

KfK 4751  
Juni 1990

**Mechanismus der UV-  
induzierten Expression  
des menschlichen  
Immunschwäche-Virus Typ I,  
der Collagenase und des  
Protoonkogens *c-jun***

B. Stein  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



**Kernforschungszentrum Karlsruhe**

**Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen**

**KfK 4751**

**Mechanismus der UV-induzierten Expression des  
menschlichen Immunschwäche-Virus Typ I, der  
Collagenase und des Protoonkogens *c-jun***

**Bernd Stein**

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

**Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe**

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

*für A.*

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen im Kernforschungszentrum Karlsruhe durchgeführt. Während der drei Jahre meiner Arbeit wurde ich durch ein Doktoranden-Stipendium des Kernforschungszentrum Karlsruhe unterstützt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Anja Steffen für ihre exzellente und engagierte Unterstützung bei der experimentellen Arbeit. Sie hat durch ihren Fleiß und akkurate Durchführung der Experimente zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Peter Herrlich, Prof. Dr. Helmut Ponta und Prof. Dr. Hans J. Rahmsdorf danke ich für konstruktive Kritik und für wertvolle Diskussionen der Ergebnisse meiner Arbeit. Peter Angel und Anja Steffen danke ich für kritisches Lesen der Arbeit. Für die Bereitstellung von Plasmid-Konstrukten danke ich Peter Angel, Daniel Capon, Carsten Jonat, Michael Karin, Gary Nabel, Rienk Offringa, Kun-Koo Park, Axel Schönthal. Mein Dank gilt auch Ulrike Wagner für die Synthese der Oligonukleotide. Stephan Gebel und Wilfried Kugler danke ich dafür, daß sie mir DNA-Affinitätssäulen zur Verfügung gestellt haben. Ich danke weiterhin Patrick Baeuerle für die Zusendung von gereinigtem NF- $\kappa$ B, Peter Angel für bakteriell exprimiertes Jun und Rolf Müller für Fos. Hans J. Rahmsdorf und Axel Schönthal danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern.

Stephan Gebel, Marcus Krämer und Volker Heußler danke ich, neben Anja Steffen, für ihre Hilfsbereitschaft im Labor. Weiterhin danke ich allen ungenannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen und der Abteilung Reprographie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



## Zusammenfassung

Ultraviolette Strahlung (UV) führt in Säugetier-Zellen zu einer Reihe von genetischen Veränderungen, die UV-Antwort genannt werden. Neben einer Vermehrung von Genen (Amplifikation) kommt es auch zu einer veränderten Expression einer Reihe von Genen. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der UV-induzierten Genexpression charakterisiert. Als Beispiel für diese Untersuchungen diente das menschliche Immunschwäche-Virus Typ I (HIV-1), das menschliche Collagenase Gen und das Protoonkogen *c-jun*. Die Signalkette in der Aktivierung von Genen durch UV beginnt mit der Absorption von UV durch die DNA. Die dabei entstehenden DNA-Schäden, die auch durch andere DNA-schädigende Agenzien erzeugt werden können, sind das primäre Ereignis für die Auslösung einer Signalkette, deren Endpunkt die UV-induzierbaren Gene sind. Die *cis*-wirkende DNA-Elemente (UREs), die für die transkriptionelle Aktivierung der UV-induzierbaren Gene nötig sind, konnten identifiziert werden. Diese Elemente sind auch Endpunkte anderer Signalketten wie z. B. bei der Induktion durch Phorbolster oder Wachstumsfaktoren. Die UREs von HIV-1 (Position -105/-79), Collagenase (Position -73/-65) und *c-jun* (Position -191/-182 und -72/-63) sind in ihrer Sequenz verschieden und binden verschiedene Transkriptionsfaktoren. NF- $\kappa$ B bildet zusammen mit cJun oder cFos den Transkriptionsfaktor-Komplex am HIV-1-URE. AP-1 (cJun/cFos) bindet an das Collagenase-URE, und die zwei *c-jun* UREs binden Proteinkomplexe aus der AP-1 Familie, die nicht identisch mit cJun/cFos sind, aber auch cFos enthalten. Die DNA-Bindeaktivitäten dieser Faktoren sind in Extrakten aus UV-behandelten Zellen erhöht. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt im Cytoplasma durch Ablösung von einem Inhibitorprotein. Zumindest für die Aktivierung von HIV-1 muß also die Signalkette über das Cytoplasma verlaufen. Die Aktivierung der anderen Transkriptionsfaktoren erfolgt durch post-translationelle Modifizierung und Neusynthese. Weiterhin konnte ein Faktor in Medium von UV-bestrahlten Zellen (EPIF) nachgewiesen werden, der die hier erwähnten Gene über die UREs in unbestrahlten Zellen aktiviert. Da EPIF nicht zelltyp-spezifisch wirkt, könnte er, abgegeben von UV-bestrahlten Zellen der Haut, jede Zelle im Innern des Organismus erreichen und dort Gene aktivieren. Die hier verwendeten UV-Dosen werden in der Natur nach längerer Sonnenbestrahlung erhalten. Der hier charakterisierte Mechanismus der UV-induzierten Genexpression könnte daher, insbesondere für die Aktivierung von HIV-1 und den natürlichen Verlauf von AIDS, eine wichtige biologische Bedeutung haben.

## Abstract

### **Mechanism of UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase and protooncogene *c-jun***

Ultraviolet radiation (UV) leads to a number of genetic changes in mammalian cells which are named UV response. These changes include gene amplification and the altered expression of various genes. This work will characterize the mechanism of UV-induced gene expression. As examples, the human immunodeficiency virus type I (HIV-1), the human collagenase gene and the protooncogene *c-jun* were chosen. The signal chain in the activation of genes by UV starts with the absorption of UV by DNA and ends at the UV-inducible genes. The primary event in the UV induction process is DNA damage, which can also be caused by other DNA-damaging agents. The cis-acting elements in the UV-responsive genes (UREs) which mediate the transcriptional activation by UV were identified. These UREs are also endpoints of other signal pathways activated by phorbol esters or growth factors. The UREs of HIV-1 (position -105/-79), collagenase (position -73/-65) and *c-jun* (position -191/-182 and -72/-63) have different sequences and bind different transcription factors. NF- $\kappa$ B together with cJun or cFos forms the transcription factor complex at the HIV-1 URE. AP-1 (cJun/cFos) binds to the collagenase URE and the two *c-jun* UREs bind factors of the AP-1 family, which are different from cJun/cFos but also contain cFos. The DNA-binding activities of these factors are increased in extracts from UV-irradiated cells. NF- $\kappa$ B is activated in the cytoplasm by release from an inhibitor. At least for the activation of HIV-1 by UV, the signal pathway must pass through the cytoplasm. The other transcription factors are activated by post-translational modification and new synthesis. In addition, a factor could be detected in medium from UV-irradiated cells (EPIF), which activates the genes described above in nonirradiated cells through the UREs. Since EPIF does not act cell type-specific, there exists the possibility that EPIF released from UV-irradiated skin cells can reach every cell of the body and activate genes there. The UV doses used for the experiments here could be obtained after longer exposure to sun. Therefore the described mechanism of gene activation may be of biological importance, especially for activation of HIV-1 and the natural course of AIDS.

