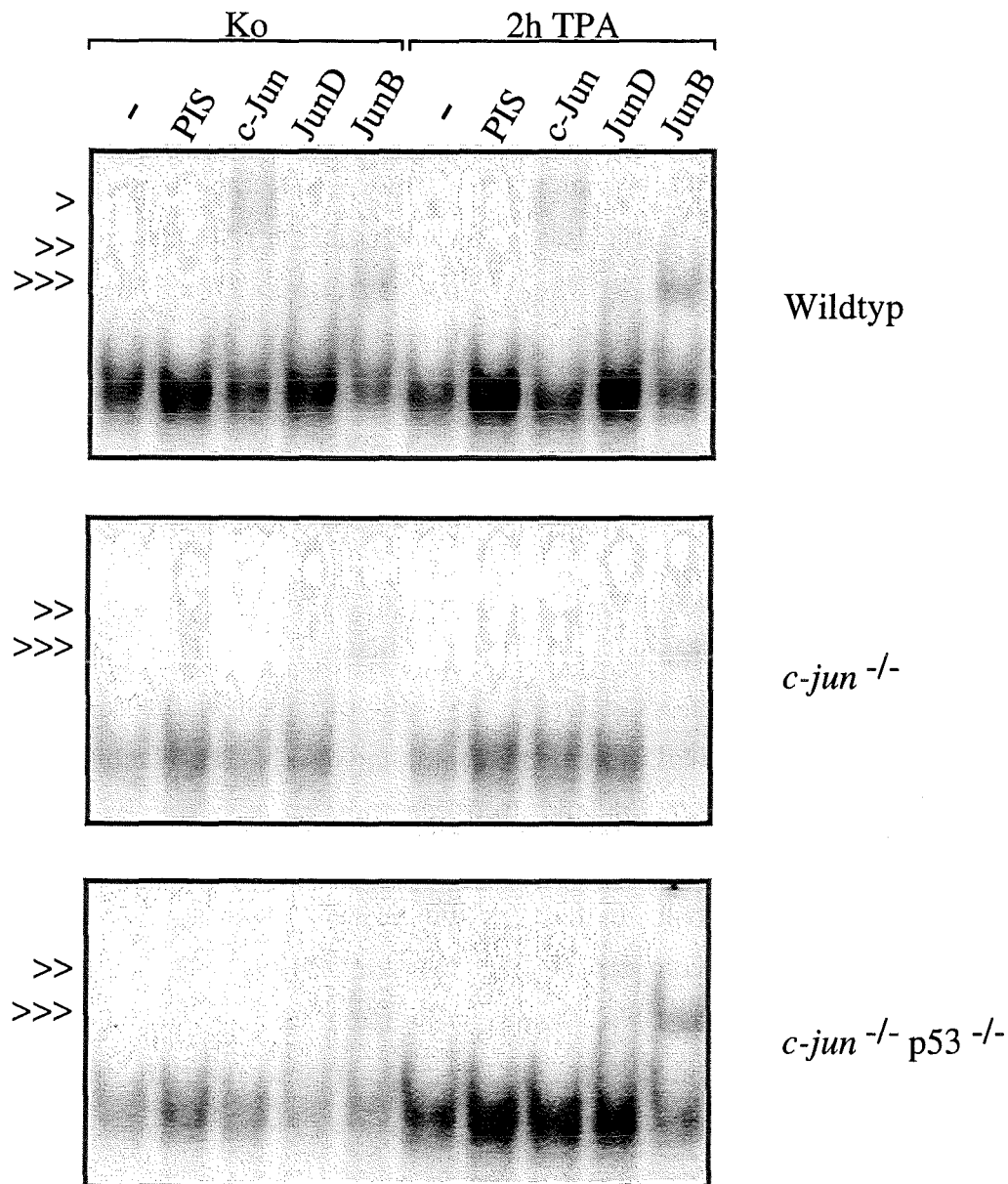


Abb. 31: In Abwesenheit von c-Jun sind JunB und JunD im AP-1 Komplex enthalten

Wildtyp, *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wurden mit TPA (100 ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Nach zwei Stunden wurden Kernextrakte präpariert. Je 2 µg Proteinextrakt wurden mit Prä-Immunsereum (PIS) bzw. Antikörper gegen c-Jun, JunD oder JunB inkubiert oder blieben unbehandelt (-). Danach wurden die so inkubierten Extrakte mit 10 fmol radioaktiv markiertem mKoll-Oligonukleotid 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde in einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Der AP-1-DNA-Komplex und die jeweiligen Antikörper-AP-1-DNA-Komplexe ("Supershifts") sind gezeigt. Die Position der "Supershifts" sind jeweils angezeigt (> zeigt den "Supershift" für c-Jun, >> den für JunD und >>> den für JunB).

Um festzustellen, ob sich die verstärkte AP-1 Bindung in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen auch in einer verstärkten Expression von AP-1 abhängigen Genen manifestiert, wurden die verschiedenen Zellen mit TPA behandelt und die Gen-Expression durch Northern-Blot bestimmt. Wie in Abbildung 32 dargestellt war die Expression von *c-jun* und der Kollagenase in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp reduziert, aber, wenn auch schwächer, induzierbar. Die Kompensation von JunB oder JunD im AP-1 Komplex der *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen führt zwar zu einer verstärkten Bindung von AP-1 an die DNA, aber nur zu einer schwachen transkriptionellen Aktivität dieses Komplexes. Die Expression von *c-fos* war in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} und vor allem in den *c-jun*^{-/-} Zellen sogar etwas stärker als in Wildtyp Zellen (Abb. 32), was mit der postulierten negativen Autoregulation des *c-fos* Promotors durch c-Jun/c-Fos Proteine übereinstimmt (König et al., 1989; Schönthal et al., 1989).

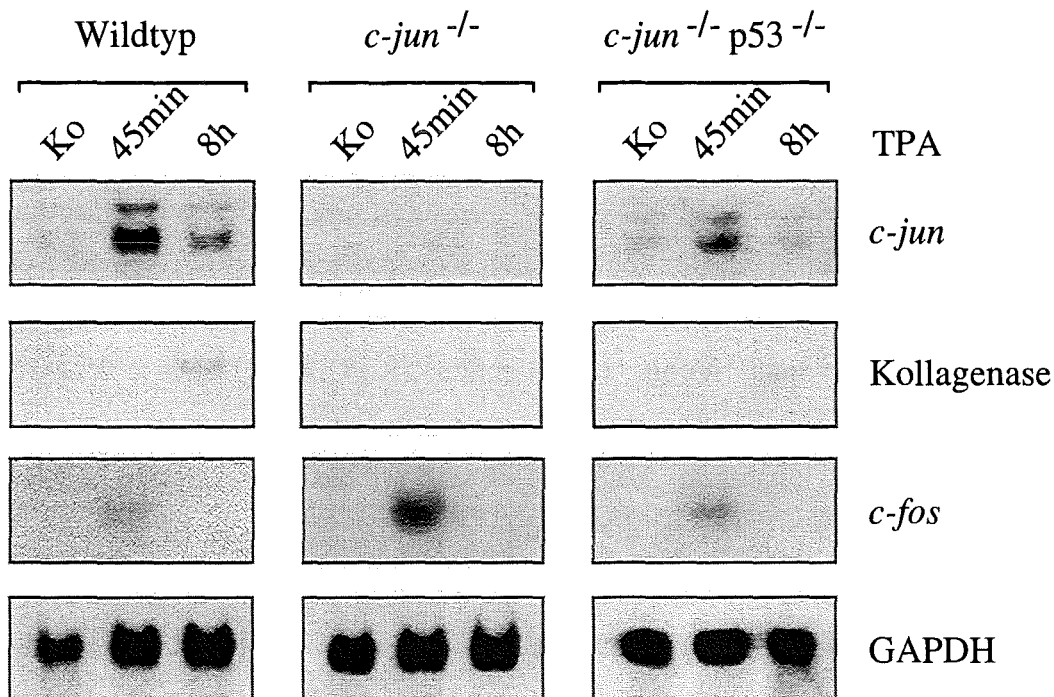


Abb. 32: Die Expression AP-1 abhängiger Gene ist in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen reduziert

Wildtyp *c-jun*^{-/-} und *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wurden mit TPA (100 ng/ml) behandelt (TPA) oder blieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Menge der angezeigten Transkripte mittels Northern-Blot gemessen. Zur Kontrolle für die Qualität und Quantität der RNA wurde mit GAPDH als interner Standard hybridisiert.

3.2.9. Die Expression der CD95 Rezeptors ist in *c-jun*^{-/-} Zellen ähnlich wie in Wildtyp Zellen

Ein gut beschriebener Signalweg, der zum Auslösen der Apoptose führt, ist der des CD95 Rezeptors (auch als APO-1 oder Fas bezeichnet). Durch die Bindung des CD95 Liganden an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung der im CD95 Signalweg beteiligten Komponenten und zu den Prozessen, die als Apoptose bezeichnet werden. Ein interessanter Aspekt dabei ist, daß die Expression des CD95 Liganden in T-Lymphocyten abhängig von der Expression von AP-1 und NF- κ B ist (Kasibhatla et al., 1998). Dabei ist nicht klar, ob das auch für Fibroblasten zutrifft. Andererseits konnte ich feststellen, daß die Expression des Liganden nach Behandlung mit MMS verstärkt wird und die Überexpression des Liganden in Fibroblasten zu einer verstärkten Apoptose führt (Abb. 34 und nicht gezeigt). Deshalb erschien es wichtig, die Expression des Rezeptors zu untersuchen. Dazu wurden Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen mit einem CD95 Rezeptor-spezifischen Antikörper (Jo2) inkubiert. Die Bindung des Antikörpers, wurde durch einen zweiten FITC-gekoppelten Antikörper, der an Jo2 bindet, mittels Messung im FACS-Gerät nachgewiesen. Als Positiv-kontrolle dienten lymphoide Zellen, die mit einem Expressionsvektor für den CD95 Rezeptor transfiziert waren (LF+, Rouvier et al., 1993). Abbildung 33 zeigt das FACS-Profil von nicht mit Antikörper gefärbten Zellen (Ko, schwarz) und das Profil der spezifischen Rezeptorfärbung (CD 95 R, weiß). Die Expression des CD95 Rezeptors ist in der Überlagerung durch eine Verschiebung des weißen Histogramms nach rechts zu erkennen (Ko/CD95R). Diese Verschiebung beruht auf der erhöhten Fluoreszenz, die durch die Bindung des FITC-gekoppelten Antikörpers an Jo2 zustande kommt; je stärker das Histogramm nach rechts verschoben wird, desto höher ist die Menge des Rezeptors. Die LF+ Zellen zeigten eine starke Expression des Rezeptors. In den Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Fibroblasten war die Expression des Rezeptors geringer als in den CD95 überexprimierenden lymphoiden (LF+) Zellen (Abb. 33). Die hier gemessene Expression des Rezeptors in Wildtyp und *c-Jun* defizienten Zellen ist vergleichbar mit der Expression des Rezeptors in anderen Fibroblasten (Hueber et al., 1997). Die Abwesenheit von *c-Jun* hat daher keinen Einfluß auf die Expression des CD95 Rezeptors.

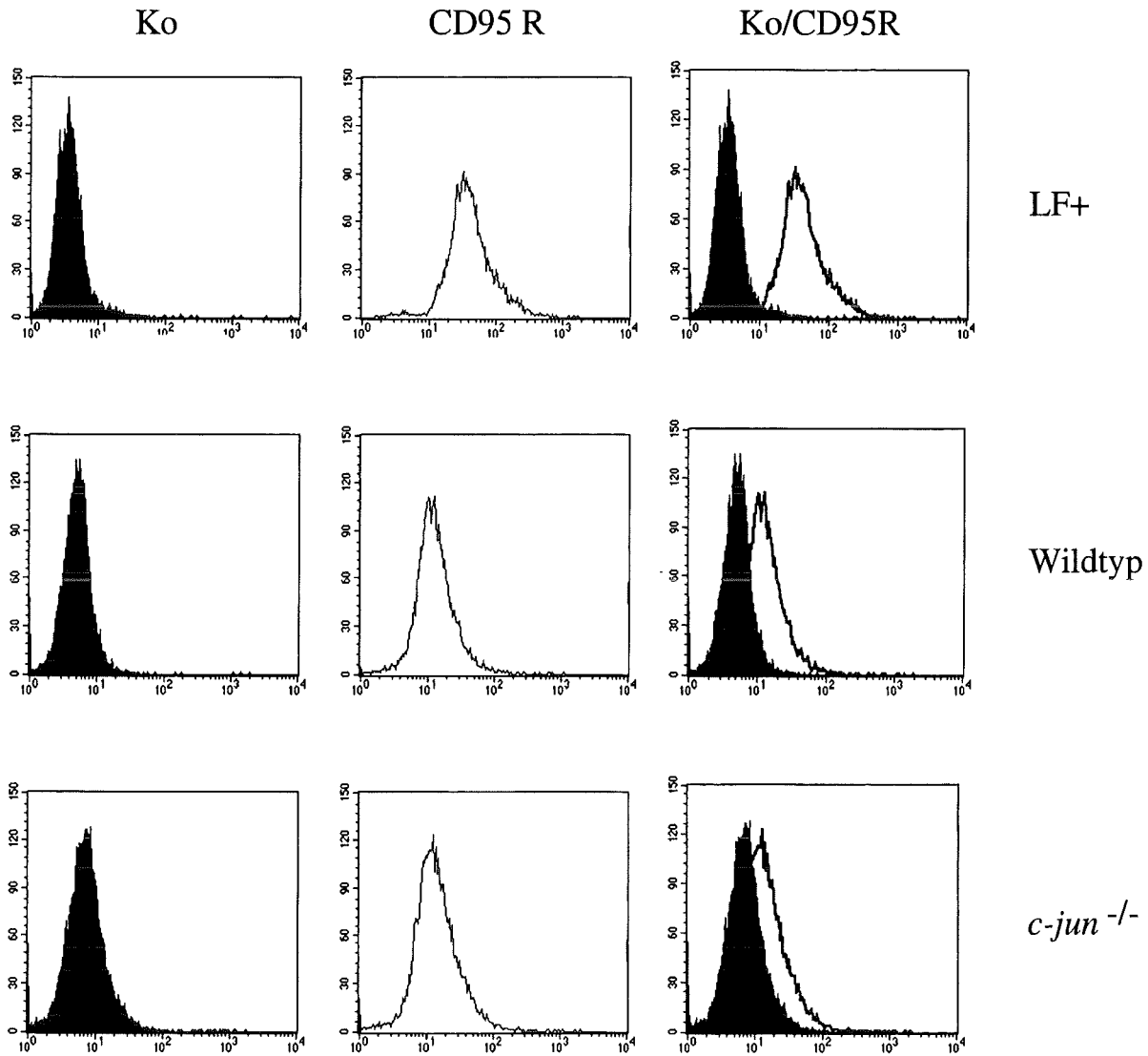


Abb. 33: Die Expression des CD95 Rezeptors ist durch das Fehlen von c-Jun nicht beeinflusst

Lymphoide Zellen, die den CD95 Rezeptor überexprimieren (LF+), sowie Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit Hamster-Serum (Ko) oder einem CD95 Rezeptor-spezifischen Antikörper (Jo2; CD95 R) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem zweiten FITC-gekoppelten Antikörper, der an Jo2 bindet, inkubiert. Danach wurden die Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die Intensität des FITC-Signals, das ein direktes Maß für die Bindung des Antikörpers und Rezeptor-Menge ist, wurde gegen die Zellzahl aufgetragen. Die schwarzen Histogramme zeigen die unspezifische Bindung (Ko), die weißen Histogramme die CD95 Rezeptor-spezifische Färbung (CD95 R). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Histogramme (Ko/CD95R).