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	V
EINLEITUNG .....	1
MATERIALIEN UND METHODEN.....	7
Bezugsquellen.....	7
Bakterien und Zellen .....	9
Kulturmedien.....	10
Antikörper.....	11
Plasmid-Konstruktionen.....	11
Oligonukleotide .....	15
UV-Bestrahlungsquellen.....	16
METHODEN	
1. Behandlung von Nukleinsäuren .....	17
Spektrophotometrische Konzentrations-Bestimmung von Nukleinsäuren .....	17
Phenol/Chloroform-Extraktion .....	17
Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....	17
2. DNA-Präparation.....	18
Bakterien-Wachstum und Amplifikation.....	18
Plasmid-DNA-Präparation .....	18
Mini-Plasmid-DNA-Präparation.....	19
3. Klonierungstechniken.....	19
Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen .....	19
Dephosphorylierung von DNA.....	20
Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern.....	20
Auffüllen von 5' Überhängen.....	20
<i>Bal31</i> Exonuklease-Verdau .....	21
Ligation von DNA-Fragmenten .....	21
4. Markierung von DNA mit Radionukleotiden.....	21
Kinasierung von DNA.....	21
Auffüllen von 5' Überhängen mit $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dNTPs.....	22
Nick-Translation.....	22
Gelfiltration über Biogel® P60 .....	22

5. DNA-Gelelektrophorese .....	23
Agarose-Gelelektrophorese .....	23
Acrylamid-Gelelektrophorese .....	23
Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele .....	24
6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	25
7. Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten .....	25
Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	25
Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Acrylamid-Gelen .....	26
Extraktion und Reinigung von Oligonukleotiden .....	26
8. Sequenzierung von DNA .....	27
9. Transformation von Bakterien .....	27
Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation .....	27
Transformation von kompetenten Bakterien .....	28
Herstellung von Selektiv-Agarplatten .....	28
10. RNA-Präparation .....	29
PolyA <sup>+</sup> -RNA-Präparation .....	29
Gesamt-RNA-Präparation .....	29
11. Northern-Blot und Hybridisierung .....	30
12. SP6-Polymerase-Kartierung .....	31
13. Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen .....	32
14. Transiente Transfektion und Behandlung von Zellen mit Induktoren .....	33
DEAE-Dextran-Methode .....	33
DEAE-Dextran-Methode für Lymphocyten .....	33
CaPO <sub>4</sub> -Methode .....	34
15. CAT-Assay .....	34
16. Extrakt-Präparation aus eukaryontischen Zellen .....	36
Gesamtzell-Extrakte .....	36
Kern-Extrakte .....	36
17. Konzentration einer Proteinlösung .....	37

18. Proteingele.....	37
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	37
Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen .....	38
Silber-Färbung von Proteingelen.....	38
19. Überexpression von Proteinen in Bakterien und Präparation der Fusionsproteine.....	39
20. <sup>35</sup> S-Markierung von Proteinen.....	40
21. Immunpräzipitation .....	40
22. Proteinbindung an DNA, <i>in-vitro</i> .....	41
DNA-Affinitätschromatographie.....	41
"Bandshift"-Analysen.....	41
"UV-Crosslink" von Proteinen mit DNA.....	42
<b>ERGEBNISSE</b> .....	43
1. DNA-Schaden als Zwischenprodukt in der Aktivierung von Genen durch UV .....	43
Aktionsspektrum der UV-induzierten Genexpression .....	43
Dosis-Effektkurven der Genexpression in Zellen mit einem DNA- Reparaturdefekt.....	45
2. Transkriptionelle Regulation der UV-aktivierbaren Gene .....	47
3. Identifizierung unterschiedlicher UREs in HIV-1, Collagenase und <i>c-jun</i> .....	51
Das URE von HIV-1 ist der HIV-1-Enhancer.....	51
Das URE der Collagenase ist der Enhancer .....	54
Der <i>c-jun</i> Promoter enthält zwei UREs .....	56
4. Verschiedene Transkriptionsfaktoren vermitteln die UV-induzierte Genexpression .	59
HIV-1 .....	60
Collagenase .....	62
<i>c-jun</i> .....	62
5. Erhöhung der Bindungsaktivität an den verschiedenen UREs nach UV- oder Phorbolster-Behandlung .....	63
6. An das Collagenase-URE bindet ein cJun/cJun-Homodimer und cJun/cFos-Heterodimer .....	65
7. Von cJun/cFos verschiedene Faktoren aus der AP-1 Familie binden an die UREs von <i>c-jun</i> .....	69
Verarmung von Extrakten über DNA-Affinitätssäulen.....	69

Bakteriell exprimiertes cJun/Fos bindet mit größter Affinität an den Collagenase-Enhancer.....	71
Zelltypspezifische Regulation von Faktoren der AP-1 Familie.....	71
Die Faktoren am Collagenase-, <i>c-jun</i> - und Fibronectin-Enhancer unterscheiden sich in ihrer Sensitivität gegenüber Proteinkinasen <i>in-vivo</i> und Dephosphorylierung <i>in-vitro</i> .....	72
Antikörper gegen Jun hemmen nur die Bindung von Proteinen am Collagenase-URE, Antikörper gegen Fos dagegen an allen UREs.....	75
Unterschiedliche <i>in-vivo</i> Aktivität der UREs.....	76
8. An den HIV-1-Enhancer bindet ein Komplex aus NF- $\kappa$ B mit cJun und cFos.....	77
Fos und Jun sind für die transkriptionelle Regulation des HIV-1-Enhancers nötig .....	78
Indirekte Konkurrenz für Faktorbindung am HIV-1-Enhancer .....	81
Fos-Antikörper hemmen die Komplexbildung am HIV-1-Enhancer.....	82
Verstärkte Bindung von NF- $\kappa$ B mit Jun und Fos an den HIV-1-Enhancer.....	83
9. Zwischenstufen der UV-induzierten Signalkette zu den Genen .....	85
Die UV-induzierte Signalkette verläuft über das Cytoplasma.....	85
EPIF als Zwischenstufe in der UV-induzierten Signalkette.....	85
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>89</b>
DNA als "Rezeptor" von UV .....	89
Die durch UV aktivierte Signalkette endet an verschiedenen UREs.....	90
Erhöhte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die UREs nach UV-Bestrahlung der Zelle .....	92
Die UREs von <i>c-jun</i> binden einen von cJun/cFos verschiedenen Faktor der AP-1 Familie.....	93
NF- $\kappa$ B interagiert mit cJun und cFos.....	98
EPIF als Zwischenstufe in der UV-induzierten Signalkette.....	101
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>104</b>

## ABKÜRZUNGEN:

Abb.	Abbildung
An	Anisomycin
AP-1	Aktivator-Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cFos	zelluläres Fos-Protein
<i>c-fos</i>	zelluläres Fos-Gen
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)
cJun	zelluläres Jun-Protein
<i>c-jun</i>	zelluläres Jun-Gen
cpm	counts per minute
CRE	cAMP-Induktion von Genen vermittelndes DNA-Element
CREB	CRE-bindendes Protein
CTP	Cytidintriphosphat
Cx	Cycloheximid
DC	Dünnschicht-Chromatographie
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiotreitol
E <sub>260</sub>	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EPIF	Extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )
G418	Geneticin-Sulfat
GTP	Guanosintriphosphat
H7	1-(5-Isoquinolinsulfonyl)-2-methylpiperazin dihydrochlorid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IL-1	Interleukin 1
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kb	1000 Basenpaare
kD	1000 Dalton
KM	konditioniertes Medium
LTR	Long terminal repeat
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MMC	Mitomycin C
MMTV	Maus-Mammary-Tumorvirus
M <sub>r</sub>	relative Molekülmasse
MSV	Maus-Sarkom-Virus

NaAcetat	Natriumacetat
NF- $\kappa$ B	Nuklearer Faktor-kappa B
NFB	Normalfibroblasten
NP-40	Nonidet® P-40
NQO	Nitroquinolinoxid
NRS	Kontroll-Kaninchenserum
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethan-sulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
tk	Thymidinkinase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosis Faktor- $\alpha$
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	TPA-Induktion von Genen vermittelndes DNA-Element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ $\mu$ l	Enzymeinheiten pro $\mu$ l
URE	UV-Induktion von Genen vermittelndes DNA-Element
UV	Ultraviolette Strahlung
vFos	virales Fos-Protein
v- <i>fos</i>	virales Fos-Gen
vJun	virales Jun-Protein
v- <i>jun</i>	virales Jun-Gen
XPA	Xeroderma pigmentosum Gruppe A

# EINLEITUNG

Die Aktivität der Gene in einer eukaryontischen Zelle wird durch eine Vielzahl von äußeren Faktoren beeinflusst. Diese äußeren Einflüsse müssen von der Zelle zunächst einmal registriert werden, bevor sie darauf antworten kann. Viele Substanzen wie Wachstumsfaktoren binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Heldin und Westmark, 1984), andere wiederum wie beispielsweise Phorbolster und Steroidhormone sind lipidlöslich und dringen in die Zellmembran ein. Phorbolster binden an deren Innenseite an Rezeptoren (Blumberg, 1988; Nishizuka, 1984), die Steroidhormone binden im Cytoplasma der Zellen an einen Rezeptor (zur Übersicht siehe: Evans, 1988). Allen gemeinsam ist, daß durch die Interaktion mit Rezeptoren Signalketten in Gang gesetzt werden. Diese Signalketten führen dann, teilweise über mehrere Zwischenstufen, Verzweigungen oder Vereinigungen mit anderen Signalketten, zur Aktivierung oder Hemmung von Transkriptionsfaktoren, die an *cis*-wirkende DNA-Elemente in der Kontrollregion von Genen binden. Nur Gene, die das entsprechende *cis*-wirkende DNA-Element besitzen, können durch die entsprechenden Substanzen beeinflusst werden. In den meisten protein-kodierenden Genen sind diese Sequenzen in der 5' flankierenden Region zu finden. Viele Gene haben gemeinsame *cis*-wirkende DNA-Elemente (z.B. TATA-Box oder CAAT-Box (Dyanan und Tjian, 1985; McKnight und Tjian, 1986)), die in der Nähe der Initiationsstelle der Transkription lokalisiert sind. Andere DNA-Elemente können die Transkription auch in größerer Entfernung zur Initiationsstelle und orientierungs-unabhängig positiv oder negativ regulieren. Diese DNA-Elemente werden "Enhancer" oder "Silencer" genannt (Banerji et al., 1981; Benoist und Chambon, 1981; Guarente, 1988; Ptashne, 1988; Schlokot und Gruss, 1986; Serfling et al., 1985).

Durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit ihren *cis*-wirkenden DNA-Elementen und bis jetzt nicht verstandenen Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der RNA-Polymerase II wird die Transkription in Gang gesetzt. Welche Gene in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv sind, hängt davon ab, welche *cis*-wirkenden DNA-Elemente diese Gene besitzen, welche Transkriptionsfaktoren in der Zelle zur Verfügung stehen und welche Signalketten in dieser Zelle aktiviert werden können (Herrlich et al., 1989b).

Ein Beispiel eines in vielen Zellen zu findenden Transkriptionsfaktors ist der Nukleare Faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B wurde ursprünglich in B-Lymphocyten als Aktivator des Leichte-Kette Gens der kappa-Immunglobuline gefunden (Picard und Schaffner, 1984; Sen und Baltimore, 1986). Inzwischen wurden auch in vielen anderen Genen NF- $\kappa$ B-Bindestellen entdeckt, wie zum Beispiel in der Enhancer-Region von SV40 (Herr und

Gluzmann, 1985; Weiher et al., 1983), im Cytomegalovirus (Boshart et al., 1985), in den Kontrollregionen der Klasse I Gene des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (Baldwin et al., 1988), des  $\alpha$ -Kette-Gens des Interleukin-2 Rezeptors (Böhnlein et al., 1988; Leung und Nabel, 1988) und in dem Enhancer des menschlichen Immunschwäche-Virus Typ I (HIV-1) (Kawakami et al., 1988; Lenardo und Baltimore, 1989; Nabel und Baltimore, 1987). NF- $\kappa$ B ist im Cytoplasma lokalisiert und wird nach Stimulation der Zelle durch Phorbol-ester, UV oder andere DNA-schädigende Agenzien von einem Inhibitor losgelöst und in den Kern gebracht, ohne daß dafür Proteinsynthese nötig ist (Baeuerle und Baltimore, 1988a; Baeuerle und Baltimore, 1988b; Stein et al., 1989a; Stein et al., 1989b). NF- $\kappa$ B ist wahrscheinlich Mitglied einer Familie von verwandten Proteinen wie H2TF1 (Singh et al., 1988), EBP-1 (Wu et al., 1988a), EBP1 (Clark et al., 1988), HIVEN86A (Franza Jr. et al., 1987), KBF1 (Yano et al., 1987), PRDII-BF1 (Keller und Maniatis, 1988). Diese Proteine erkennen alle ähnliche DNA-Sequenzen und vermitteln, wie für einige von ihnen gezeigt, erhöhte Expression von Genen durch verschiedene extrazelluläre Einflüsse in verschiedenen Zelltypen (Lenardo und Baltimore, 1989; Lenardo et al., 1989). NF- $\kappa$ B unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern dieser Familie durch seinen post-translationellen Aktivierungsmechanismus (Baeuerle und Baltimore, 1988a; Baeuerle und Baltimore, 1988b) und durch die Eigenschaft, daß seine DNA-Bindungsaktivität durch Nukleosidtriphosphate erhöht werden kann (Lenardo et al., 1988).

Das Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist ein weiteres Beispiel eines durch Phorbol-ester aktivierbaren Transkriptionsfaktors, der bei Untersuchung der Regulation der Metalloprotease Collagenase Typ I durch Phorbol-ester entdeckt wurde (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b). AP-1-Bindestellen wurden in der Zwischenzeit auch in anderen Genen wie zum Beispiel im SV40-Enhancer und Metallothionein-IIA-Gen gefunden (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987a; Lee et al., 1987b). Im Gegensatz zu NF- $\kappa$ B ist AP-1 ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Die Regulation der Expression der Collagenase Typ I durch Phorbol-ester wird durch eine 9 Basenpaar-Sequenz in der Kontrollregion dieses Gens vermittelt (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b). Diese Sequenz, die keine Homologie mit der NF- $\kappa$ B-Bindestelle hat, ist die Bindestelle für AP-1. Reinigung von AP-1 mit Hilfe dieser Sequenz über DNA-Affinitätschromatographie (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987b) war Ausgangspunkt für eine Reihe von weiteren Untersuchungen dieses Proteinkomplexes. Diese zeigten, daß er aus zwei Untereinheiten besteht, den Produkten zweier Proto-Onkogenen, *c-jun* (Angel et al., 1988a; Bohmann et al., 1987; Gebel et al., 1989; Rauscher III et al., 1988a) und *c-fos* (Chiu et al., 1988; Distel et al., 1987; Franza Jr. et al., 1988; Lucibello et al., 1988; Rauscher III et al., 1988b). Die entsprechenden Onkogene *v-jun* und *v-fos* wurden ursprünglich aus einem Hühner-Sarkomvirus (ASV 17: Bos et al., 1989; Maki et al., 1987; Vogt und Bos, 1990) bzw. zwei Maus-Sarkomviren (FBR-MSV; FBJ-MSV:

Müller et al., 1985; van Beveren et al., 1983) isoliert. Auch AP-1 gehört einer größeren Familie von Proteinen an, die ähnliche DNA-Bindesequenzen haben (Chiu et al., 1988; Chiu et al., 1989; Cohen et al., 1989; Franza Jr. et al., 1988; Hai et al., 1988; Hirai et al., 1989; Nakabeppu et al., 1988; Rauscher III et al., 1988a; Ryder et al., 1989; Sassone-Corsi et al., 1988; Zerial et al., 1989).