Der CD95 Rezeptor wird normalerweise durch die Bindung seines Liganden aktiviert. Deswegen wurde anschließend die Expression des CD95 Liganden untersucht. Da die Zellen durch Behandlung mit MMS in die Apoptose gehen, wurde anhand einer RT-PCR Analyse nachgeprüft, ob MMS die Expression des CD95 Liganden induziert. Dazu wurde RNA von Wildtyp Zellen, die mit MMS behandelt wurden, in cDNA revers transkribiert und anschließend im Rahmen einer PCR mit CD95 Ligand-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Der Nachweis des entstandenen Produktes erfolgte im Southern-Blot. Als Positivkontrolle diente RNA aus Hoden und Milz, Gewebe die hohe Mengen CD95 Ligand exprimieren (Nagata, 1997). Wie aus Abbildung 34 ersichtlich, wurde das Transkript des CD95 Liganden sechs Stunden nach Behandlung der Zellen mit MMS verstärkt exprimiert. Diese Daten zeigen, daß in Fibroblasten, die Behandlung mit MMS zu einer verstärkten Expression des CD95 Liganden führt. Somit könnte eine erhöhte Anzahl von Ligand-Molekülen an ihre Rezeptoren binden, und dadurch die Apoptose auslösen. Als nächstes gilt zu klären, ob die Expression des Liganden in Fibroblasten c-Jun-abhängig ist.

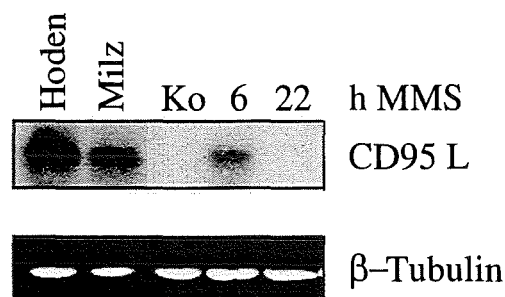


Abb. 34: Der CD95 Ligand wird nach Behandlung mit MMS verstärkt exprimiert

Wildtyp Zellen wurden mit MMS (0,4 mM) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert. Als Kontrolle wurde Gesamt-RNA von Hoden und Milz präpariert. Die RNA wurde in cDNA revers transkribiert und mit CD95 Ligand spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Produkte der PCR wurden mittels Southern-Blot nachgewiesen. Die Expositionszeit der PCR-Produkte von Hoden und Milz beträgt ein fünftel der Expositionszeit für die Produkte von den Fibroblasten. Als Kontrolle für die gleiche Menge an eingesetzter cDNA wurde PCR mit β -Tubulin durchgeführt.

3.2.10. Die Behandlung der Zellen mit MMS führt zu einem Block im Zellzyklus

c-Jun defiziente Zellen gehen nach Behandlung mit MMS nur mit verringerter Effizienz in Apoptose. Im Gegensatz zu den *c-fos*^{-/-} Zellen kann also die Hypersensitivität nicht durch erhöhte Apoptose erklärt werden. Es bleibt daher die

auf den ersten Blick auftretende Diskrepanz zur reduzierten Kolonienzahl nach Behandlung mit MMS im Toxizitäts-Test zu klären. Charakteristisch für Zellen, die mit DNA-schädigenden Agenzien behandelt wurden ist das Auftreten eines G1-Blocks, was den Zellen erlaubt, die DNA-Schäden zu reparieren, bevor es in der nachfolgenden S-Phase zur DNA-Replikation kommt (Hartwell and Kastan, 1994). Dieser G1-Block wird durch die Induktion von p53 und seinem Zielgen, dem Zellzyklusinhibitor p21 ausgelöst. Um zu überprüfen, ob Fibroblasten nach Behandlung mit MMS ebenfalls in der G1-Phase arretiert werden, wurden Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen ausplattiert, mit MMS behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten deren Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt. Das Zellzyklusprofil wurde nach Anfärben der DNA mit Propidiumjodid im FACS-Gerät gemessen. Im Gegensatz zur Messung der Apoptose wird der Gehalt der DNA beim Zellzyklusprofil linear gemessen und dargestellt. Unbehandelte Wildtyp Zellen zeigten nach 48 oder 72 Stunden eine normale Zellzyklusverteilung (Abb. 35). Nach 144 Stunden (6 Tagen) waren die Zellen aufgrund der hohen Zelldichte, die zur Kontaktinhibition führt, in der G0/G1-Phase arretiert. *c-jun*^{-/-} Zellen zeigten eine ähnlichen Verteilung der Zellen im Zellzyklus, wobei der Anteil der Zellen in der G1-Phase nach 48 und 72 Stunden höher war als bei dem vergleichbaren Wildtyp (siehe auch ersten Teil der Arbeit). Nach 144 Stunden (6 Tagen) war in den *c-jun*^{-/-} Zellen eine Synchronisierung durch Kontaktinhibition aufgetreten (Abb. 35). Durch Behandlung der Zellen mit MMS (0,2 mM) kam es bereits nach 48 Stunden zu einer Verschiebung des Zellzyklus in die S- und G2-Phase, so daß sich mehr Zellen in der G2- als in der G1-Phase befanden (Abb. 35). Sowohl Wildtyp als auch *c-jun*^{-/-} Zellen zeigten diese Verschiebung, die auch noch 72 Stunden nach Behandlung sichtbar war. Dies bedeutet, daß die Zellen in der G2-Phase arretiert werden; es kommt zu einem G2-Block. Bei Wildtyp Zellen war dieser Block jedoch transient: nach 144 Stunden (6 Tagen) war wieder eine normale Verteilung des Zellzyklusprofils vorzufinden (Abb. 35). Im Gegensatz dazu zeigten *c-Jun* defiziente Zellen 144 Stunden (6 Tage) nach Behandlung mit MMS immer noch einen Block in der G2-Phase, was ein Hinweis dafür ist, daß diese Zellen den Block nicht aufheben können (Abb. 35). Selbst 216 Stunden (9 Tage) nach Behandlung mit MMS war das normale Zellzyklusprofil in den *c-jun*^{-/-} Zellen nicht wieder hergestellt (nicht gezeigt).

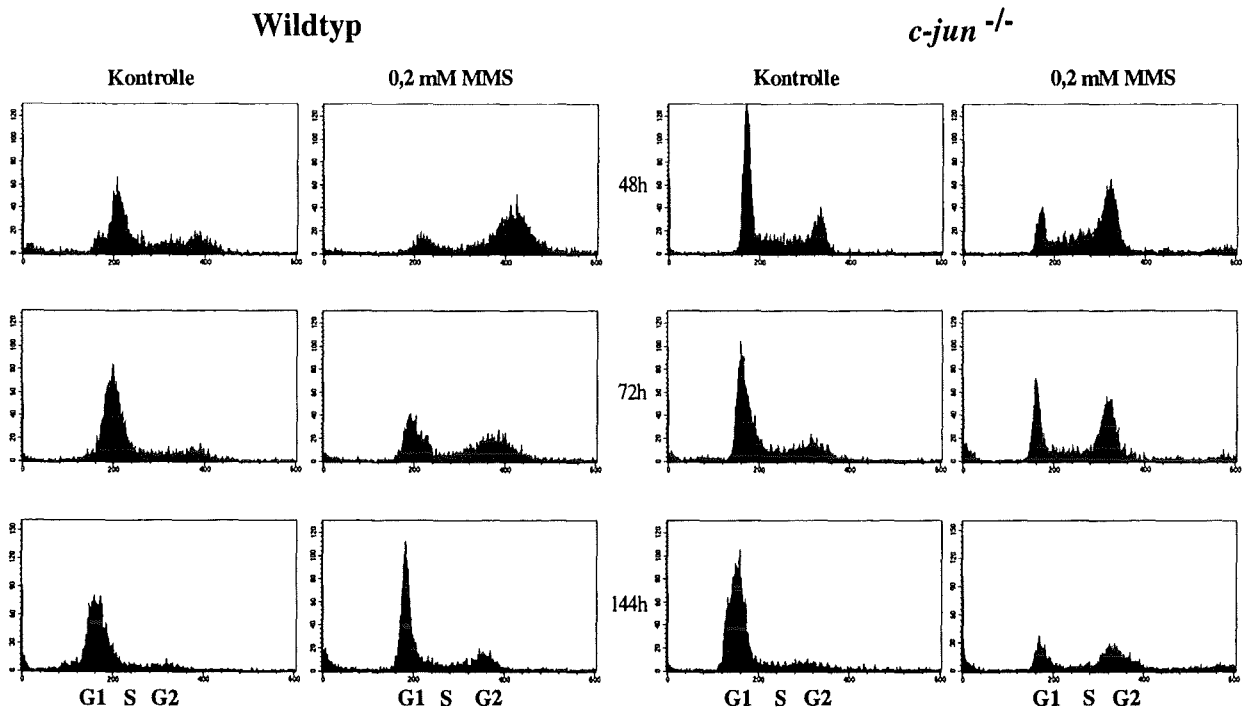


Abb. 35: Die Behandlung mit MMS führt zu einer Arretierung der Zellen in der G2-Phase
 Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit MMS (0,2 mM) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen abgelöst (das MMS blieb bis zum Zeitpunkt des Trypsinierens im Medium), die DNA mit Propidiumjodid gefärbt und die Zellen im FACS gemessen. Die Anzahl der Zellen ist gegen deren DNA-Gehalt aufgetragen. G1, S und G2 zeigen den DNA-Gehalt von Zellen an, die sich in der G1-, S- oder G2-Phase des Zellzyklus befinden.

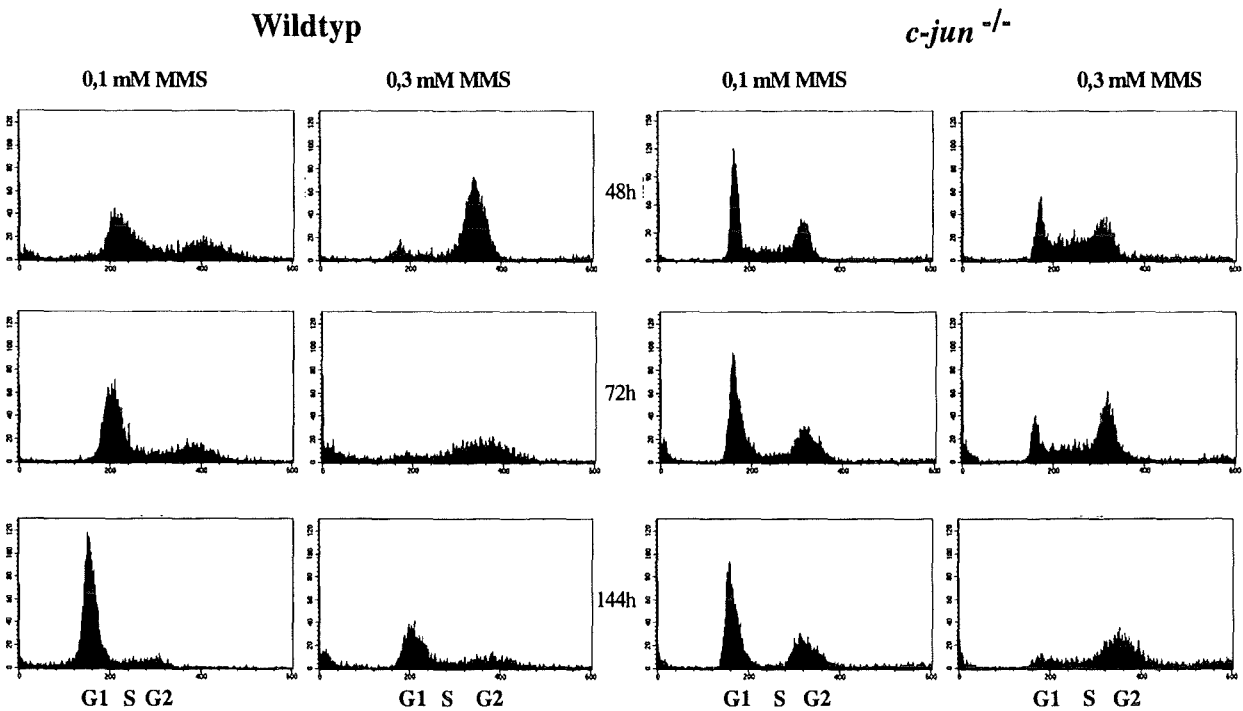


Abb. 36: Die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an MMS führt zu einer Arretierung der Zellen in der G2-Phase
 Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit MMS (0,1 mM und 0,3 mM) behandelt und wie in Abb. 35 weiter verarbeitet. Unbehandelte Zellen sind in Abb. 36 (Kontrolle) zu sehen.

In Abbildung 36 sind die Zellzyklusprofile beider Zelltypen nach Behandlung mit 0,1 bzw. 0,3 mM MMS gezeigt. Die Behandlung der Zellen mit 0,1 mM MMS führte bei den Wildtyp Zellen nicht zu einer Verschiebung des Zellzyklusprofils. In den *c-jun*^{-/-} Zellen bewirkte die Behandlung mit 0,1 mM MMS eine leichte Verschiebung nach G2, wobei diese Verschiebung nach 72 und selbst nach 144 Stunden noch zu beobachten war. Bereits bei der niedrigen Konzentration von 0,1 mM MMS traten die *c-jun*^{-/-} Zellen in einen G2-Zellzyklusblock, der nicht aufgehoben werden konnte. Bei einer Konzentration von 0,3 mM MMS war dieses Verhalten noch ausgeprägter: die Verschiebung nach G2 war bei beiden Zelltypen schon 48 Stunden nach Behandlung mit MMS zu sehen. Die Wildtyp Zellen erlangten jedoch im Gegensatz zu den *c-jun*^{-/-} Zellen nach 144 Stunden wieder eine normale Zellzyklusverteilung. Bei den Wildtyp Zellen waren 144 Stunden nach Behandlung die Gesamtzellzahl deutlich reduziert, was darauf zurückzuführen ist, daß ein Teil der Zellen durch Apoptose gestorben sind (apoptotische DNA vor G1-Phase-DNA im Histogramm sichtbar). In Abwesenheit von c-Jun war die Verschiebung nach G2 über einen Zeitraum von 144 Stunden (Abb. 36) und selbst nach 216 Stunden (nicht gezeigt) zu verzeichnen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Behandlung mit alkylierenden Agenzien in c-Jun defizienten Zellen zu einem Zellzyklusblock in der G2-Phase führt, der im Gegensatz zu den Wildtyp Zellen nicht wieder aufgehoben werden kann. Auch diese Experimente wurden mit jeweils zwei Zelllinien durchgeführt, wobei sich die nicht gezeigten Zellen wie ihre Partner verhielten.

Die verringerte Zahl der Kolonien im Toxizitäts-Test könnte also somit auf einem Block in der G2-Phase und der dadurch ausbleibenden Zellproliferation beruhen. Um die Proliferation der Zellen nach Behandlung mit MMS zu messen, wurden die verschiedenen Zelllinien mit MMS behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Anzahl der Zellen bestimmt. Wie aus Abbildung 37 ersichtlich, war bis zum Tag sechs eine Zunahme und an diesem Tag eine leichte Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen. Da die Zellen sechs Tage ohne Zusatz von frischem Medium auf der gleichen Fläche wuchsen, kam es zur Kontaktinhibition und somit Verhinderung der Zellproliferation (Abb. 37). Nach sechs Tagen wurden die Zellen abgelöst und mit geringerer Zellzahl in frischem Medium ausplattiert, um eine effiziente Proliferation zu ermöglichen.

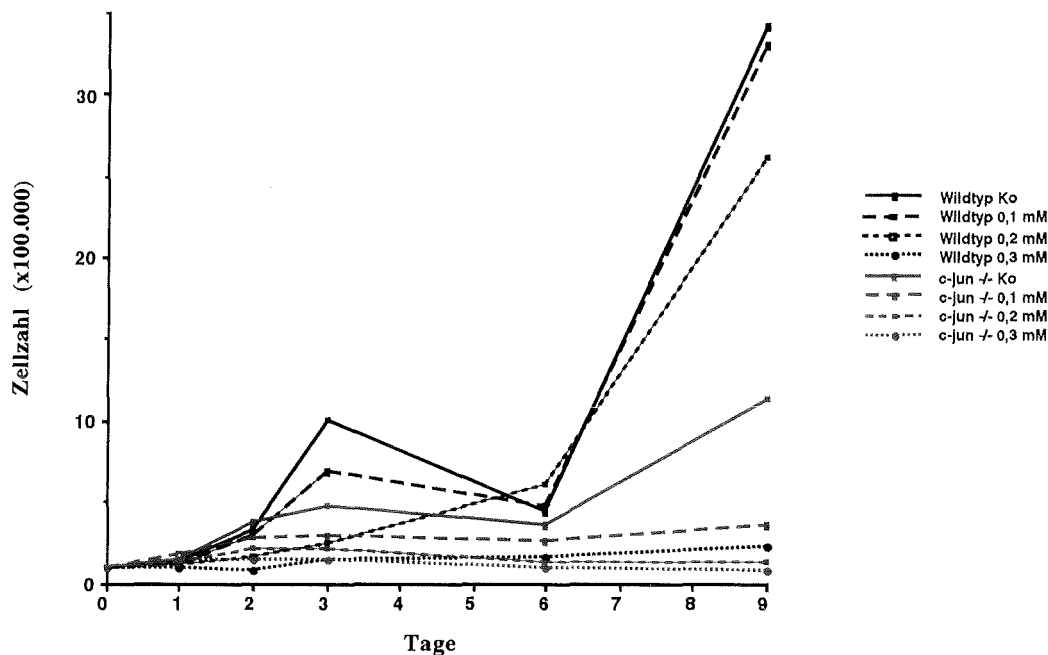


Abb. 37: Die Behandlung der Zellen mit MMS führt zu einer reduzierten Proliferation

Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an MMS (0,1; 0,2 oder 0,3 mM) behandelt oder blieben unbehandelt (Ko). Nach ein, zwei, drei oder sechs Tagen wurde die Zellzahl bestimmt (das MMS blieb so lange im Medium). Am sechsten Tag wurden die Zellen in frischem Medium ausplattiert und die Zellzahl auch am neunten Tag bestimmt.

Die Behandlung der Wildtyp Zellen mit 0,1 oder 0,2 mM MMS führte zu keiner erniedrigten Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Konzentration von 0,3 mM MMS führte bei Wildtyp Zellen zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation (Abb. 37). *c-Jun* defiziente Zellen proliferierten langsamer als Wildtyp Zellen (siehe auch ersten Teil der Arbeit). Bei diesen Zellen führte die Behandlung von 0,1 mM MMS jedoch schon zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation, die bei 0,2 mM MMS noch weitaus deutlicher wurde. Behandlung mit 0,3 mM MMS führte zu einer vollständigen Hemmung der Proliferation (Abb. 37). In dieser Abbildung sind exemplarisch nur ein Wildtyp und eine *c-jun*^{-/-} Zelllinie dargestellt, wobei das zweite Paar von Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen das gleiche Ergebnis erbrachten. In Abwesenheit von *c-Jun* führen schon geringe Konzentrationen von

MMS zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation was eine Erklärung für die reduzierte Zahl der Kolonien im Toxizitäts-Test ist.

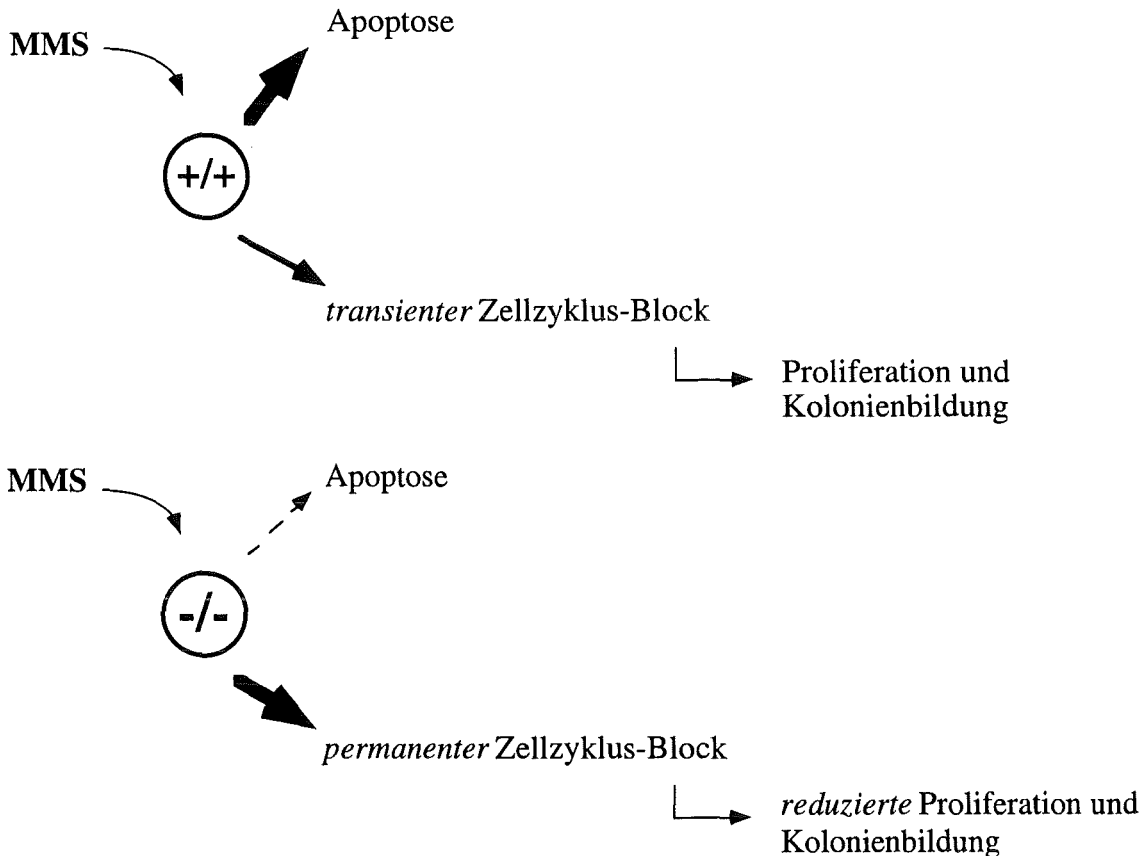
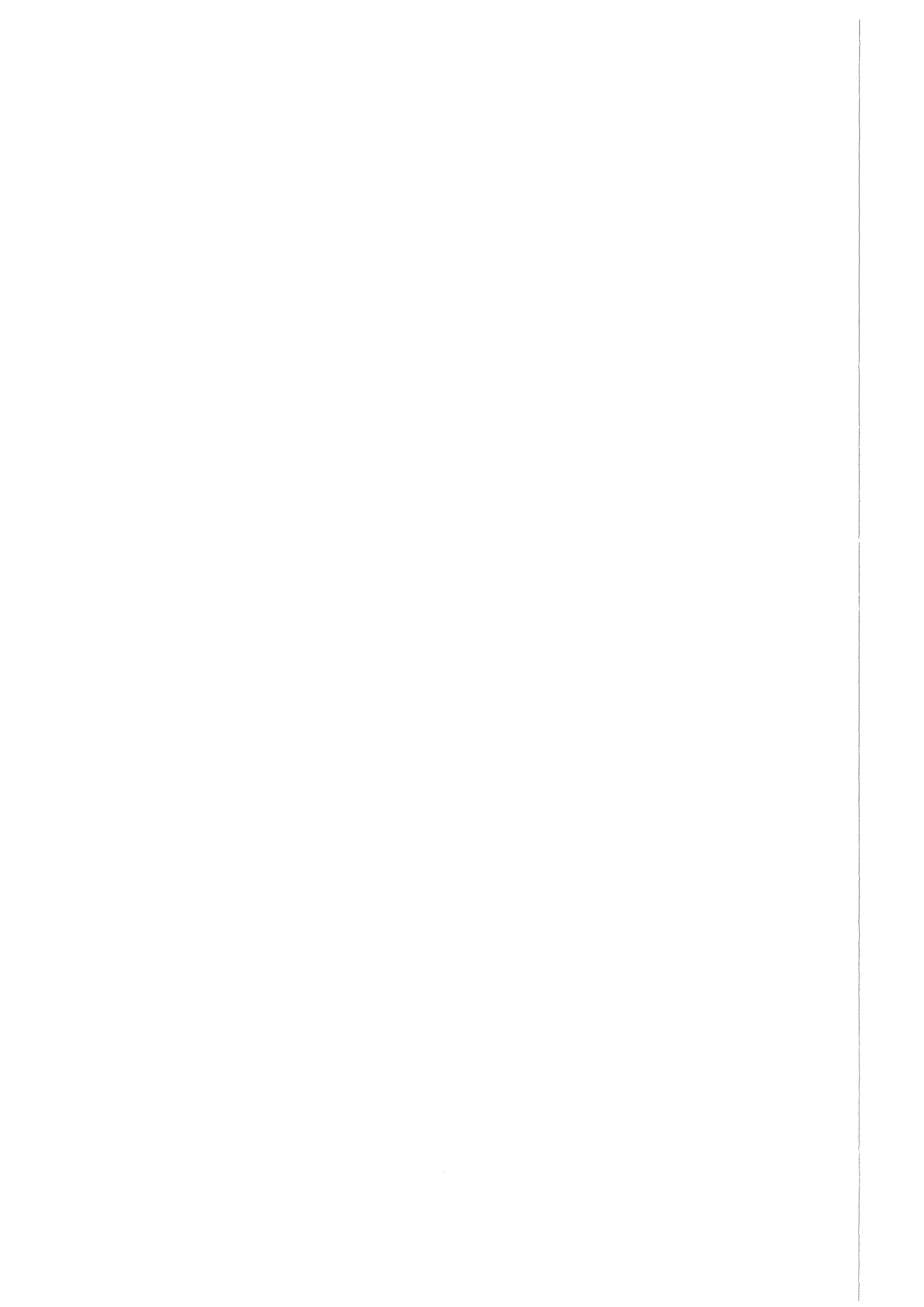


Abb. 38: Modell zum Verhalten von Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Fibroblasten nach Behandlung mit MMS

Diese Daten lassen sich in folgendem Modell zusammenfassen (Abb. 38): MMS führt in Wildtyp Zellen (+/+) einerseits zu erhöhter Apoptose, andererseits zu einem transienten Block im Zellzyklus. Die Zellen, die nicht in die Apoptose gehen, proliferieren weiter und bilden Kolonien (im Toxizitäts-Test sichtbar). In *c-Jun* defizienten Zellen (-/-) führt die Behandlung mit MMS nicht zu einer erhöhten Apoptose, aber zu einem permanenten Zellzyklusblock. Die Proliferation der *c-jun*^{-/-} Zellen ist deutlich reduziert, da ein Großteil der Zellen in einem permanenten Zellzyklus-Block arretiert ist, was zu einer geringeren Kolonienzahl führt.



4. Diskussion

Frühere Studien wiesen darauf hin, daß der Transkriptionsfaktor AP-1 eine wichtige Rolle in der Proliferation und im Zellzyklus spielen könnte. Ich habe durch Verwendung von Fibroblasten aus Embryonen, die kein funktionelles c-Jun Protein mehr haben (sogenannte „knock out“ Mäuse), überprüft, ob c-Jun in der Proliferation von Fibroblasten von Bedeutung ist und welches die molekularen Mechanismen dafür sind. *c-jun*^{-/-} Fibroblasten proliferieren langsamer als Wildtyp Zellen. Die Abwesenheit von c-Jun führt zu einer erhöhten Expression von p53, die sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachzuweisen ist. Der verzögerte Übergang von der G1- in die S-Phase von c-Jun defizienten Zellen beruht auf der erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p21, einem Zielgen von p53. Die verlangsamte Proliferation sowie die erhöhte Expression von p21 können durch das Ausschalten von p53 rückgängig gemacht werden, was dazu führt, daß *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wieder die Proliferationsrate von Wildtyp Zellen aufweisen.

c-jun^{-/-} Zellen sind hypersensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien, wobei diese Hypersensitivität nicht auf reduzierter Reparatur der geschädigten DNA beruht. Im Gegensatz zu *c-fos*^{-/-} Zellen, bei denen die Hypersensitivität gegenüber UV C auf einer erhöhten Apoptoserate beruhte, ist die Apoptose nach Behandlung mit dem alkylierenden Agens MMS in den *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Die reduzierte Apoptose in den *c-jun*^{-/-} Zellen ist abhängig von der Expression von p53 und korreliert mit verminderten Proteinmengen und Aktivität der Jun N-terminalen Kinasen (JNKs). Die verminderte Anzahl der Kolonien von *c-jun*^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS im Toxizitäts-Test kommt durch einen G2-Zellzyklusblock zustande, der bei den c-Jun defizienten Zellen im Gegensatz zum Wildtyp permanent erhalten bleibt.

Im ersten Teil der Diskussion will ich auf die Rolle von c-Jun in der Proliferation eingehen. Im zweiten Teil wird die Rolle von c-Jun in der Apoptose und im Überleben gegenüber alkylierenden Agenzien diskutiert.

4.1. Teil 1: Die Rolle von c-Jun in der Proliferation

Die vorliegenden Daten haben den Transkriptionsfaktor c-Jun, wie in Abbildung 39 schematisch zusammengefaßt, als wichtigen Regulator der Zellzyklusregulation identifiziert.