Während die Transkriptionsfaktoren am Ende der eingangs erwähnten Signalkette stehen, stehen am Anfang der Signalkette die äußeren Faktoren, die auf die Zellen einwirken. Ein extrazellulärer Einfluß, dem die äußeren Zellen der meisten Organismen ausgesetzt sind, ist ultraviolette Strahlung (UV). Eine Zunahme des UV-Anteils im Sonnenlicht infolge einer Vergrößerung des Ozonlochs und Abnahme der Ozonschicht könnte ein Problem für das Leben auf der Erdoberfläche werden. Eine interessante und an Aktualität zunehmende Frage ist daher, welchen Einfluß UV auf eine Zelle hat. Säugetier-Zellen in Kultur reagieren auf UV-Bestrahlung mit einer Reihe von genetischen Veränderungen. Diese Veränderungen können die Vermehrung bestimmter Abschnitte des Genoms betreffen (Gen-Amplifikation: Brown et al., 1983; Lavi, 1981; Schimke, 1984), es kann aber auch die Expression von Genen erhöht oder erniedrigt werden. Die Gesamtheit der Veränderungen in der Zelle nach Bestrahlung mit UV oder Behandlung mit anderen DNA-schädigenden Agenzien wird UV-Antwort genannt (Kaina et al., 1989a; Kaina et al., 1989b; Mai et al., 1989; Schorpp et al., 1984).

Ziel meiner Arbeit war es, den Mechanismus der UV-induzierten Expression von Genen in Säugetier-Zellen zu charakterisieren. UV aktiviert in einer Säugetier-Zelle etwa 100 Gene, von denen bisher nur ein Teil identifiziert wurde (Büscher et al., 1988; Fornace Jr. et al., 1988; Kaina et al., 1989; Kartasova und van de Putte, 1988; Maltzman und Czyzyk, 1984; Miskin und Ben-Ishai, 1981; Rahmsdorf et al., 1982; Rotem et al., 1987; Schorpp et al., 1984; Stein et al., 1989a; Stein et al., 1988; Stein et al., 1989b; Valerie et al., 1988). Für meine Untersuchungen wählte ich drei Gene aus: Ein Gen, das für ein Matrix-abbauendes Enzym kodiert, ein Protoonkogen, dessen Genprodukt ein Transkriptionsfaktor ist und ein menschliches Retrovirus, das eine tödlich verlaufende Krankheit auslöst.

Das schon erwähnte menschliche Collagenase I Gen, dessen Genprodukt, eine Matrix-Metalloprotease, verantwortlich für den extrazellulären Abbau der Collagenfasern vom Typ I ist, spielt eine wichtige Rolle in schnell wachsenden Geweben, bei der Wundheilung und bei der Bildung von Tochtergeschwulsten (Metastasen) von Tumoren (Angel et al., 1987a; Brenner et al., 1989a; Harris Jr. et al., 1984; Liotta, 1986; Liotta et al., 1980; Murphy et al., 1987; Murphy und Reynolds, 1985; Stricklin und Welgus, 1983; Woolley, 1984). Das menschliche Collagenase I Gen, im folgenden nur noch kurz Collagenase genannt, wird in

vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, und durch eine Vielzahl von äußeren Einflüssen wie Wachstumsfaktoren, Onkogen-Produkte, Phorbolster und UV aktiviert (Angel et al., 1987b; Angel et al., 1986; Angel et al., 1985; Brenner et al., 1989b; Herrlich et al., 1986; Mallick et al., 1982; Scharffetter et al., 1989; Schönthal et al., 1988a; Schönthal et al., 1988b; Schorpp et al., 1984; Stein et al., 1988; Stein et al., 1989b). Eine bisher nicht beantwortete Frage war, welches *cis*-wirkende DNA-Element in der Kontrollregion der Collagenase für die Induktion der Genexpression durch UV verantwortlich ist, und ob UV den gleichen Transkriptionsfaktor aktiviert wie Phorbolster. Für die Aktivierung der Collagenase durch Phorbolster ist die verstärkte Bindung von AP-1 an seine 9 Basenpaar-Bindesequenz in der Kontrollregion der Collagenase verantwortlich. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, endet die Signalkette in der UV-Induktion an dem gleichen *cis*-wirkenden DNA-Element und beruht auch auf einem Anstieg der Bindung von AP-1.

Das menschliche Protoonkogen *c-jun* wählte ich als Beispiel eines Gens, das innerhalb von Minuten durch Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren oder Phorbolster aktiviert wird (Angel et al., 1988b; Brenner et al., 1989b). Das Genprodukt cJun bildet zusammen mit cFos die Hauptkomponenten des Transkriptionsfaktor-Komplexes AP-1, der für die UV-induzierte Expression des menschlichen Collagenase Gens verantwortlich ist. Die Expression von *c-fos* ist in UV-bestrahlten Zellen erhöht (Büscher et al., 1988). Mich interessierte daher, ob auch die *c-jun*-Expression nach UV-Bestrahlung von Zellen erhöht ist. Ich konnte zwei *cis*-wirkende DNA-Elemente in der Kontrollregion von *c-jun*, die für die erhöhte Expression von *c-jun* nach UV-Bestrahlung der Zelle oder Behandlung mit anderen DNA-schädigenden Agenzien notwendig sind, definieren (Stein et al., 1990b).

Von einigen Viren ist bekannt, daß sie aktiviert werden, um die infizierte Zelle verlassen zu können, wenn diese durch äußere Einflüsse geschädigt wird (Lücke-Huhle et al., 1989; Nomura und Oishi, 1984; Ronai und Weinstein, 1988). Das Retrovirus HIV-1, Auslöser des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (AIDS), wird im experimentellem System beispielsweise durch Stimulation des Immunsystems (Nabel und Baltimore, 1987; Siekevitz et al., 1987; Tong-Starksen et al., 1987), durch Behandlung mit Chemikalien (Dinter et al., 1987; Kaufman et al., 1987; Nabel und Baltimore, 1987) und durch UV (Stein et al., 1988; Stein et al., 1989a; Stein et al., 1989b; Valerie et al., 1988) aktiviert. Für die Aktivierung durch UV ist eine verstärkte Bindung von NF- $\kappa$ B an den HIV-1-Enhancer verantwortlich.

Der erste Schritt in der Untersuchung der UV-Antwort war zu zeigen, was das primäre Ereignis für die Auslösung der UV-Antwort ist. Als "Rezeptor" der UV-Strahlung kommen eine Reihe von Molekülen in der Zelle in Frage. Ich konnte zeigen, daß das primäre Ereignis für die Auslösung der UV-induzierten Genexpression ausschließlich die Schädigung der

DNA durch UV ist. Das Einbringen von UV-geschädigter DNA in die Zelle kann die direkte Bestrahlung ersetzen. Meine nächste Frage war, wie es vom DNA-Schaden zur Aktivierung von Genen kommt. Die Transkription von Genen wird, wie schon erwähnt, durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die an *cis*-wirkende DNA-Elemente binden und damit die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II auslösen. Diese Elemente liegen normalerweise in der 5' flankierenden Region. Das DNA-Element der Collagenase (TRE), das die Induktion der Genexpression durch Phorbolester vermittelt, liegt z.B. zwischen den Positionen -73 und -65. Diese Positions-Angaben werden relativ zum Start der Transkription, der mit +1 festgelegt ist, gerechnet. Diejenigen *cis*-wirkenden DNA-Elemente von HIV-1, Collagenase und *c-jun*, die erhöhte Genexpression durch UV vermitteln (UREs), konnten durch Herstellung chimärer Genkonstrukte, die aus einem Teil der 5' flankierenden Region des Gens und dem bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Gen bestehen, und Austesten von deren Expression in transfizierten Zellen nach UV-Bestrahlung, identifiziert werden.