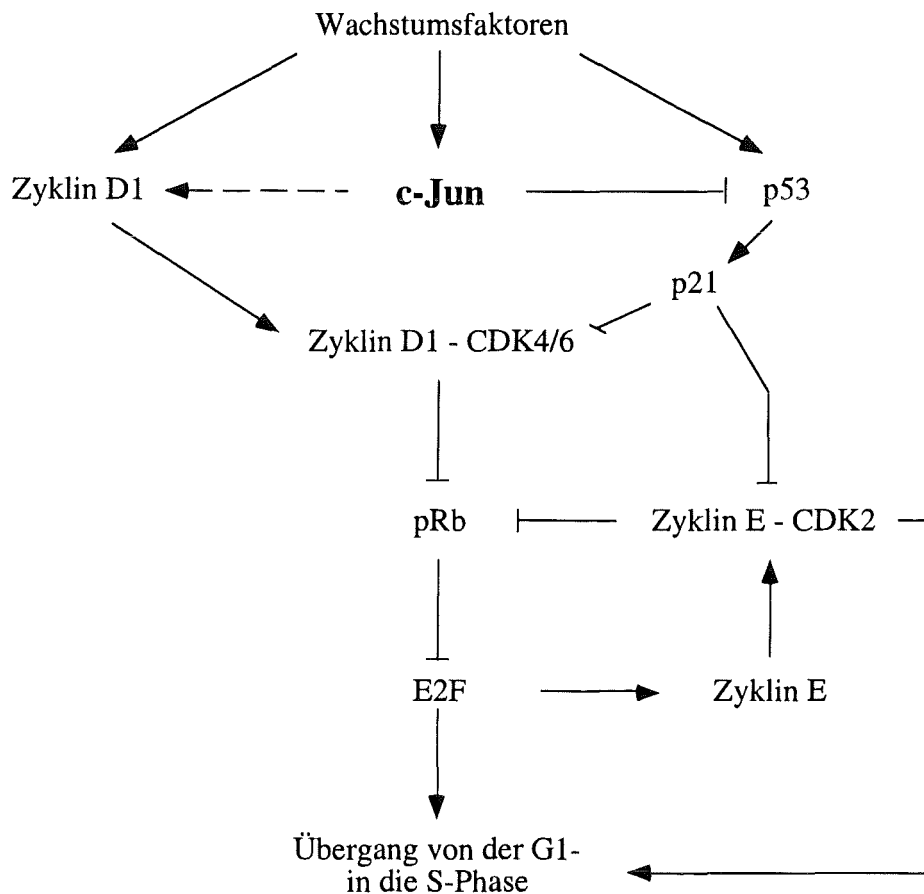


Abb. 39: Modell zur Rolle von c-Jun in der Regulation des Zellzyklus

Fibroblasten, denen c-Jun fehlt, proliferieren langsamer als der vergleichbare Wildtyp, jedoch sind die Zellen nicht vollständig in der G₀- oder G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Obwohl die Zykline D1 und E, die im Übergang von der G₁- in die S-Phase eine Schlüsselrolle spielen, in den c-Jun defizienten Zellen leicht verstärkt exprimiert sind, ist die Aktivität ihrer assoziierten Kinasen CDK4/6 und CDK2 nach Serumstimulation im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Darüber hinaus werden die RNA und das Protein des Tumorsuppressorgens p53 in *c-jun*^{-/-} Zellen verstärkt exprimiert, was dazu führt, daß der Zellzyklusinhibitor p21, ein Zielgen von

p53, in diesen Zellen ebenfalls verstärkt exprimiert wird. p21 hemmt sowohl die Zyklin D- als auch die Zyklin E-assoziierten Kinase-Komplexe, die somit das Protein des Retinoblastom Gens, pRb, nicht ausreichend phosphorylieren können. Der Übergang von der G1- in die S-Phase ist dadurch vermindert. Wird zusätzlich zu c-Jun p53 inaktiviert, ist der Inhibitor p21 in seiner Expression gehemmt. Die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen ist wieder hergestellt und die Zellen proliferieren wieder wie der Wildtyp.

4.1.1. c-Jun ist ein negativer Regulator von p53

Die negative Regulation von p53 scheint der zentrale Mechanismus des Einflusses von c-Jun auf die Proliferation zu sein. Die exogene Expression von c-Jun mittels Transfektion eines c-Jun Expressionsvektors führt dazu, daß *c-jun*^{-/-} Zellen wieder so schnell proliferieren wie Wildtyp Zellen. In diesen Zellen ist die Expression von p53 im Vergleich zu *c-jun*^{-/-} Zellen reduziert (nicht gezeigt). Dies läßt darauf schließen, daß die verstärkte Expression von p53 in *c-jun*^{-/-} Zellen nicht auf eine Mutation von p53 zurückzuführen ist, die durch eine Erhöhung der Halbwertszeit des Proteins zu erhöhten Mengen von p53 führt. Ebenso kann ausgeschlossen werden, daß die erhöhten Werte von p53 auf andere, von c-Jun unabhängige Prozesse zurückzuführen sind. Northern-Blot Analysen belegen, daß die basale Expression von p53 in *c-jun*^{-/-} Zellen auf transkriptioneller Ebene erhöht ist. Die Halbwertszeit von p53 ist jedoch durch das Fehlen von c-Jun nicht beeinflußt (Schreiber et al., 1998). Die Aktivität des Promotors von p53 ist in c-Jun defizienten Zellen im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Aktivität eines transient transfizierten p53 Promotor-Luciferase-Reporter Konstruktes war in *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen zwei bis dreifach erhöht (Schreiber et al., 1998). Diese Aktivität wird durch exogene Expression von c-Jun mittels Transfektion eines c-Jun Expressionsvektors wieder gehemmt (Schreiber et al., 1998). Dieser Mechanismus der Regulation unterscheidet sich von der bisher bekannten Aktivierung von p53 nach DNA-schädigenden Substanzen, der auf der Ebene der Proteinstabilisierung stattfindet. Der einzig bisher bekannte Befund für die transkriptionelle Regulation von p53 ist nach Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren. Dabei erfolgte die Aktivierung von p53 nach einigen Stunden und erreichte nach 24 Stunden ihr Maximum (Ginsberg et al., 1990). Auch *c-jun* wird nach Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren transkriptionell aktiviert. Die Kinetik ist jedoch viel schneller als

die von p53, da die Aktivierung des „immediate early“ Genes *c-jun* schon innerhalb von Minuten beginnt und bei 45 Minuten ihr Maximum erreicht (Ryseck et al., 1988). Die hohen c-Jun Mengen zu den frühen Zeitpunkten könnten Einfluß auf den Promotor von p53 nehmen, da es erst nach Degradation und somit reduzierten Mengen von c-Jun, zu einer verstärkten Expression von p53 kommt.

Die molekularen Grundlagen für die transkriptionelle Aktivierung von p53 nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren sind nicht genau bekannt. Die bekannten Mechanismen der Regulation von p53 nach DNA-schädigenden Agenzien verlaufen auf post-transkriptioneller und post-translationeller Ebene, bevorzugt durch Stabilisierung des Proteins durch Phosphorylierung und der daraus erfolgenden erhöhten Halbwertszeit (als Übersicht siehe Ko und Prives, 1996). Bei all diesen Prozessen ist die Transkriptionsrate von p53 nicht verändert (Maltzman und Czyzyk, 1984; Levine, 1997; Agarwal et al., 1998). Der Mechanismus, mit dem c-Jun die Expression von p53 steuert, ist also neu und verschieden zu den bisher beschriebenen Regulationsmechanismen von p53 nach Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Substanzen. Diese beiden Mechanismen arbeiten unabhängig voneinander, da in *c-jun*^{-/-} Zellen die basal erhöhte Proteinmenge von p53 nach Bestrahlung der Zellen mit UV C oder γ , durch Verlängerung der Halbwertszeit des p53 Proteins noch weiter verstärkt werden kann. Ein weiteres Argument daß die basal erhöhte Expression von p53 in *c-jun*^{-/-} Zellen nicht auf erhöhter Streßsituation der Zelle beruht ist die Tatsache, daß in diesen Zellen keine erhöhte Aktivität von solchen Kinasen, die in Signalketten beteiligt sind, die nach Streß aktiviert werden, verzeichnet werden. Beispiele dafür sind die Jun N-terminalen Kinasen JNK1 und JNK2, und p38, die in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} gleich stark aktiviert werden. Die Effizienz der Reparatur von DNA-Schäden (als weiterer möglicher Auslöser der zellulären Streßantwort) ist durch das Fehlen von c-Jun ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die erhöhte Expression von p53 in den *c-jun*^{-/-} Zellen ist also nicht eine allgemeine Reaktion auf Streß, sondern beruht auf der fehlenden Repression von p53 durch c-Jun.

4.1.2. Mechanismen der Regulation der Expression von p53

Der molekulare Mechanismus der negativen Wirkung von c-Jun auf die Transkription von p53 ist noch völlig unklar. c-Jun könnte einerseits zur Neusynthese eines

Repressors führen, der verstärkt an den Promotor von p53 bindet und die Transkription hemmt. Andererseits könnte c-Jun an einen Aktivator von p53 durch Protein-Protein-Wechselwirkungen binden und die Aktivität dieses Proteins hemmen. Solche Wechselwirkungen wurden für AP-1 mit dem Glukokortikoid-Rezeptor beschrieben, bei der c-Jun/c-Fos die Dexamethason induzierte Aktivität des Glukokortikoid-Rezeptors am MMTV-Promotor hemmen kann (Schüle et al., 1990). Andererseits kann der Glukokortikoid-Rezeptor durch direkte Bindung an AP-1 die transkriptionelle Aktivität dieses Transkriptionsfaktors hemmen (Jonat et al., 1990; Yang Yen et al., 1990a). Eine direkte Bindung von c-Jun an den Promotor von p53 wäre auch möglich. In diesem Fall müßte c-Jun jedoch trotz einer starken Transaktivierungsdomäne als Repressor wirken (Angel und Karin, 1991). Es gibt allerdings bereits Beispiele, in denen c-Jun die Expression von Genen durch direkte Bindung an den Promotor hemmen kann. So wird z.B. die Expression des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes I (MHC class I) durch Bindung von c-Jun an eine AP-1 Bindestelle im Promotor gehemmt (Howcroft et al., 1993 Murphy et al., 1996).

Der Promotor von p53 enthält eine DNA-Bindestelle, die der AP-1 Bindestelle sehr ähnlich ist (Ginsberg et al., 1990). Wird diese TRE-ähnliche Sequenz mit dem TK-Promotor fusioniert und als CAT Reporterkonstrukt transfiziert, zeigt dieses Konstrukt (TK-TRE-CAT) im Vergleich zu einem TK-CAT Konstrukt eine reduzierte Aktivität (Ginsberg et al., 1990). Dieses TRE-ähnliche Sequenzmotiv des p53 Gens kann somit eine reprimierende Funktion bei der Regulation der Genexpression einnehmen. Der Komplex, der an diese TRE-ähnliche Sequenz bindet, scheint sich von den bisher charakterisierten AP-1 Komplexen zu unterscheiden, da *in vitro* DNA-Bindungsstudien gezeigt haben, daß dieser Faktor nur mit niedriger Effizienz mit der AP-1 Konsensus-Bindestelle (an die Fos/Jun bindet) interagiert (Ginsberg et al., 1990). Auch zeigte gereinigtes AP-1 (Hirai et al., 1989b) keine Bindung an diese DNA-Sequenz (Ginsberg et al., 1990). c-Jun könnte über dieses Promotorelement p53 hemmen. Eine Möglichkeit, die Repression von p53 durch c-Jun aufzuklären, bieten *c-jun*^{-/-} Zellen, die mit Expressionsvektoren für c-Jun oder spezifischen c-Jun-Mutanten transfiziert wurden, die entweder bevorzugt mit c-Fos oder ATF2 dimerisieren (van Dam et al., 1998). Die Expression von c-Jun oder der verschiedenen Mutanten als konditional induzierbare Fusionsproteine, die im nicht induzierten Zustand inaktiv sind und unabhängig von der Proteinsynthese aktiviert werden können, bieten den Vorteil, Prozesse untersuchen zu können, die von c-Jun (oder den

jeweiligen c-Jun-Mutanten) direkt gesteuert werden. Dabei können die verschiedenen Mutanten Aufschluß darüber geben, ob die Repression von p53 von c-Jun/c-Fos oder c-Jun/ATF2 Heterodimeren abhängt.

Unabhängig vom genauen Mechanismus der transkriptionellen Repression von p53 durch c-Jun bestätigen die hier vorgelegten Studien, daß p53 das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus reguliert. Dies kann, ähnlich wie bei der Streßantwort, über die Regulation des Zellzyklusinhibitors p21 geschehen.

Wie bereits erwähnt, proliferieren Zellen, denen zusätzlich zu c-Jun auch noch p53 fehlt, schneller als Wildtyp Zellen. Dabei ist die Expression des Inhibitors p21 im Vergleich zu Wildtyp und vor allem c-Jun defizienten Zellen deutlich reduziert. Die Proliferationsrate ist abhängig von der Menge an p53 und p21, da Zellen, die verstärkt diese beiden Proteine exprimieren, langsamer proliferieren. Umgekehrt proliferieren Zellen, die weder p53 noch p21 aufweisen, schneller als Wildtyp Zellen. In Zellen, in denen das Protein des Retinoblastom Gens (pRb) fehlt, ist erhöhte Expression von Zyklin D oder des Inhibitors p16, der die assoziierten Kinasen CDK4/6 hemmt, ohne Einfluß auf den Zellzyklus (Weinberg, 1995). Da ohne pRb die Wirkung der Zyklin D-assozierten Kinasen oder deren Inhibitoren ausbleibt (siehe auch Abb. 39), ist pRb somit das einzig physiologisch relevante Substrat für den Zyklin D-CDK4/6 Komplex. Analog dazu könnte p53 das von c-Jun regulierte Schlüsselprotein im Zellzyklus sein. Übereinstimmend mit den hier präsentierten Daten führt die Inaktivierung von p53 (und pRb) durch das T-Antigen des Affenvirus SV 40 in *c-jun*^{-/-} Zellen zu einer Proliferationsrate, die mit der des Wildtyps zu vergleichen ist (Johnson et al., 1996).

Die transiente Transfektion von einem Expressionsvektor für c-Jun oder die Aktivierung des Ras-Signaltransduktionsweges (durch aktiviertes Ras) führen zur Aktivierung des Zyklin D1 Promotors (Filmus et al., 1994; Herber et al., 1994). Die erhöhte Expression von Zyklin D1 in c-Jun defizienten Zellen war somit unerwartet. Es ist denkbar, daß c-Jun ausreichend, aber nicht erforderlich für die Aktivierung des Zyklin D1 Promotors nach Induktion mit Wachstumsfaktoren ist. Die Expression der Zykline D1 und E sind in *c-jun*^{-/-} Zellen leicht erhöht. Da diese Zykline völlig unterschiedlich während des Zellzyklus und nach Serumstimulation reguliert werden (als Übersicht siehe Sherr, 1996), sind die Mechanismen, die der verstärkten Expression in *c-jun*^{-/-} Zellen zugrunde liegen, verschieden. Die verstärkte Expression

der Zykline D1 und E könnte der Versuch der Zelle sein, die hohen Mengen des Inhibitors p21 zu kompensieren. Dadurch kommt es trotz hoher Proteinnengen an p21 zu einer Aktivierung der Zyklin-assoziierten Kinasen, die dazu führt, daß die Zellen proliferieren, wenngleich auch langsamer, und nicht in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert bleiben.

4.1.3. Unterschiedliche Funktionen von c-Jun in der Proliferation und Differenzierung

Im Gegensatz zu primären oder immortalisierten Fibroblasten ist der Übergang von der G1- in die S-Phase in embryonalen Stammzellen unabhängig von der Aktivität des Zyklin D-CKD4/6 Komplexes (Savatier et al., 1996). Embryonale Stammzellen können in Anwesenheit von hohen Mengen an p53, das transkriptionell aktiv ist, schnell proliferieren (Sabapathy et al., 1997). Wenn also die Funktion von c-Jun ausschließlich in der Repression von p53 besteht, dann sollte das Fehlen von c-Jun in embryonalen Stammzellen keinen Einfluß auf deren Proliferation zeigen, da p53 hierbei keine Rolle spielt. Tatsächlich zeigen Embryonale Stammzellen, denen c-Jun fehlt, keine veränderte Proliferation im Vergleich zum Wildtyp (Hilberg und Wagner, 1992).

Mausembryonen, bei denen beide Allele von c-Jun inaktiviert sind, sterben während ihrer pränatalen Entwicklung aufgrund beeinträchtigter Differenzierung von Leberzellen (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993). Der Proliferationsdefekt von *c-jun*^{-/-} Fibroblasten konnte durch zusätzliches Ausschalten von p53 wieder rückgängig gemacht werden. Es stellte sich daher die Frage, ob der Defekt, der durch das Fehlen von c-Jun in der Differenzierung während der Embryonalentwicklung ausgelöst wird, durch das Ausschalten von p53 ebenfalls behoben werden kann. Es zeigte sich jedoch, daß Mausembryonen, denen sowohl c-Jun als auch p53 fehlt, während ihrer pränatalen Entwicklung zum gleichen Zeitpunkt wie c-Jun defiziente Mausembryonen sterben (Schreiber et al., 1998). Die Rolle, die c-Jun während der Embryonalentwicklung spielt, kann durch das Ausschalten von p53 nicht behoben werden und ist daher unabhängig von p53. Obwohl die genaue Ursache für das frühe Sterben der c-Jun defizienten Mausembryonen nicht eindeutig geklärt ist, liegt die Vermutung nahe, daß es kein Defekt in der Proliferation oder im Zellzyklus ist, der dafür verantwortlich sein könnte. Ein Defekt in der Differenzierung von Zellen wie z.B. der Stromazellen oder der erythroiden Zellen in der fötalen Leber ist daher eher

wahrscheinlicher. Dieser Defekt stellt somit einen von p53 unabhängigen Effekt von c-Jun dar.

Es gibt Befunde, die belegen, daß c-Jun zelltypspezifisch in die Differenzierung eingreift. In myeloiden Zellen ist die Expression von c-Jun mit der myeloiden Differenzierung assoziiert (Lord et al., 1993). Daneben ist c-Jun bzw. erhöhte Aktivität von AP-1 in der Phorbol-ester-induzierten Differenzierung von Makrophagen beteiligt (Szabo et al., 1994). Ähnliches gilt für Erythrozyten, die durch Erythropoetin zur Differenzierung gebracht wurden (Patel und Sytkowski, 1995). Darüber hinaus ist c-Jun wichtig für epitheliale Polarität (Fialka et al., 1996), wie auch für die Differenzierung von neuronalen Zellen (de Groot und Kruijer, 1991). Ob p53 bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt.

4.1.4. Verknüpfung von Signaltransduktion und Zellzyklusregulation

c-Jun ist ein wichtiger Endpunkt von Signaltransduktionskaskaden, die durch Wachstumsfaktoren und Cytokine ausgelöst werden, wobei eine der wichtigsten Signalkaskaden der Ras/MAP-Kinase Weg ist (Karin, 1995; Minden und Karin, 1997; Robinson und Cobb, 1997; Lewis et al., 1998). Obwohl die einzelnen Kinasen und deren Aktivatoren dieser Signaltransduktionskaskade gut charakterisiert sind, ist weitgehend unklar, wie die Verbindung zur Regulation des Zellzyklus hergestellt werden kann (Downward, 1997). Ein anderer ebenfalls gut untersuchter Endpunkt des Ras/MAP-Kinase Weges ist c-Fos, ein AP-1 Mitglied, das durch Bindung von TCF/Elk1 und SRF an die SRE-Bindestelle in seinem Promotor reguliert wird (Treisman, 1996). Jedoch scheinen weder c-Fos noch FosB in der Proliferation eine Rolle zu spielen. Mäuse ohne funktionelles c-Fos oder FosB sterben nicht während ihrer pränatalen Entwicklung und *c-fos*^{-/-} Fibroblasten zeigen keine Veränderung der Proliferation (Bruesselbach et al., 1995; Gruda et al., 1996).

Die bisher einzige Verknüpfung zwischen Signaltransduktionskaskade, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, und Kontrolle des Zellzyklus war die verstärkte Expression von Zyklin D1 in Anwesenheit von überexprimiertem c-Jun. Die Tatsache, daß Zyklin D1 in den *c-jun*^{-/-} Zellen nicht reduziert exprimiert wird, lassen den Schluß zu, daß die c-Jun abhängige Induktion des Zyklin D1 Promotors möglicherweise nicht der entscheidende Beitrag von c-Jun in der Zellzyklusregulation ist. Vielmehr ist p53 das Schlüsselprotein in der Regulation des Zellzyklus. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Verbindung zwischen c-Jun und p53/p21

als fehlende Verknüpfung zwischen den Signaltransduktionskaskaden, die durch Aktivierung der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren ausgelöst und deren Signale in den Kern übertragen werden, und der Zellzyklusregulation aufgezeigt werden (siehe auch Abb. 39).

4.1.5. Die Rolle von c-Jun in der Transformation

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, daß die Aktivität von c-Jun während des Zellzyklus strikt reguliert werden muß. Diese Hypothese wird auch dadurch bestätigt, daß die konstante Überexpression von c-Jun zur Transformation führt. Gleichzeitig wird c-Jun auch durch Ha-ras aktiviert, wobei die aktivierte Expression von c-Jun für transformierende Eigenschaften notwendig ist (Lloyd et al., 1991; Smeal et al., 1991; Johnson et al., 1996). Ob Veränderungen von p53 für diese Funktion wichtig sind, ist noch völlig offen.

Falls die Repression von p53 durch c-Jun auch in der Transformation eine Rolle spielt, sollten in Tumoren, die eine hohe Aktivität von AP-1 aufweisen, Mutationen im p53 Protein, die die Halblebenszeit erhöhen, nicht kausal sein. In transgenen Mäusen, die v-Fos spezifisch in der Haut exprimieren, kommt es nach Behandlung mit TPA zur Ausbildung von Papillomen, die spontan zu malignen Karzinomen konvergieren können. In diesen Karzinomen wurden bisher noch keine Mutationen von p53 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist in chemisch induzierten malignen Tumoren eine hohe Frequenz von Mutationen oder gar der Verlust von p53 vorzufinden (Greenhalgh et al., 1995). Darüber hinaus bewirkt entweder die Überexpression von c-Jun oder die Einfügung von Mutationen in p53 eine verstärkte Rate der Zelltransformation durch aktiviertes Ras. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß kooperative Eigenschaften von c-Jun und p53 für den Prozeß der Transformation nicht notwendig sind (Hicks et al., 1991; Hinds et al., 1989; Smeal et al., 1991). Ähnlich kann die Bildung von Osteosarkomen bei Mäusen, die c-Fos überexprimieren, sowohl durch zusätzliche Überexpression von c-Jun als auch durch Inaktivierung von p53 beschleunigt werden (Wang et al., 1995; W. Jochum und E. Wagner, unveröffentlichte Daten). c-Jun, jedoch nicht Mutationen von p53 sind für die Transformation wichtig, da *c-jun*^{-/-} Zellen, die durch das T-Antigen des Affenvirus SV40 immortalisiert wurden, durch Ras nicht transformiert werden können (Johnson et al., 1996). Dies ist ein Hinweis dafür, daß es noch andere p53-unabhängige Funktionen von c-Jun gibt, die bei diesem Prozeß beteiligt sind.

4.2. Teil 2: Die Rolle von c-Jun in der Apoptose und im Überleben gegenüber alkylierender Agenzien

Der *c-jun* Promotor selbst besitzt zwei AP-1 Bindestellen, Jun1 und Jun2, die in unbehandelten Zellen konstitutiv von c-Jun/ATF2 Heterodimeren besetzt sind und nach Induktion mit UV C oder TPA durch Hyperphosphorylierung aktiviert werden (Herr et al., 1994 van Dam et al., 1993). Übereinstimmend mit der postulierten autoregulatorischen Funktion von c-Jun bei der Aktivierung seines eigenen Promotors (Angel et al., 1988), ist die transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* durch TPA, UV C und MMS in *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Diese schwache Aktivierung von *c-jun* kommt vermutlich durch ATF2 Homodimere zustande. So führt die UV-Bestrahlung von F9 Zellen, die kein c-Jun aber ATF2 exprimieren, zu einer Induktion von *c-jun* (van Dam et al., 1995). Die Expression der Kollagenase ist abhängig von der Neusynthese und verstärkten Bindung von c-Fos/c-Jun. Die Expression von Genprodukten, die durch c-Jun/c-Fos Heterodimere reguliert werden, ist in *c-jun*^{-/-} Zellen sehr stark reduziert. Selbst nach Induktion mit UV C oder TPA ist die transkriptionelle Aktivierung des Kollagenase- oder des Stromelysingens in c-Jun defizienten Zellen kaum nachweisbar. Das Fehlen von c-Jun hat keinen Einfluß auf die Expression der anderen Mitglieder der Jun-Familie (nicht gezeigt). In *c-jun*^{-/-} Zellen ist vermehrt JunB im AP-1 Komplex, der an die DNA bindet, enthalten. JunB hat aber eine geringere Transaktivierungskapazität (Chiu et al., 1989), so daß die verstärkte Bindung von JunB nicht zu einer transkriptionellen Aktivierung des Kollagenase- oder des Stromelysingens führt. In *c-jun*^{-/-} Zellen sind Zielgene betroffen, die sowohl von c-Jun/ATF2 als auch von c-Jun/c-Fos Heterodimeren reguliert werden. Im Gegensatz dazu waren in *c-fos*^{-/-} Zellen nur solche Gene betroffen, die durch c-Jun/c-Fos Heterodimere aber nicht durch c-Jun/ATF2 Heterodimere reguliert werden.

Die starke Induktion von *c-jun* durch MMS läßt vermuten, daß diese Induktion eine mögliche Schutzfunktion der Zellen gegenüber alkylierenden Substanzen darstellt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals diese Hypothese experimentell bestätigt werden. Der Verlust von c-Jun führt zu einer Hypersensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien, was durch eine stark verringerte Anzahl der Kolonien nach Behandlung der Zellen mit MMS oder MNNG im Toxizitäts-Test festzustellen ist. Diese Hypersensitivität beruht nicht auf fehlender Reparatur der geschädigten DNA,

da die UDS nach Behandlung mit MMS oder UV C in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen sehr ähnlich ist. Der Verlust von c-Jun hat somit keinen Einfluß auf die Expression oder Aktivität der Enzyme, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Übereinstimmend damit sind Befunde, daß Gene, die an der Reparatur der DNA beteiligt sind, durch UV nicht induziert werden (Holbrook und Fornace, 1991; Herrlich et al., 1992).

4.2.1. Die Rolle von c-Jun in der Apoptose

Die Hypersensitivität der *c-jun*^{-/-} Zellen gegenüber MMS ist unabhängig von der Reparaturkapazität der Zellen, ähnlich wie die Hypersensitivität von *c-fos*^{-/-} Zellen gegenüber UV C. Im Gegensatz zu *c-fos*^{-/-} Zellen beruht die Hypersensitivität von *c-jun*^{-/-} Zellen aber nicht auf erhöhter Apoptose. Vielmehr geht der Verlust von c-Jun mit einer verminderten Fähigkeit der Zellen zur Apoptose einher. Die bisher beschriebenen Funktionen, die c-Jun in der Apoptose einnimmt, sind nicht eindeutig und scheinen sich auch in den einzelnen Zelltypen zu unterscheiden. NIH 3T3 Fibroblasten, in denen die Expression von c-Jun konditional reguliert ist, zeigen eine erhöhte Apoptoserate in Anwesenheit von c-Jun (Bossy Wetzell et al., 1997). In neuronalen Zellen und in Leukämiezellen führt die Expression einer dominant negativen Mutante von c-Jun zu einer Hemmung der Apoptose (Ham et al., 1995; Verheij et al., 1996). In Zellen, die die dominant negative Mutante von c-Jun enthalten, wird nicht nur c-Jun sondern werden auch andere Mitglieder der Jun-Familie oder AP-1 Dimere gehemmt. Ein anti-apoptotischer Effekt kann auch durch antisense-Sequenzen für *c-jun* oder Antikörper gegen c-Jun hervorgerufen werden (Estus et al., 1994; Sawai et al., 1995). Im Gegensatz dazu resultiert die Expression von c-Jun in erythroiden Zellen in einer Hemmung der Apoptose (Shimizu et al., 1996). In erythroiden Zellen korreliert die Aktivität der verschiedenen Mitglieder der Jun-Familie mit unterschiedlichen Prozessen: JunB fungiert als Auslöser der Apoptose und c-Jun als Schutz gegen Apoptose (Jacobs-Helber et al., 1998). Andererseits konnte durch *in situ* Detektionsmethoden in *c-jun*^{-/-} Mausembryonen Apoptose nachgewiesen werden (Roffler Tarlov et al., 1996). Diese Befunde weisen darauf hin, daß die Rolle von c-Jun in der Apoptose in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sein kann. Ähnliches wurde für die Kaspasen 2 und 3, die Schlüsselenzyme in der Apoptose darstellen, aber je nach Zellsystem und Stimulus

Aktivatoren oder Repressoren der Apoptose sein können, beschrieben (Bergeron et al., 1998; Woo et al., 1998).

Zellen, bei denen c-Jun fehlt, bieten im Vergleich zu den vorhergehend beschriebenen experimentellen Ansätzen das geeignetste System, um die spezifische Rolle von c-Jun in der Apoptose zu untersuchen.

c-Jun ist ein Endpunkt verschiedener Signalketten, die unter anderem auch durch solche Stimuli ausgelöst werden, die zur Apoptose führen. Die kritische Rolle der c-Jun aktivierenden Signaltransduktionswege in der Apoptose wird auch durch kürzlich beschriebene Analysen von Maus Mutanten unterstrichen, in denen übergeordnete Kinasen von c-Jun durch homologe Rekombination inaktiviert wurden. In Thymocyten von Mäusen, bietet SEK, die übergeordnete Kinase der Jun N-terminalen Kinasen JNK, einen Schutz beim Überleben nach CD95-induzierter Apoptose (Nishina et al., 1997). Dagegen zeigen neuronale Zellen in Abwesenheit von JNK3, der neuronal spezifischen Jun N-terminalen Kinase, reduzierte Apoptoseraten im Vergleich zu den neuronalen Zellen aus Wildtyp Mäusen. Dabei ist die Aktivität von AP-1 in den JNK3 defizienten Zellen ebenfalls reduziert (Yang et al., 1997a). Übereinstimmend mit der Funktion der übergeordneten Kinasen und der Notwendigkeit der Hyperphosphorylierung von c-Jun für dessen transkriptionelle Aktivität zeigen neuronale Zellen, die nur mutiertes c-Jun Protein exprimieren, nach Behandlung mit Kainat ebenfalls eine reduzierte Apoptoserate (Axel Behrens, unveröffentlichte Daten). Diese Mutante von c-Jun enthält statt der Serine an Position 63 und 73 Alanine, die dazu führen, daß die Transaktivierungsfunktion von c-Jun nicht mehr durch Phosphorylierung aktiviert werden kann.