Nachdem Anfang und Ende der Signalkette in der UV-Induktion bekannt waren, wurden die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren charakterisiert. Die UREs dieser drei Gene haben unterschiedliche DNA-Sequenzen und sollten daher auch verschiedene Transkriptionsfaktoren binden. Die UV-induzierte Signalkette divergiert somit zu verschiedenen Endpunkten, den verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Ich konnte diese Faktoren identifizieren und weiterhin zeigen, daß in UV-bestrahlten Zellen diese Faktoren verstärkt an die UREs binden. NF- $\kappa$ B bindet an das HIV-1-URE, AP-1 an das Collagenase-URE und Proteine aus der AP-1-Familie an die *c-jun*-UREs. Die Bindestellen für NF- $\kappa$ B und AP-1 sind völlig verschieden, dennoch haben beide Faktoren gemeinsame Komponenten. cJun und cFos, die Hauptbestandteile von AP-1, sind auch Bestandteile des Transkriptionsfaktor-Komplexes am HIV-1-URE. Die UREs von Collagenase und *c-jun* sind in ihrer Sequenz zwar ähnlich, aber eine zusätzliche Base in der Sequenz der *c-jun*-UREs ist ausschlaggebend, daß an diese Elemente Faktoren, verschieden von denjenigen am Collagenase-URE, binden.

Über die Zwischenstufen der Signalkette vom DNA-Schaden zum aktivierten Gen ist noch wenig bekannt. Sowohl der DNA-Schaden als auch die durch UV aktivierten Gene sind im Zellkern lokalisiert. Man könnte sich daher eine direkte Informationsübermittlung innerhalb des Zellkerns vorstellen. Die Signalkette in der UV-Induktion läuft aber, zumindest bei NF- $\kappa$ B, über das Cytoplasma, wo inaktives NF- $\kappa$ B nach UV-Bestrahlung der Zelle von einem Inhibitor (Baeuerle und Baltimore, 1988a; Baeuerle und Baltimore, 1988b) losgelöst wird. Der Signaltransfer ist sehr schnell und nicht von Proteinsynthese abhängig.

Die Aktivierung von Genen durch UV ist ein physiologischer Prozeß, der mit den in der Natur auftretenden UV-Dosen ausgelöst werden kann. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch in Zellen, die keiner direkten UV-Bestrahlung ausgesetzt sind (wie z.B. die meisten HIV-1-infizierten Zellen), Gene durch UV indirekt aktiviert werden. UV-Bestrahlung von Zellen führt zur Freisetzung eines extrazellulären Faktors (Rotem et al., 1987; Schorpp et al., 1984), der in unbestrahlten Zellen Gene über die UREs aktiviert. Dieser Faktor wirkt nicht zelltypspezifisch. Lymphoide Zellen, mögliche Trägerzellen für HIV-1, zeigen nach Behandlung mit Kulturmedium von UV-bestrahlten epithelialen Zellen erhöhte Transkription von transfizierten HIV-1-CAT-Konstrukten.

# MATERIALIEN UND METHODEN

## Bezugsquellen

Acetyl-Coenzym A, Li-Salz	Pharmacia, Freiburg u. Sigma, Münch.
Acridinorange	Sigma, München
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Actinomycin D	Sigma, München
Agarose Typ II, Typ VII	Sigma, München
Alkalische Phosphatase (20 U/μl) (aus Kälberdarm)	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad Laboratories, München
Ampicillin	Sigma, München
Anisomycin	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten (9 cm)	Greiner, Nürtingen
Bal31 Exonuklease	Bio Rad Laboratories, München
Benzamidin	Sigma, München
Biogel® P60	Bio Rad Laboratories, München
BSA	Serva, Heidelberg
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Cycloheximid	Sigma, München
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
DEPC	Sigma, München
desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
didesoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Buchs Schweiz
Dithiothreitol	BRL Inc., Neu-Isenburg
DMEM	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/μl)	Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt
Emulsifier Safe®	Packard Instrument Company, Illin.
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum (nordamerikan. Ursprung)	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Forskolin	Sigma, München
G418	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
Glycerin	BRL Inc., Neu-Isenburg
H7	Seikagaku Kogyo Comp., Japan
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München
HEPES	Sigma, München
Kieselgel-DC-Platten	Macherey-Nagel, Düren
Leupeptin	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Mitomycin C	Sigma, München

Multi-prime labelling-Kit  
 N,N'-Methylen-bisacrylamid  
 Nacs-Prepac<sup>®</sup>-Säulen  
 Nick-Translations-Kit  
 Nitrocellulose-Filter  
 Nonidet<sup>®</sup> P-40  
 Nukleosidtriphosphate  
 Oligo-dT-Cellulose Typ VII  
 Oligonukleotid-Synthesemaschine  
 Penicillin/Streptomycin  
 Pepstatin A  
 PMSF  
 poly (dIdC)  
 Protein A-Sepharose  
 Protein-Molekulargewichtsmarker  
 (14.4; 21.5; 31; 42.7; 66.2; 97.4 kD)  
 Proteinase K (Lyophylisat)  
 (aus *Tritirachium album*)  
 Restriktions-Endonukleasen  
  
 RNase A (5 mg/ml)  
 RNase T1 (500 U/μl)  
 (aus *Aspergillus oryzae*)  
 RNasin (40 U/μl)  
 RPMI 1640  
 RQ1-DNase (1 U/μl, RNase frei)  
 Salmon-Sperm-DNA Typ III, Na-Salz  
 Saure Phosphatase (6 U/mg) (aus Kartoffeln)  
 Sephadex<sup>®</sup> G25  
 Silan  
 SP6-RNA-Polymerase (10 U/μl)  
 T4-DNA-Ligase (2 U/μl)  
 T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/μl)  
 T7-Sequenase-Kit  
 TEMED  
 TPA  
 transfer-RNA (aus Kalbsleber)  
 Transformations-Chemikalien  
 Triton<sup>®</sup> X-100  
 UV-Lampen 254, 345, 366 nm  
 Whatman<sup>®</sup> 3MM-Papier  
 Whatman<sup>®</sup> GF/C-Filter  
 Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>)  
 Zellkulturschalen (9 cm)

Amersham-Buchler, Braunschweig  
 Bio Rad Laboratories, München  
 BRL Inc., Neu-Isenburg  
 Amersham-Buchler, Braunschweig  
 Schleicher & Schüll, Dassel  
 Bio Rad Laboratories, München  
 Boehringer, Mannheim  
 Collaborative Research Inc.  
 Gene Assembler<sup>®</sup> Pharmacia, Freiburg  
 Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe  
 Sigma, München  
 Serva, Heidelberg  
 Pharmacia, Freiburg  
 Pharmacia, Freiburg  
 Bio Rad Laboratories, München  
  
 Merck, Darmstadt  
  
 Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt  
 Boehringer, Mannheim  
 BRL Inc., Neu-Isenburg  
 Pharmacia, Freiburg  
 Promega Biotec, Heidelberg  
 Boehringer, Mannheim  
 Sigma, München  
  
 Pharmacia, Freiburg  
 Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe  
 Genofit, Heidelberg  
 Sigma, München  
 Boehringer, Mannheim  
 Bio Rad Laboratories, München  
 Wacker Chemie, München  
 Pharmacia, Freiburg  
 Promega Biotec, Heidelberg  
 Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt  
 USB, Cleveland, USA  
 Bio Rad Laboratories, München  
 Sigma, München  
 Boehringer, Mannheim  
 Fluka, Buchs Schweiz  
 Bio Rad Laboratories, München  
 Vetter, Wiesloch  
 Bender & Hobein, Karlsruhe  
 Bender & Hobein, Karlsruhe  
 Greiner, Nürtingen  
 Greiner, Nürtingen

## Radiochemikalien:

D-threo-(dichloracetyl-1- <sup>14</sup> C)- Chloramphenicol (7.4 MBq/ml, 2.11 GBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
L- <sup>35</sup> S-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
<sup>14</sup> C-methylierte Proteine (14.3; 30; 46; 69; 97.4; 200 kD)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α- <sup>32</sup> P-dATP (370 MBq/ml, ~110 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α- <sup>32</sup> P-dCTP (370 MBq/ml, ~110 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α- <sup>32</sup> P-dGTP (370 MBq/ml, ~110 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α- <sup>32</sup> P-UTP (370 MBq/ml, >15 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
γ- <sup>32</sup> P-ATP (370 MBq/ml, >185 GBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
α- <sup>35</sup> S-dATP (296 MBq/ml, >22 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig

## Bakterien und Zellen

**E. coli DH5:** F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*, λ<sup>-</sup>, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*

**F9 tk<sup>-</sup>:** embryonale Maus-Karzinoma-Zelle. Erhalten von E. Wagner, Heidelberg.  
(im nachfolgenden nur noch mit F9 bezeichnet)

**Hela tk<sup>-</sup>:** Menschliche Cervix-Karzinoma-Zelle. Erhalten von Dr. Yung-Chi-Chung, Durham. (im nachfolgenden nur noch mit HeLa bezeichnet)

**Jurkat:** menschliche lymphoide T-Zelle, CD4 positiv. Erhalten von A. Pollack, Freiburg.

**Kelly:** menschliche Neuroblastoma-Zelle. Erhalten von M. Schwab, Heidelberg.

**Molt-4:** menschliche lymphoide T-Zelle, CD4 positiv. Erhalten von K. Moldenhauer, Heidelberg.

**NFB:** menschliche primäre Normalfibroblasten. Erhalten von R. Eife, München.

**NIH 3T3:** embryonale Maus-Fibroblasten Zell-Linie. Erhalten von P. Gruss, Heidelberg.

**T47D:** menschliche Mammary-Karzinoma-Zelle. Erhalten von I. Keydar.

**XPA:** menschliche primäre Xeroderma pigmentosum Komplementationsgruppe A Fibroblasten. Erhalten von J. Cleaver, San Francisco.

## **Kulturmedien**

### **L-Broth:**

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

### **TB:**

2.4% Bacto-Hefe-Extrakt, 1.2% Bacto-Trypton, 0.35% Glycerin, 72 mM  $K_2HPO_4$ ,  
17 mM  $KH_2PO_4$

### **SOB:**

0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ ,  
10 mM  $MgSO_4$

### **SOC:**

SOB mit 20 mM Glucose

### **Bakterien-Selektionsmedium:**

L-Broth oder TB mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin

### **Einfrier-Medium (Bakterien):**

90% L-Broth, 10% DMSO

### **Kulturmedium für F9, HeLa, NFB, NIH 3T3, XPA:**

DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin

### **Kulturmedium für Jurkat, Molt-4:**

RPMI 1640 mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin

### **Kulturmedium für Kelly:**

RPMI 1640 mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin

### **Kulturmedium für T47D:**

RPMI 1640 mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 0.7 mM Insulin

### **Einfrier-Medium (Zellkultur):**

80% Medium, 10% FCS, 10% DMSO

## Antikörper

### Kontroll-Kaninchenserum:

Kaninchenserum aus nicht-immunisierten Tieren.

### Fos-Antikörper 411:

Maus-Ascites gegen Peptid aus cFos (Aminosäuren 4-17: SGFNADYEASSRC); IgG2b (Togni de et al., 1988); gekauft bei Microbiological Associates, Bethesda, Maryland.

### Fos-Antikörper 455:

Kaninchenserum gegen  $\beta$ -Gal-cFos-Fusionsprotein (Aminosäuren 150-293 aus cFos) (Verrier et al., 1986); gekauft bei Medac, Hamburg.

### Fos-Antikörper 262:

Kaninchenserum gegen trpE-vFos-Fusionsprotein (262 bp *PstI*-Fragment aus *v-fos*) (Riabowol et al., 1988); zur Verfügung gestellt von A. Schönthal, San Diego.

### cJun-Antikörper (Bubble):

Kaninchenserum gegen 55 kD trpE-cJun-Fusionsprotein (138 Aminosäuren vom Carboxy-Terminus, DNA-Bindedomäne von cJun) (Angel et al., 1988a; Chiu et al., 1988); zur Verfügung gestellt von H.J. Rahmsdorf, Karlsruhe.

### vJun-Antikörper (Castorp):

Kaninchenserum gegen 75 kD trpE-vJun-Fusionsprotein (gesamtes vJun) (Angel et al., 1988a); zur Verfügung gestellt von H.J. Rahmsdorf, Karlsruhe.

## Plasmid-Konstruktionen

Die meisten HIV-1 CAT-Konstrukte sind schon beschrieben (Muesing et al., 1987; Nabel und Baltimore, 1987). -121/+20 HIV-1 CAT entstand durch Ligation des -121/+20 *SalI/BglIII*-Fragments aus -121/+232 HIV-1 CAT in *SalI/BglIII*-geschnittenen pBLCAT5. Alle hier benutzten CAT-Konstrukte wurden in den Vektor pBLCAT5 umkloniert. pBLCAT5 entstand aus pBLCAT3 (Luckow und Schütz, 1987) durch Entfernen eines UV- und Phorbolster-Induktion vermittelnden Elements zwischen den *EcoO109*- und *NdeI*-Schnittstellen (C. Jonat, unveröffentlicht). -105/-79 HIV-1 TATA CAT bzw. -79/-105 HIV-1 TATA CAT entstand durch Ligation des HIV-1 Enhancer-Oligonukleotids (HIV-1

Enhancer-Sequenzen von den Positionen -105 bis -79) mit *Bam*HI-Linkern in die *Bg*III-Schnittstelle von pTATA CAT6. Die Orientierung des Enhancers wurde durch Sequenzierung bestimmt. pTATA CAT6 entstand aus dem Plasmid PL-TG (Schorpp et al., 1988) durch Entfernen eines *Xho*I-Fragments (G-freie Kasette) und des UV- und Phorboloster-Induktion vermittelnden Elements im Vektor.

Die meisten Collagenase CAT-Konstrukte sind ebenfalls schon beschrieben (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b), wurden jedoch alle in den Vektor pBLCAT5 bzw. pBLCAT4 umkloniert. pBLCAT4 entstand aus pBLCAT2 (Luckow und Schütz, 1987) durch Entfernen eines UV- und Phorboloster-Induktion vermittelnden Elements zwischen den *Eco*O109- und *Nde*I-Schnittstellen (C. Jonat, unveröffentlicht). -517/-70 Coll tkCAT entstand aus -517/+63 Coll CAT durch schneiden mit *Fok*I bei Position -70, Auffüllen der Schnittstelle und *Bam*HI-Linker-Ligation. Das durch Nachschneiden mit *Hind*III bei Position -517 und *Bam*HI entstandene Fragment -517/-70 wurde in *Hind*III/*Bam*HI-geschnittenen pBLCAT4 ligiert. -60/+63 Coll CAT entstand aus -73/+63 Coll CAT durch *Bal*31-Deletion von der *Hind*III-Schnittstelle bei Position -73, Auffüllen der Schnittstelle, *Hind*III-Linker-Ligation, Nachschneiden mit *Hind*III und *Nco*I (schneidet im CAT-Gen) und Ligation dieses Fragments in *Hind*III/*Nco*I-geschnittenen pBLCAT5. -517/+63 mutURE Coll CAT (erhalten von C. Jonat) entstand aus -517/-70 Coll tkCAT und -60/+63 CollCAT. -517/-70 Coll tkCAT wurde mit *Bam*HI bei Position -70 geschnitten, das Schnittende aufgefüllt und dann mit *Nco*I im CAT-Gen nachgeschnitten. -60/+63 CollCAT wurde mit *Hind*III bei Position -60 geschnitten, die Schnittstelle aufgefüllt, mit *Nco*I nachgeschnitten und das entsprechende Fragment in das vorherige Plasmid ligiert. Sequenzierung zeigte, daß die Collagenase Sequenz -73 ATGAGTCAGACAC -61 durch die Sequenz -76 ATGACGGATCAGCTT -61 ersetzt wurde. Damit ist das URE durch eine Insertionsmutation zerstört worden. 5×(-73/-65) Coll tkCAT ist eine pentamere Kopf-Kopf-Ligation des coll-Oligonukleotids (Collagenase-Sequenzen von den Positionen -73 bis -65) in *Hind*III/*Bam*HI-geschnittenen pBLCAT4.