Es stellt sich die Frage, ob die Effekte von c-Jun in der Regulation der Apoptose direkt oder indirekt sind. Eine Möglichkeit der Hemmung der Apoptose in *c-jun*^{-/-} Zellen wäre eine spontane Steigerung der anti-apoptotischen Funktionen. Doch die reduzierte Apoptoserate in den c-Jun defizienten Zellen ist nicht auf eine spontane Erhöhung von anti-apoptotischen Genen zurückzuführen. Die Aktivität von NF-κB, ein Transkriptionsfaktor der anti-apoptotisch wirken kann (Beg und Baltimore, 1996; Liu et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996; Wang et al., 1996; Wu et al., 1996) ist in Abwesenheit von c-Jun erheblich vermindert und selbst nach Induktion der Zellen mit TPA kaum noch aktivierbar. Diese fehlende Bindeaktivität von NF-κB liegt nicht an der verringerten Expression der einzelnen Untereinheiten des Transkriptionsfaktors: Neben der transkriptionell aktiven Untereinheit von NF-κB, p65, sind die

beiden Untereinheiten p50 und c-Rel in den *c-jun*^{-/-} Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen nicht vermindert exprimiert (für p50 und c-Rel: Daten nicht gezeigt.). Der Inhibitor IκBα hingegen ist in Abwesenheit von c-Jun verstärkt exprimiert. Durch die verstärkte Expression von IκBα, die durch verringerten Abbau oder verstärkte Synthese zustande kommen kann, ist das Gleichgewicht zwischen Inhibitor und Aktivator verschoben. Dadurch kommt es zu einer verringerten Translokation des aktiven NF-κB vom Zytoplasma in den Zellkern. Da c-Jun zur verstärkten NF-κB Bindung beiträgt (Stein et al., 1993), könnte das Fehlen von c-Jun ebenfalls zu einer reduzierten Bindung von NF-κB beitragen. Dieser Effekt ist allerdings in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen ohne Belang.

Derzeitige Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein weiteres anti-apoptotisch wirkendes Protein, Bcl2, in Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen nicht unterschiedlich exprimiert wird.

4.2.2. Die Funktionen von c-Jun in der Apoptose sind abhängig von der Expression von p53

Eine zweite Möglichkeit der reduzierten Apoptose in den *c-jun*^{-/-} Zellen ist die Beeinträchtigung der Expression von AP-1 abhängigen Genen. Da in *c-fos*^{-/-} Zellen die Apoptose nach Behandlung der Zellen mit UV C erhöht ist, kann es sich jedoch nicht um Gene handeln, die von c-Jun/c-Fos Dimeren reguliert werden. Es muß sich vielmehr um solche Gene handeln, deren Expression von c-Jun/ATF2 Dimeren oder anderen c-Jun enthaltenden Proteindimeren reguliert werden. Auch könnte eine Veränderung von Protein-Protein-Interaktionen (z.B. von c-Jun mit Hormonrezeptoren oder mit bHLH-Proteinen) durch das Fehlen von c-Jun zur verminderten Apoptose führen. Dagegen spricht jedoch, daß das zusätzliche Ausschalten von p53 wieder zu einer verstärkten Apoptose führt. *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen zeigen die gleiche Apoptoserate wie Wildtyp Zellen. Die verstärkte Apoptose von *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen im Vergleich zu *c-jun*^{-/-} Zellen kann nicht auf der verstärkten Expression von AP-1 abhängigen Genen beruhen, da diese Zellen kein c-Jun exprimieren. Es kommt zwar zu einer Kompensation der DNA-Bindeaktivität durch verstärkte JunB und JunD Bindung, jedoch resultiert diese nicht in einer verstärkten Transkription AP-1 abhängiger Gene. Die Expression der Kollagenase, ist in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen wie in den *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp schwächer. Da JunB und JunD

geringere Transaktivierungskapazitäten besitzen (Chiu et al., 1989; Hirai et al., 1989a), kommt es trotz verstärkter Bindeaktivität nicht zu einer verstärkten AP-1 abhängigen Transkription.

Welche Bedeutung hat die hohe Expression von p53 für die Effizienz der Apoptose in *c-jun*^{-/-} Zellen? In Wildtyp Zellen kommt es nach Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien erst zu einer verstärkten Expression von p53. Diese führt zur erhöhten Expression von p21, einem Zielgen von p53, wodurch es zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase kommt. Diese arretierten Zellen sterben jedoch nicht durch Apoptose. Wird p21 ektopisch in Zellen exprimiert, so kann die durch γ Strahlen ausgelöste Apoptoserate reduziert werden (Canman und Kastan, 1998). Im Gegensatz dazu sterben lymphoide Zellen, die keinen G1-Arrest eingehen, vermehrt durch Apoptose (als Übersicht siehe Levine, 1997). Allerdings zeigen myeloide Zellen während ihrer Differenzierung eine reduzierte Apoptoserate, die mit der erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p21 korreliert. In den gleichen Zellen kann durch Serumentzug induzierte Apoptose durch Einbringen von p21 verhindert werden, was ein Hinweis dafür ist, daß p21 eine anti-apoptotische Funktion während der Differenzierung von Myocyten ausübt (Wang und Walsh, 1996). Ähnliche Befunde gibt es über die anti-apoptotische Funktion von p21 in der Differenzierung von Neuroblastom Zellen (Poluha et al., 1996). Die molekularen Grundlagen für diese Funktionen von p21 sind nicht völlig klar, jedoch scheint die inhibitorische Funktion von p21 auf die Zyklin-abhängigen Kinasen von Bedeutung zu sein (Poluha et al., 1996; Wang und Walsh, 1996). Da p21 in den *c-Jun* defizienten Zellen verstärkt exprimiert wird, könnte die reduzierte Apoptoserate nach Behandlung mit MMS durch diese hohen Werte von p21 zustande kommen. Dann müßten Zellen, in denen geringere Mengen p21 exprimiert werden, eine verstärkte Apoptose aufweisen. In der Tat konnte in den *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen, in denen die Mengen an p21 so gering sind, daß sie nicht im Western-Blot detektiert werden können, eine verstärkte Apoptoserate im Vergleich zu den *c-jun*^{-/-} Zellen gemessen werden. Diese Apoptoserate war ähnlich hoch wie in Wildtyp Zellen. Um die Funktionen von p21 in der durch *c-Jun* regulierten Apoptose zu analysieren, müßten Zellen untersucht werden, die weder *c-Jun* noch p21 exprimieren. Mit Hilfe dieser *c-jun*^{-/-} p21^{-/-} Zellen könnte dann überprüft werden, ob die reduzierte Apoptose der *c-jun*^{-/-} Zellen im direkten Zusammenhang mit der erhöhten Expression von p21 steht.

In Wildtyp Fibroblasten korreliert die erhöhte Apoptoserate mit einer verstärkten Aktivität der JNKs. Die Expression der JNKs, vor allem JNK1, ist in *c-jun*^{-/-} Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen reduziert. Bisherige Untersuchungen geben keine Auskunft, ob die Expression der JNKs abhängig von c-Jun reguliert wird. Sowohl JNKs als auch p38 werden durch zellulären Streß wie Hitzeschock, UV-Bestrahlung oder osmotischen Schock aktiviert (Galcheva-Gargova et al., 1994; Kyriakis und Avruch, 1996). Die Aktivierung von p38, die durch Nachweis der Phosphorylierung von p38 untersucht wurde, ist in den *c-jun*^{-/-} Zellen genauso stark wie in Wildtyp Zellen. Die Phosphorylierung der JNKs ist in *c-jun*^{-/-} Zellen geringfügig schwächer als in Wildtyp Zellen. Da jedoch die Proteinnengen der JNKs in *c-jun*^{-/-} Zellen geringer ist, ist die Anzahl der phosphorylierten JNK-Moleküle ebenfalls reduziert. Da p38 und JNKs ko-reguliert werden und die Aktivierung von p38 in Abwesenheit von c-Jun nicht reduziert ist, kann man daraus schließen, daß die JNKs in diesen Zellen mit der gleichen Effizienz wie in Wildtyp Zellen phosphoryliert werden. Allerdings ist die Aktivität der JNKs, die durch *in vitro* Phosphorylierung von GST-c-Jun gemessen wurde, in *c-jun*^{-/-} Zellen deutlich reduziert. Diese deutlich verminderte Aktivität könnte auf geringeren Mengen an JNKs beruhen. Jedoch könnten auch Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Aktivität der JNKs eine wichtige Rolle spielen. Der Zellzyklusinhibitor p21 wurde als Inhibitor der JNKs identifiziert. Die Hemmung beruht auf einer direkten Interaktion von p21 mit JNK (Shim et al., 1996). Die reduzierte Aktivität der JNKs könnte auf der hohen Expression von p21 beruhen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden ist in *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen, in denen die Expression des Inhibitors p21 nicht nachweisbar ist, die Aktivität der JNKs wieder so stark wie in Wildtyp Zellen. Ein weiterer Kandidat für die Hemmung der JNKs ist neben p21 noch JIP („JNK interacting protein“), ein Inhibitor, der mit den JNKs interagiert, sie im Zytoplasma zurückhält und deren Aktivität hemmt (Dickens et al., 1997). Wenn die Aktivität der JNKs durch Wechselwirkungen auf Proteinebene (entweder durch p21 oder JIP) gehemmt wird, dann müßte nach Zerstörung dieser Wechselwirkungen die Aktivität der JNKs in den *c-jun*^{-/-} Zellen verstärkt sein. Da die JNKs die Eigenschaft besitzen, nach Denaturierung sehr effizient zu renaturieren, ist eine Möglichkeit zur Zerstörung dieser Wechselwirkungen das Aufkochen der Proteinextrakte in Anwesenheit von SDS und anschließender Nachweis der JNK Aktivität. Die Zerstörung von Protein-Protein-Wechselwirkungen von c-Jun

defizienten Zellextrakten führt jedoch nicht zu einer verstärkten Aktivität der JNKs. Die Aktivität der JNKs ist nach Aufhebung dieser Wechselwirkungen genauso schwach wie vor der Denaturierung (nicht gezeigt). Die Menge der aktivierten JNKs ist also vor und nach der Denaturierung gleich. Dies läßt den Schluß zu, daß die verminderte Aktivität der JNKs in c-Jun defizienten Zellen nicht auf einer Hemmung durch Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht. Auch ist in der Expression von JIP auf RNA-Ebene kein Unterschied zwischen *c-jun*^{-/-} und Wildtyp Zellen detektierbar. Zudem sind die Mengen der JNKs, die in Kernextrakten gemessen wurden, in c-Jun defizienten Zellen nicht geringer als in Wildtyp Zellen, was darauf schließen läßt, daß die Translokation (vom Zytoplasma in den Kern) der JNKs in beiden Zelltypen ähnlich ist (nicht gezeigt). Zudem war es nicht möglich, eine Interaktion zwischen p21 und JNKs durch Ko-Immunpräzipitation nachzuweisen, da weder p21 noch JNKs nach Immunpräzipitation von JNKs bzw. p21 im nachfolgenden Western-Blot detektiert werden konnte (nicht gezeigt).

Die Signaltransduktionswege, die zur Apoptose führen, sind durch das Fehlen von c-Jun nicht beeinträchtigt. Die Aktivierung von *c-fos*, dessen Aktivierung über die Phosphorylierung von TCF/SRF durch ERK1 und ERK2 reguliert wird, geschieht in *c-jun*^{-/-} Zellen und in Wildtyp Zellen mit gleicher Effizienz. Die Aktivität von ERK1 und ERK2 wird somit von p21 nicht gehemmt. Die Expression von *c-fos* ist in Abwesenheit von c-Jun im Vergleich zum Wildtyp sogar verstärkt, was mit der postulierten Autorepression von c-Fos durch Bindung an den eigenen Promotor übereinstimmt (Treisman, 1995). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um c-Fos/c-Jun Heterodimere, die in c-Jun defizienten Zellen fehlen und somit den *c-fos* Promotor nicht reprimieren können (König et al., 1989; Schönthal et al., 1989). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von p38 und der JNKs durch den Verlust von c-Jun nicht vermindert ist. Diese Befunde lassen darauf schließen, daß die Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von *c-fos* führen, so wie jene, die oberhalb von p38 sowie der JNKs liegen, durch das Fehlen von c-Jun nicht beeinflusst werden.

Die Vermutung liegt nahe, daß die verminderte JNK Aktivität zu einer reduzierten Expression von Komponenten führen kann, die für den Ablauf der Apoptose wichtig sind. Der am besten untersuchte Signalweg, der zum Auslösen der Apoptose führt, ist der des CD95 Rezeptors (auch als APO-1 oder Fas bezeichnet), bei dem sowohl die Aktivität von JNK als auch von AP-1 als wichtig beschrieben ist. Die Bindung des

CD95 Liganden an seinen Rezeptor führt zu einer Trimerisierung und gleichzeitigen Aktivierung des CD95 Rezeptors. Die Signale, die über Proteinwechselwirkungen und spezifischen Protein Domänen, sogenannte „death“-Domänen, weitergeleitet werden, enden in der Spaltung von Kaspasen, die ihrerseits Kaspasen spalten und aktivieren (als Übersicht siehe Nagata, 1997). Da die Expression des CD95 Rezeptors in Wildtyp und c-Jun defizienten Zellen gleich hoch ist, könnte die reduzierte Apoptose auf einer verminderten oder fehlenden Expression des CD95 Liganden beruhen. Die Induktion der Expression des Liganden nach den DNA-schädigenden Agenzien Teniposid und Etoposid wird in T-Lymphocyten abhängig von der Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B gesteuert (Kasibhatla et al., 1998). Da beide Faktoren in den c-Jun defizienten Zellen nur sehr schwach aktivierbar sind, könnte diese fehlende Aktivierung zu einer unzureichenden Expression des CD95 Liganden und somit zu einer reduzierten Apoptose führen. Zusätzlich ist die Aktivität der JNKs ebenfalls in der Expression des CD95 Liganden involviert (Faris et al., 1998). Die Regulation des CD95 Liganden in Fibroblasten durch NF- κ B und AP-1 muß noch geklärt werden. Es kann aber durchaus sein, daß diese Regulation nur ein Beitrag zur Apoptose ist, da durch ektopische Expression des Liganden (durch transiente Transfektion) in Fibroblasten Apoptose ausgelöst werden kann. Allerdings ist diese Apoptoserate in den *c-jun*^{-/-} Fibroblasten viel geringer als in den Wildtyp Zellen (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß durch die verringerte Menge an aktivierten JNK-Molekülen Substrate, die unterschiedlich von c-Jun und ATF2 sind, in reduziertem Umfang phosphoryliert werden. Dadurch kann entweder die Expression von Komponenten oder die Aktivierung des CD95 Signalweges verändert sein (Abb. 40).