Die Vektoren pBLCAT5, pBLCAT4 und pTATACAT6 unterscheiden sich lediglich durch den inserierten Promoter. pBLCAT5 hat keinen Promoter, pBLCAT4 enthält den *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase (tk) Promoter und pTATA CAT6 enthält den *Xenopus laevis* Albumingen-Promoter.

Zur Herstellung der übrigen Oligonukleotid-tkCAT bzw. Oligonukleotid-TATA CAT Konstrukte wurden die entsprechenden Oligonukleotide mit ihren *Hind*III- und *Bam*HI-Enden in die mit *Hind*III und *Bam*HI geschnittenen Vektoren pBLCAT4 bzw. pTATA CAT6 ligiert, und die Richtigkeit der Konstrukte durch Sequenzierung überprüft.

Die *c-jun* CAT-Konstrukte sind teilweise in Angel et al. (1988b) beschrieben. Das dort beschriebene *c-jun* CAT-Konstrukt -1100/+740 entspricht in Wirklichkeit der Deletion -1600/+740. Alle beschriebenen sowie noch hergestellten *c-jun* CAT-Konstrukte wurden in den Vektor pBLCAT5 umkloniert. Zur Herstellung von -1600/+170 *c-jun* CAT wurde das *NcoI*-Fragment aus -132/+170 *c-jun* CAT (*NcoI* schneidet bei Position -130 und im CAT-Gen) in den mit *NcoI* geschnittenen Vektor -1600/+740 *c-jun* CAT ligiert und die Orientierung überprüft. -1600/+170 mut1.URE CAT entstand durch Ligation des *StuI*-Fragments aus -1600/+740 *c-jun* CAT (*StuI* schneidet im Vektor und bei Position -79) in das *StuI*-geschnittene Vektorfragment von -132/+170 mut1.URE CAT (K.-K. Park, unveröffentlicht). -1600/+170 mut2.URE CAT ist abgeleitet von -1600/+170 *c-jun* CAT. Das Ausgangsplasmid wurde mit *HindIII* (Position -1600) und *SacII* (Position -166) geschnitten und das Vektorfragment isoliert. Danach wurde aus -1600/+170 CAT durch Verdau mit *HindIII* und partiellen Verdau mit *EcoO109* (Position -216) ein (-1600/-216)-Fragment isoliert. Die fehlende Sequenz zwischen den Positionen -216 und -166 wurde durch ein synthetisches Oligonukleotid mit *EcoO109*- und *SacII*-Enden ersetzt. Das Oligonukleotid enthielt im Bereich des 2. URE Punktmutationen. Somit wurde die Sequenz -191 ATTACCTCATC -181 durch die Sequenz -191 TGGACCTCGAG -181 ersetzt. Das Oligonukleotid und die zwei Fragmente ergaben dann nach Ligation das Konstrukt -1600/+170 mut2.URE CAT. Zur Herstellung der Doppelmutante -1600/+170 mut1.+2.URE CAT wurde wie oben verfahren, nur wurde als Ausgangsplasmid -1600/+170 mut1.URE CAT benutzt. -283/+170 *c-jun* CAT entstand durch Ligation eines *SmaI*-Fragments (-283/+170) aus -1600/+740 *c-jun* CAT in die aufgefüllte *BamHI*-Schnittstelle von pBLCAT5 (erhalten von A. Schönthal, unveröffentlicht). Die interne Deletionsmutante -283/+170 $\Delta$ (-131/-64) *c-jun* CAT entstand durch Ligation des *NcoI*-Fragments aus -132/+170 mut1.URE CAT (*NcoI* schneidet unter anderem bei Position -64 und im CAT-Gen) in *NcoI* geschnittenen -283/+170 *c-jun* CAT (*NcoI* schneidet hier bei Position -130 und im CAT-Gen). -196/+170 *c-jun* CAT entstand durch *FokI*-Verdau von -283/+170 bei Position -196, Auffüllen der Schnittstelle und Nachschneiden mit *SmaI* bei Position +170. Das isolierte Fragment wurde in die aufgefüllte *BamHI*-Schnittstelle von pBLCAT5 ligiert (erhalten von R. Offringa, unveröffentlicht). -167/+170 *c-jun* CAT wurde von -196/+170 CAT durch Schneiden mit *SacII* bei Position -167, Auffüllen der Schnittstelle und Religation des Vektors abgeleitet.

HIV-1 SP6-Probe: Das *SalI/XhoI*-Fragment (-76/+232) aus -76/+232 HIV-1 CAT wurde in *SalI*-geschnittenen SP65 (Promega; Melton et al., 1984) ligiert. Zur Herstellung der SP6-Probe wird mit *SalI* linearisiert. Die entstehende SP6-Probe ist 360 nt lang, HIV-1-RNA mit richtigem Transkriptions-Start führt zu einem geschützten Fragment von 232 nt.

tkCAT SP6-Probe: Die tkCAT SP6-Probe ist in Angel et al. (1987b) beschrieben. Die 347 nt lange Probe führt zu einem geschützten Fragment von 210 nt bei tkCAT-RNA mit richtigem Transkriptions-Start. (erhalten von R. Miksicek, Heidelberg)

*c-jun* SP6-Probe: Die menschliche *c-jun* SP6-Probe entstand durch Ligation eines *NcoI/SalI*-Fragments von Position -132 bis +740 in *SmaI/SalI*-geschnittenen SP64 (Promega; Melton et al., 1984). Zur Herstellung der SP6-Probe wird mit *EcoRI* linearisiert. Die entstehende SP6-Probe ist 920 nt lang, *c-jun*-RNA mit richtigem Transkriptions-Start führt zu einem geschützten Fragment von 760 nt. (erhalten von P. Angel, Karlsruhe)

Coll SP6-Probe: Das *ScaI/XbaI*-Fragment (-294/+139) aus dem menschlichen Collagenase Gen wurde in *XbaI/SmaI*-geschnittenen SP64 (Promega; Melton et al., 1984) ligiert. Zur Herstellung der SP6-Probe wird mit *EcoRI* linearisiert. Die SP6-Probe ist 478 nt lang, Collagenase-RNA mit richtigem Start führt zu einem geschützten Fragment von 139 nt.

Die Expressionsvektoren für cJun und cFos unter der Kontrolle des RSV LTR wurden von R. Offringa, Leiden, zur Verfügung gestellt und sind auch von ihm bereits beschrieben (Offringa et al., 1990). RSV*neo* ist ein von RSV CAT (Gorman et al., 1982a) abgeleitetes Plasmid mit Austausch der CAT-Sequenzen gegen ein offenes Leseraster aus dem Neomycin (*neo*) Gen. RSV*c-fos* ist ein Expressionsvektor für das Maus *c-fos* Gen. Die *neo*-Sequenzen aus RSV*neo* wurden durch ein *AccI*-Fragment aus SV*c-fos* ersetzt (Schönthal et al., 1988b). RSV*c-jun* ist ein Expressionsvektor für das menschliche *c-jun* Gen. Die *neo*-Sequenzen aus RSV*neo* wurden durch ein 2.2 kb *BamHI/KpnI*-Fragment aus dem Expressionsvektor SV*c-jun* ersetzt (Angel et al., 1988a).

Die Expressionsvektoren für die vJun-Mutanten wurden von P. Angel, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. RSVpUC ist der Kontrollvektor, der für die Herstellung der Konstrukte RSVv-*jun* Wildtyp (kodiert für das gesamte vJun), RSVv-*jun*  $\Delta$ 1-119 (vJun-Mutante ohne Trans-Aktivierungsdomäne) und RSVv-*jun*  $\Delta$ 121-287 (vJun-Mutante ohne DNA-Binde-domäne) benutzt wurde (Angel et al., 1989).