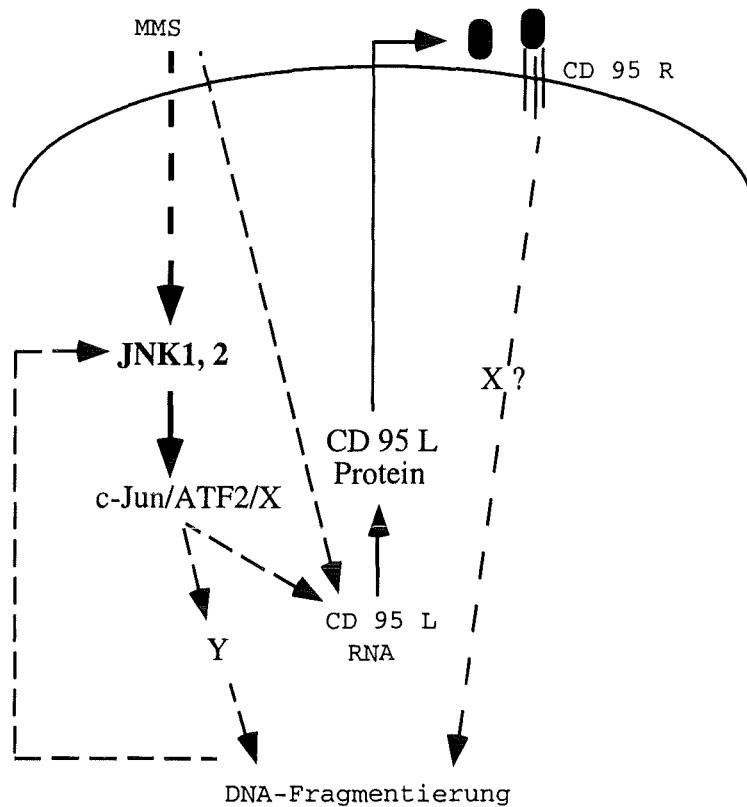


Abb. 40: Modell zur Rolle von c-Jun in der Regulation der Apoptose

Die Notwendigkeit der Aktivität der JNKs im Prozeß der Apoptose ist umstritten. So belegen Studien, daß die Aktivierung der JNKs in der Apoptose, die durch unterschiedliche Agenzien induziert wurde, wichtig ist (Xia et al., 1995; Cahill et al., 1996; Chen et al., 1996b; Verheij et al., 1996; Wilson et al., 1996; Ichijo et al., 1997; Shirakabe et al., 1997; Yang et al., 1997a; Yang et al., 1997b; Deak et al., 1998; Faris et al., 1998; Maroney et al., 1998; Wang et al., 1998). Andererseits lassen Untersuchungen darauf schließen, daß die JNKs nach vielen Stimuli während der Apoptose induziert werden und eher eine Folge als eine Ursache der Apoptose sind (Liu et al., 1996; Khwaja und Downward, 1997; Lenczowski et al., 1997; Natoli et al., 1997; Smith et al., 1997; Rudel et al., 1998). Diese auf den ersten Blick kontroverse Daten beruhen aber auf Untersuchungen von unterschiedlichen Zellsystemen und verschiedenen Induktoren. In dem von mir benutzten System, den Fibroblasten, korreliert die Aktivität der JNKs mit der Apoptoserate nach Behandlung der Zellen mit MMS. Um zu klären, ob die Aktivität der JNKs in Fibroblasten tatsächlich an dem Auslösen der Apoptose beteiligt ist, müßten *c-jun*^{-/-} Zellen mit einem

Expressionsvektor für JNK1 oder JNK2 transfiziert werden und nach Behandlung mit MMS die Apoptoseraten bestimmt werden. Dies könnte Aufschluß darüber geben, ob die reduzierte Aktivität der Jun N-terminalen Kinasen, die durch die Transfektion wieder hergestellt werden kann, für die reduzierte Apoptoserate verantwortlich ist. Alternativ dazu könnten Zellen analysiert werden, in denen durch homologe Rekombination das JNK Gen inaktiviert wurde.

4.2.3. Die reduzierte Kolonienzahl nach Behandlung mit MMS beruht auf einem Block im Zellzyklus

Die reduzierte Apoptoserate und die verringerte Kolonienzahl im Toxizitäts-Test der *c-jun*^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich. Jedoch kommt diese reduzierte Kolonienzahl durch fehlende Proliferation, ausgelöst durch einen G2-Block, zustande. Die Arretierung der Zellen in der G2-Phase (G2-Block) nach MMS-Behandlung, ist in den Wildtyp Zellen im Gegensatz zu den *c-jun*^{-/-} Zellen transient. Sechs Tage nach Behandlung mit MMS zeigten Wildtyp Zellen wieder eine normale Verteilung der Zellen im Zellzyklus, wohingegen die *c-jun*^{-/-} Zellen zu diesem Zeitpunkt wie auch nach neun Tagen immer noch einen Block der Zellen in der G2-Phase aufwiesen. Der Mechanismus für den G2-Block ist noch unklar. Die Expression des 14-3-3 σ -Proteins, das an die Phosphatase cdc25C bindet und dadurch deren Aktivität hemmt, führt zu einem Block in der G2-Phase (Hermeking et al., 1997). Zudem wird dieses Protein abhängig von der Expression von p53 reguliert. Es gibt weitere Hinweise, daß p53 nicht nur zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase sondern auch in der G2-Phase führen kann (Stewart et al., 1995). Erste vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, daß in unbehandelten Wildtyp und *c-jun*^{-/-} Zellen 14-3-3 σ weder auf RNA- noch auf Proteinebene unterschiedlich exprimiert wird. Jedoch könnte die Expression dieses Proteins abhängig von der Behandlung mit MMS in einem engen zeitlichen Fenster während der G2-Phase verstärkt exprimiert werden. Daher kann zur Zeit noch keine klare Aussage getroffen werden. Wenn der G2-Block der Zellen abhängig von der Expression von p53 ist, so sollten Zellen, denen p53 fehlt, diesen G2-Block nicht aufweisen. In der Tat zeigen *c-jun*^{-/-} p53^{-/-} Zellen nach Behandlung mit MMS keinen ausgeprägten G2-Block.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich erstmals experimentell nachweisen, daß c-Jun, eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1, eine spezifische Funktion in der Regulation des Zellzyklus einnimmt. *c-jun*^{-/-} Zellen weisen im Vergleich zu Wildtyp Zellen eine reduzierte Proliferationsrate auf. Diese verminderte Proliferation beruht auf der verstärkten Expression des Tumorsuppressors p53, die zur Induktion des Zellzyklusinhibitors p21, einem Zielgen von p53, führt. Die Zyklin-assoziierten Kinase-Komplexe der G1-Phase werden durch den Inhibitor p21 in ihrer Aktivität gehemmt, was zu einem unzureichenden Übergang von der G1- in die S-Phase führt. Dadurch ist die Proliferation vermindert. All diese Prozesse, wie die verstärkte Expression von p21, die zu einer verringerten Aktivität von Zyklin-abhängigen Kinasen führt, die in einem verringerten Übergang von der G1- in die S-Phase enden, können durch das Inaktivieren von p53 ausgeschaltet werden. Hier wurde zum ersten Mal eine Verknüpfung von Signaltransduktionskaskaden, die durch Aktivierung der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren ausgelöst und deren Signale in den Kern übertragen werden, wo sie in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren enden, und der Zellzyklusregulation aufgezeigt. Zudem wurde ein neuer Mechanismus für die Regulation von p53 beschrieben, wobei das nächste Ziel nun die Aufklärung des molekularen Mechanismus der negativen Wirkung von c-Jun auf die Transkription von p53 ist.

c-jun^{-/-} Zellen sind hypersensitiv gegenüber MMS, wodurch ich den postulierten Schutzmechanismus, der durch die verstärkte Induktion von c-Jun induziert wird, bestätigen konnte. Zudem bestätigen die Analysen der c-Jun defizienten Zellen, daß c-Jun eine wichtige Rolle beim Ablauf des Apoptoseprogramms spielt. Das Fehlen von c-Jun führt zu einer reduzierten Apoptose, bei der Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) einen wichtigen Beitrag leisten können. Durch das Einsetzen von Inhibitoren wie Z-VAD, der die Kaspasen im CD95 Signalweg hemmt, kann man mehr Klarheit gewinnen, ob die Induktion des CD95 Signalweges in der Apoptose, die in Fibroblasten durch MMS ausgelöst wird, involviert ist. Die Beeinträchtigung der Aktivität der JNKs, kann deren Beteiligung in der Apoptose der Fibroblasten weiter erhärten.

In der vorliegenden Arbeit wurden sehr vielversprechende Zellsysteme etabliert und charakterisiert, in denen man jetzt durch Wiedereinbringen von spezifischen Jun-Mutanten die AP-1 abhängigen Genprogramme aufklären kann, die für Proliferation,

Apoptose und zellulären Schutzmechanismus gegen MMS wichtig sind. Zudem hat man jetzt auch die Werkzeuge in der Hand, um kritische Zielgene, die kausal an diesen Prozessen beteiligt sind, isolieren und charakterisieren zu können.

5. Literatur

- Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B. and Stark, G. R. (1998). The p53 network. *J. Biol. Chem.* 273, 1-4.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2256-2266.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. and Karin, M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875-885.
- Angel, P. and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-157.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J. and Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3094-3102.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7, 812-821.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1997). The retinoblastoma pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell Res.* 237, 1-6.
- Beg, A. A. and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Benbrook, D. M. and Jones, N. C. (1990). Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 5, 295-302.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscott, S. J., Weintraub, H. and Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* 68, 507-519.
- Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C. M., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L. and Yuan, J. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.* 12, 1304-1314.
- Bertin, J., Mendrysa, S. M., LaCount, D. J., Gaur, S., Krebs, J. F., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J. and Friesen, P. D. (1996). Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J. Virol.* 70, 6251-6259.
- Bossy Wetzels, E., Bakiri, L. and Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* 16, 1695-1709.

- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M. and Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573-584.
- Brown, J. R., Ye, H., Bronson, R. T., Dikkes, P. and Greenberg, M. E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* 86, 297-309.
- Bruesselbach, S., Moehle-Steinlein, U., Wang, Z.-Q., Schreiber, M., Lucibello, F. C., Müller, R. and Wagner, E. F. (1995). Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene* 10, 79-86.
- Buckbinder, L., Talbott, R., Valesco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R. and Kley, N. (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377, 646-649.
- Caelles, C., Helmborg, A. and Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220-223.
- Cahill, M. A., Peter, M. E., Kischkel, F. C., Chinnaiyan, A. M., Dixit, V. M., Krammer, P. H. and Nordheim, A. (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene* 13, 2087-2096.
- Canman, C. E. and Kastan, M. B. (1998). Small contribution of G1 checkpoint control manipulation to modulation of p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 16, 957-966.
- Cano, E. and Mahadevan, L. C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122.
- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X. and Karin, M. (1995). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* 14, 5957-5964.
- Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. and Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386-388.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. and Prives, C. (1996a). p53 levels, functional domains and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 10, 2438-2451.
- Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J. and Tan, T. H. (1996b). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* 271, 31929-31936.
- Chida, K. and Vogt, P. K. (1992). Nuclear translocation of viral Jun but not of cellular Jun is cell cycle dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4290-4294.
- Chiu, R., Angel, P. and Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from and is a negative regulator of, cJun. *Cell* 59, 979-986.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. and Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol/chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

- Chou, S. Y., Baichwal, V. and Ferrell, J. E., Jr. (1992). Inhibition of c-Jun DNA binding by mitogen-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell* 3, 1117-1130.
- Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L. and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849-852.
- Cohen, J. J. (1993). Apoptosis. *Immunol. Today* 14, 126-130.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H. and Reid, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267, 1353-1356.
- De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O. and Kim, S. H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.
- de Groot, R. P. and Kruijer, W. (1991). Up-regulation of Jun/AP-1 during differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells. *Cell. Growth Differ.* 2, 631-636.
- Deak, J. C., Cross, J. V., Lewis, L., Yongyi, Q., Parrott, L. A., Distelhorst, C. W. and Templeton, D. J. (1998). Fas-induced proteolytic and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5595-5600.
- Debbas, M. and White, E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 7, 546-554.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T. and Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71, 1081-1091.
- Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K. and Yamamoto, K. R. (1990). Transcription factor interactions: Selectors for positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249, 1266-1272.
- Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L. and Davis, R. J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277, 693-696.
- Dorsey, M. J., Tae, H. J., Sollenberger, K. G., Mascarenhas, N. T., Johansen, L. M. and Taparowsky, E. J. (1995). B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* 11, 2255-2265.
- Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A. and Weinberg, R. A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73, 499-511.

- Downward, J. (1997). Cell cycle: routine role for Ras. *Curr. Biol.* 7, R258-R260.
- Dulic, V., Lees, E. and Reed, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958-1961.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Estus, S., Zaks, W. J., Freeman, R. S., Gruda, M., Bravo, R. and Johnson, E. M., Jr. (1994). Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell. Biol.* 127, 1717-1727.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J. and Livingston, D. M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497.
- Faris, M., Kokot, N., Latinis, K., Kasibhatla, S., Green, D. R., Koretzky, G. A. and Nel, A. (1998). The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J. Immunol.* 160, 134-144.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M. and Beug, H. (1996). The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J. Cell. Biol.* 132, 1115-1132.
- Filmus, J., Robles, A. I., Shi, W., Wong, M. J., Colombo, L. L. and Conti, C. J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627-3633.
- Fisher, R. P. and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Saboutry, S., Dani, C., Jeanteur, P. and Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-1442.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. and Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744-1747.
- Gack, S., Vallon, R., Schaper, J., Ruther, U. and Angel, P. (1994). Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. Regulation of mouse metalloproteinases by carcinogens, tumor promoters, cAMP and Fos oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 269, 10363-10369.
- Gagliardini, V., Fernandez, P. A., Lee, R. K., Drexler, H. C., Rotello, R. J., Fishman, M. C. and Yuan, J. (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* 263, 826-828.
- Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I. H. and Davis, R. J. (1994). An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 265, 806-808.

- Ginsberg, D., Oren, M., Yaniv, M. and Piette, J. (1990). Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* 5, 1285-1290.
- Grana, X. and Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11, 211-219.
- Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2424-2428.
- Greenhalgh, D. A., Wang, X. J., Eckhardt, J. N. and Roop, D. R. (1995). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promotion of transgenic mice expressing epidermal-targeted v-fos induces rasHA-activated papillomas and carcinomas without p53 mutation: association of v-fos expression with promotion and tumor autonomy. *Cell. Growth Differ.* 6, 579-586.
- Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H. A. and Wagner, E. F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266, 443-448.
- Gruda, M. C., van Amsterdam, J., Rizzo, C. A., Durham, S. K., Lira, S. and Bravo, R. (1996). Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. *Oncogene* 12, 2177-2185.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. and Davis, R. J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.
- Hai, T. A. and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3720-3724.
- Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C. M., Lallemand, D., Yaniv, M. and Rubin, L. L. (1995). A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14, 927-939.
- Hansen, R. and Oren, M. (1997). p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 46-51.
- Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 56-64.
- Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H. and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 9, 2170-2183.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M. and Muller, R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9, 1295-1304.

- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1, 3-11.
- Herr, I., Van Dam, H. and Angel, P. (1994). Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis* 15, 1105-1113.
- Herrlich, P., Ponta, H. and Rahmsdorf, H. J. (1992). DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. of Physiol. Biochem. Pharmacol.* 119, 187-223.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135-2148.
- Hicks, G. G., Egan, S. E., Greenberg, A. H. and Mowat, M. (1991). Mutant p53 tumor suppressor alleles release ras-induced cell cycle growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1344-1352.
- Hilberg, F. and Wagner, E. F. (1992). Embryonic stem (ES) cells lacking functional c-jun: consequences for growth and differentiation, AP-1 activity and tumorigenicity. *Oncogene* 7, 2371-2380.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. and Wagner, E. F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 179-181.
- Hinds, P., Finlay, C. and Levine, A. J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 63, 739-746.
- Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mechta, F., Bravo, R. and Yaniv, M. (1989a). Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* 8, 1433-1439.
- Hirai, S., Mechta, F., Bourachot, B., Piette, J., Reyseck, R. P., Bravo, R. and Yaniv, M. (1989b). In: *Vector as tools for the study of normal and abnormal growth and differentiation*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg 355-372.
- Holbrook, N. J. and Fornace, A. J., Jr. (1991). Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New. Biol.* 3, 825-833.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith Sorensen, B., Montesano, R. and Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22, 3551-3555.
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R. and Harris, C. C. (1996). Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.* 24, 141-146.
- Howcroft, T. K., Richardson, J. C. and Singer, D. S. (1993). MHC class I gene expression is negatively regulated by the proto-oncogene, c-jun. *EMBO J.* 12, 3163-3169.
- Hsu, J. C., Laz, T., Mohn, K. L. and Taub, R. (1991). Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3511-3515.

- Hueber, A. O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S. and Evan, G. I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 278, 1305-1309.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.
- Ivashkiv, L. B., Liou, H. C., Kara, C. J., Lamph, W. W., Verma, I. M. and Glimcher, L. H. (1990). mXBP/CRE-BP2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1609-1621.
- Jacobs-Helber, S. M., Wickrema, A., Birrer, M. J. and Sawyer, S. T. (1998). AP-1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3699-3707.
- Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. and Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71, 577-586.
- Johnson, R. S., van Lingen, B., Papaioannou, V. E. and Spiegelman, B. M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* 7, 1309-1317.
- Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D. and Wisdom, R. (1996). Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4504-4511.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M. and Karin, M. (1996). c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.
- Karin, M. (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6, 415-424.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 16483-16486.
- Karin, M. and Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 240-246.
- Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R. (1998). DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappaB and AP-1. *Mol. Cell* 1, 543-551.
- Khwaja, A. and Downward, J. (1997). Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 139, 1017-1023.

- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* *14*, 5579-5588.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. and Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* *15*, 5314-5325.
- Ko, L. J. and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* *10*, 1054-1072.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza, B. R. and Roberts, J. M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* *257*, 1689-1694.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P. (1989). Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* *8*, 2559-2566.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P. (1992). Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J.* *11*, 2241-2246.
- Kouzarides, T. and Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* *336*, 646-651.
- Kovary, K. and Bravo, R. (1991). The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 4466-4472.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299-303.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* *369*, 156-160.
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* *271*, 24313-24316.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* *240*, 1759-1764.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* *81*, 1013-1020.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. and Tijan, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* *325*, 368-372.

- Lee, W., Mitchell, P. and Tijan, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49, 741-752.
- Lenczowski, J. M., Dominguez, L., Eder, A. M., King, L. B., Zacharchuk, C. M. and Ashwell, J. D. (1997). Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 170-181.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. (1998). Signaling transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139.
- Li, L., Chambard, J. C., Karin, M. and Olson, E. N. (1992). Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression. *Genes Dev.* 6, 676-689.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., al Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. and Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* 70, 777-789.
- Lin, J., Wu, X., Chen, J., Chang, A. and Levine, A. J. (1994). Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59, 215-223.
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V. and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.
- Lloyd, A., Yancheva, N. and Wasylyk, B. (1991). Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain. *Nature* 352, 635-638.
- Lord, K. A., Abdollahi, A., Hoffman Liebermann, B. and Liebermann, D. A. (1993). Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 841-851.
- Lowe, S. W. and Ruley, H. E. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 7, 535-545.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A. and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luo, Y., Hurwitz, J. and Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159-161.
- Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation and DNA damage. *Genes Dev.* 9, 935-944.
- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G. and Haber, D. A. (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 9, 2143-2156.
- Maltzman, W. and Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1689-1694.

- Maroney, A. C., Glicksman, M. A., Basma, A. N., Walton, K. M., Knight, E. J., Murphy, C. A., Barlett, B. A., Finn, J. P., Angeles, T., Matsuda, Y., Neff, N. T. and Dionne, C. A. (1998). Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signalling pathway. *J. Neurosci.* *18*, 104-111.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* *80*, 179-185.
- Matsui, M., Tokuhara, M., Konuma, Y., Nomura, N. and Ishizaki, R. (1990). Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* *5*, 249-255.
- Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK}-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* *71*, 323-334.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. and Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2066-2076.
- Meyerson, M. and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2077-2086.
- Minden, A. and Karin, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1333*, F85-F104.
- Miner, J. N. and Yamamoto, K. R. (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev.* *6*,
- Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293-299.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* *374*, 131-134.
- Morgenbesser, S. D., Williams, B. O., Jacks, T. and DePinho, R. A. (1994). p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* *371*, 72-74.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F. and Deppert, W. (1995). Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* *14*, 4442-4449.
- Murphy, C., Nikodem, D., Howcroft, K., Weissman, J. D. and Singer, D. S. (1996). Active repression of major histocompatibility complex class I genes in a human neuroblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* *271*, 30992-30999.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* *88*, 355-365.
- Nakanishi, M., Robetorye, R. S., Adami, G. R., Pereira Smith, O. M. and Smith, J. R. (1995). Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21^{Sdi1}/CIP1/WAF1. *EMBO J.* *14*, 555-563.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D. J., Woodgett, J. R., Balsano, C. and Levvero, M. (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* *275*, 200-203.
- Nevins, J. R., Chellappan, S. P., Mudryj, M., Hiebert, S., Devoto, S., Horowitz, J., Hunter, T. and Pines, J. (1991). E2F transcription factor is a target for the RB protein and the cyclin A protein. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *56*, 157-162 Issn: 0091-7451.

- Nishina, H., Fischer, K. D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E. A., Bernstein, A., Mak, T. W., Woodgett, J. R. and Penninger, J. M. (1997). Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 385, 350-353.
- Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T. and Kawai, S. (1989). v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7711-7715.
- Ohtsubo, M. and Roberts, J. M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-12.
- Oshima, R. G., Abrams, L. and Kulesh, D. (1990). Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev.* 4, 835-848.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, V., Ansorge, W., Bartek, J. and Draetta, G. (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 121, 101-111.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.
- Patel, H. R. and Sytkowski, A. J. (1995). Erythropoietin activation of AP1 (Fos/Jun). *Exp. Hematol.* 23, 619-625.
- Pfarr, C. M., Mehta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S. and Yaniv, M. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* 76, 747-760.
- Poluha, W., Poluha, D. K., Chang, B., Crosbie, N. E., Schonhoff, C. M., Kilpatrick, D. L. and Ross, A. H. (1996). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1) is required for survival of differentiating neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1335-1341.
- Polyak, K., Waldman, T., He, T. C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996). Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 10, 1945-1952.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar Sagi, D., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7, 1559-1571.
- Rahmsdorf, H. J., Schonthal, A., Angel, P., Litfin, M., Ruther, U. and Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 15, 1643-59.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. and Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420-6.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S. and Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.

- Reichardt, H. M., Kaestner, K. H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. and Schuetz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.
- Reimold, A. M., Grusby, M. J., Kosares, B., Fires, J. W. U., Mori, R., Maniwa, S., Clauss, I. M., Collins, T., Sidman, R. L., Glimcher, M. J. and Glimcher, L. H. (1993). Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature* 262-265.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. and Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1669-1679.
- Riabowol, K., Schiff, J. and Gilman, M. Z. (1992). Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 157-161.
- Rickles, R. J., Darrow, A. L. and Strickland, S. (1989). Differentiation-responsive elements in the 5' region of the mouse tissue plasminogen activator gene confer two-stage regulation by retinoic acid and cyclic AMP in teratocarcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1691-1704.
- Robinson, M. J. and Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- Roffler Tarlov, S., Brown, J. J., Tarlov, E., Stolarov, J., Chapman, D. L., Alexiou, M. and Papaioannou, V. E. (1996). Programmed cell death in the absence of c-Fos and c-Jun. *Development* 122, 1-9.
- Rosette, C. and Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274, 1194-1197.
- Rouvier, E., Luciani, M. F. and Golstein, P. (1993). Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177, 195-200.
- Rudel, T., Zenke, F. T., Chuang, T. H. and Bokoch, G. M. (1998). p21-activated kinase (PAK) is required for Fas induced JNK activation in Jurkat cells. *J. Immunol.* 160, 7-11.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez Albuerno, E. and Nathans, D. (1989). jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1500-1503.
- Ryseck, R. P., Hirai, S. I., Yaniv, M. and Bravo, R. (1988). Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 334, 535-537.
- Sabapathy, K., Klemm, M., Jaenisch, R. and Wagner, E. F. (1997). Regulation of ES cell differentiation by functional and conformational modulation of p53. *EMBO J.* 16, 6217-6229.
- Sachsenmaier, C., Radler Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* 78, 963-972.
- Sassone Corsi, P., Der, C. J. and Verma, I. M. (1989). ras-induced neuronal differentiation of PC12 cells: possible involvement of fos and jun. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3174-3183.

- Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsvan, L. A., Rudkin, B. B. and Samarut, J. (1996). Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 12, 309-322.
- Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Ishikura, H., Umehara, H. and et al. (1995). Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27326-27331.
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. and Ponta, H. (1988). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54, 325-334.
- Schönthal, A., Büscher, M., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M. and Herrlich, P. (1989). The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* 4, 629-636.
- Schorpp-Kistner, M., Wang, Z. Q., Angel, P. and Wagner, E. F. (1998). JunB is essential mammalian placentation. (submitted)
- Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. and Wagner, E. F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* 14, 5338-5349.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Tian, F., Möhle-Steinlein, U., Karin, M., Angel, P. and Wagner, E. F. (1998). p53-dependent functions of c-Jun in cell proliferation, cell cycle progression, and immortalisation. (submitted)
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M. and Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.
- Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M. and Tsuruo, T. (1997). c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1beta converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 4631-4636.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149-1163.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Shim, J., Lee, H., Park, J., Kim, H. and Choi, E. J. (1996). A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 381, 804-806.
- Shimizu, R., Komatsu, N., Nakamura, Y., Nakauchi, H., Nakabeppu, Y. and Miura, Y. (1996). Role of c-jun in the inhibition of erythropoietin receptor-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 1-6.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 8141-8144.

- Smeal, T., Angel, P., Meek, J. and 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. and Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354, 494-496.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Grover Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U. R. and Karin, M. (1992). Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3507-3513.
- Smeal, T., Hibi, M. and Karin, M. (1994). Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J.* 13, 6006-6010.
- Smith, A., Ramos-Morales, F., Ashworth, A. and Collins, M. (1997). A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells. *Curr. Biol.* 7, 893-896.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988). Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Smith, M. J. and Prochownik, E. V. (1992). Inhibition of c-jun causes reversible proliferative arrest and withdrawal from the cell cycle. *Blood* 79, 2107-2115.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. and Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5169-5181.
- Stein, B., Baldwin, A. S., Jr., Ballard, D. W., Greene, W. C., Angel, P. and Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* 12, 3879-3891.
- Stewart, N., Hicks, G. G., Paraskevas, F. and Mowat, M. (1995). Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10, 109-115.
- Su, H. Y., Bos, T. J., Monteclaro, F. S. and Vogt, P. K. (1991). Jun inhibits myogenic differentiation. *Oncogene* 6, 1759-1766.
- Swaroop, A., Xu, J. Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C. and Agarwal, N. (1992). A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 266-270.
- Szabo, E., Preis, L. H. and Birrer, M. J. (1994). Constitutive cJun expression induces partial macrophage differentiation in U-937 cells. *Cell. Growth Differ.* 5, 439-446.
- Teurich, S. and Angel, P. (1995). The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem. Senses* 20, 251-255.
- Thanos, D. and Maniatis, T. (1992). The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* 71, 777-789.
- Todaro, G. J. and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.* 17, 299-313.

- Treier, M., Staszewski, L. M. and Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78, 787-798.
- Treisman, R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J.* 14, 4905-4913.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.
- Tsai, L. H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E. and Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* 8, 1593-1602.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. and Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787-789.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. and van der Eb, A. J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 12, 479-487.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. and Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* 14, 1798-1811.
- van Dam, H., Huguier, S., Kooistra, K., Baquet, J., Vial, E., van der Eb, A. J., Herrlich, P., Angel, P. and Castalzzi, M. (1998). Autocrine growth and anchorage independence: two complementing Jun-controlled genetic programs of cellular transformation. *Genes Dev.* 12, 1227-1239.
- van den Heuvel, S. and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262, 2050-2054.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitz-Friedmann, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R. N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.
- Vogt, P. K. and Bos, T. J. (1990). jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* 55, 1-35.
- Wagner, A. J., Kokontis, J. M. and Hay, N. (1994). Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev.* 8, 2817-2830.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W. and Baldwin, A. S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787.
- Wang, J. and Walsh, K. (1996). Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273, 359-361.
- Wang, X., Martinidale, L., Liu, Y. and Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influence of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* 333, 291-300.

- Wang, Z. Q., Liang, J., Schellander, K., Wagner, E. F. and Grigoriadis, A. E. (1995). c-fos-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with c-jun and the role of endogenous c-fos. *Cancer Res.* 55, 6244-6251.
- Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Moehle Steinlein, U., Ruther, U. and Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360, 741-745.
- Weaver, V. M., Lach, B., Walker, P. R. and Sikorska, M. (1993). Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem. Cell Biol.* 71, 488-500.
- Wegner, A., Gartner, K. and Ziegler, D. (1989). DNA excision-repair ability of embryonic fibroblasts measured by UDS and thymine dimer excorporation in four inbred mice strains. *J. Photochem. Photobiol. B.* 4, 75-84.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Wilson, D. J., Fortner, K. A., Lynch, D. H., Mattingly, R. R., Macara, I. G., Posada, J. A. and Budd, R. C. (1996). JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 989-994.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W. and Mak, T. W. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12, 806-819.
- Wood, K. W., Qi, H., D'Arcangelo, G., Armstrong, R. C., Roberts, T. M. and Halegoua, S. (1993). The cytoplasmic raf oncogene induces a neuronal phenotype in PC12 cells: a potential role for cellular raf kinases in neuronal growth factor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5016-5020.
- Wu, B. Y., Fodor, E. J., Edwards, R. H. and Rutter, W. J. (1989). Nerve growth factor induces the proto-oncogene c-jun in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 9000-9003.
- Wu, M., Lee, H., Bellas, R. E., Schauer, S. L., Arsur, M., Katz, D., FitzGerald, M. J., Rothstein, T. L., Sherr, D. H. and Sonenshein, G. E. (1996). Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 15, 4682-4690.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Yang, D. D., Kuan, C. Y., Whitmarsh, A. J., Rincon, M., Zheng, T. S., Davis, R. J., Rakic, P. and Flavell, R. A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389, 865-870.
- Yang, X., Khosravi Far, R., Chang, H. Y. and Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
- Yang Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. and Karin, M. (1990a). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.

-
- Yang Yen, H. F., Chiu, R. and Karin, M. (1990b). Elevation of AP1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New Biol.* 2, 351-361.
- Yonish Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.
- Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R. P., Schuermann, M., Muller, R. and 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.
- Ziff, E. B. (1990). Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet.* 6, 69-72.