SV65, SVanti-*jun*: Der vom SP65 abgeleitete Expressionsvektor SV65 unter der Kontrolle des SV40-Enhancers sowie der "antisense"-*c-jun* Expressionsvektor SVanti-*jun* sind in Schönthal et al. (1988a) beschrieben.

KSV10<sup>+</sup>, SV*sof*<sup>+</sup>: Der SV40-Expressionsvektor KSV10 (Pharmacia) sowie der "antisense"-*c-fos* Expressionsvektor SV*sof* sind in Schönthal et al. (1988b) beschrieben. KSV10<sup>+</sup> und SV*sof*<sup>+</sup> sind davon abgeleitet durch Austausch des *BamHI/EcoRI*-Vektorfragments gegen das entsprechende Fragment aus SP64.

## Oligonukleotide

### HIV-1 (-105/-79), zur Konstruktion des Klons (-105/-79) HIV-1 TATA CAT

5' GATCCGGAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGCCG 3'  
3' GCCTCCCTGAAAGGCGACCCCTGAAAGGTCGGCCTAG 5'

### HIV-1: HIV-1, Position -92 bis -79

5' AGCTTGGGGACTTTCCAGCCG 3'  
3' ACCCCTGAAAGGTCGGCCTAG 5'

### mHIV-1: HIV-1, Position -92 bis -79, mit Punktmutationen in Position -90, -89, -88

5' AGCTTGCCTCACTTTCCAGCCG 3'  
3' ACGAGTGAAAGGTCGGCCTAG 5'

### coll: Collagenase, Position -72 bis -65

5' AGCTTGTGAGTCAGCCG 3'  
3' AACTCAGTCGGCCTAG 5'

### mcoll: Collagenase, Position -71 bis -65

5' AGCTTGGAGTCAGCCG 3'  
3' ACCTCAGTCGGCCTAG 5'

### coll\*: Collagenase, Position -62 bis -50

5' AGCTTGACCTCTGGCTTTCCG 3'  
3' ACTGGAGACCGAAAGGCCTAG 5'

### jun1: c-jun, Position -72 bis -63

5' AGCTTGTGACATCATCCG 3'  
3' AACTGTAGTAGGCCTAG 5'

### jun2: c-jun, Position -191 bis -182

5' AGCTTGATTACCTCATCCG 3'  
3' ACTAATGGAGTAGGCCTAG 5'

**fib: Fibronectin, Position -174 bis -162**

```
      -174           -162  
5' AGCTTGTGACGTCACCCG 3'  
   3' ACACTGCAGTGGGCCTAG 5'
```

**fos: c-fos, Position -323 bis -292 mit Punktmutationen bei -295 und -293**

```
      -323           -292  
5' GACACAGGATGTCCATATTAGGACATCTGCGGCGCGGTC 3'  
   3' CTGTGTCCTACAGGTATAATCCTGTAGACGCCGCCAG 5'
```

**B1: *Xenopus* B1 Vitellogenin-Promoter, Position -55 bis -38**

```
      -55           -38  
5' AGCTTGGTGCACATGCGCCA 3'  
   3' ACCACGTGTACGCGGTCTAG 5'
```

**SV40: SV40 Minimal-Origin, Position +5207 bis +5225**

```
      +5207           +5225  
5' GATCCTCCTCACTACTTCTGGAATG 3'  
   3' GAGGAGTGATGAAGACCTTACCTAG 5'
```

Alle Oligonukleotide wurden freundlicherweise von U. Wagner, Karlsruhe auf einem Pharmacia Gene Assembler® synthetisiert.

## UV-Bestrahlungsquellen

Für das kontinuierliche Spektrum wurde eine 1000 W Hg-Lichtbogen-Lampe mit Prisma-Monochromator (für Details siehe: Zölzer und Kiefer (1984)) des Instituts für Strahlenbiologie der Universität Giessen benutzt.

Für die monochromatischen Bestrahlungen wurden 15 W Hg-Lampen der Wellenlängen 254 nm (halbmaximale Bandbreite 2.3 nm); 345 nm (halbmaximale Bandbreite 43 nm) und 360 nm (halbmaximale Bandbreite 35 nm) benutzt. Die Leistung der Lampen in 32 cm Abstand beträgt 2.8 W/m<sup>2</sup> (254 nm), 1.8 W/m<sup>2</sup> (345 nm) bzw. 1.7 W/m<sup>2</sup> (360 nm).

## **METHODEN:**

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

### **1. Behandlung von Nukleinsäuren**

#### **Spektrophotometrische Konzentrations-Bestimmung von Nukleinsäuren**

Die Nukleinsäure wurde in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Das Verhältnis  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  sollte etwa 1.8:1 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

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

$$E_{260} \cdot 40 = \mu\text{g/ml RNA}$$

$$E_{260} \cdot 20 = \mu\text{g/ml Oligonukleotide}$$

#### **Phenol/Chloroform-Extraktion**

Zur Reinigung der Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde mit Wasser auf mindestens 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1 $\times$  TNE gesättigt; 1 $\times$  TNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wieder gut geschüttelt. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren wieder getrennt. Die Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

#### **Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen**

Die Nukleinsäure-Lösung wurde in einem geeigneten Volumen mit NaAcetat, pH 4.8 zu einer Endkonzentration von 0.25 - 0.3 molar versetzt. Bei kleinen Fragmenten sollte man noch etwa 1 bis 5  $\mu\text{g}$  tRNA als Fällungshilfe zufügen. Nach Zugabe des 2.5 fachen Volumen Ethanol wurde 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei  $13000\times g$  zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde der Niederschlag nochmal mit 80% Ethanol gewaschen.

Das Volumen der Nukleinsäure-Lösung kann auch durch 2-Butanol eingengt werden. Dazu wurde das gleiche Volumen 2-Butanol zugegeben und gut gemischt. Durch 10 Sekunden Zentrifugieren wurden die Phasen wieder getrennt und die Oberphase verworfen. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt.

Bei der Fällung von Nukleinsäuren kann Ethanol auch durch Isopropanol ersetzt werden. Man gibt  $\frac{1}{2}$  Volumen Isopropanol zu der wässrigen Nukleinsäure-Lösung.

Sollte verhindert werden, daß nicht eingebaute Triphosphate oder Oligonukleotide <30 bp mit ausfallen, wurde statt NaAcetat 2 M  $\text{NH}_4\text{Acetat}$  benutzt. Eine quantitative Abtrennung dieser kleinen Moleküle ist aber nicht möglich.

## **2. DNA-Präparation**

### **Bakterien-Wachstum und Amplifikation**

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

Plasmide mit pBR322-Origin wurden grundsätzlich amplifiziert, um die Ausbeute an DNA zu erhöhen. Die Bakterien wurden in 5 ml TB mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Mit dieser Kultur wurden 400 ml TB angeimpft und bis zur  $E_{600}=0.4$  wachsen gelassen. Dann wurde 10  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin zugegeben und weitere 20 Stunden inkubiert.

### **Plasmid-DNA-Präparation (Birnboim et al., 1979)**

200 ml einer über Nacht inkubierten Bakterien Suspension wurden 10 min bei 4000 $\times$ g zentrifugiert. Der Bakterien-Niederschlag wurde in 10 ml Lysozym-Lösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 7.8, 25 mM Tris pH 8.0, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden unter Schütteln 20 ml alkalische SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben und die Suspension 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 15 ml 3 M NaAcetat wurde die Mischung 60 min auf Eis gestellt. Ausgefällenes Protein und genomische DNA wurden durch 20 min Zentrifugieren bei 16800 $\times$ g (4°C) abgetrennt. Zum Überstand wurde das 2.5 fache Volumen Ethanol (-20°C) gegeben und die Plasmid-DNA mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde 10 min bei

16800×g (4°C) zentrifugiert, getrocknet und in 10 ml 0.1 M NaAcetat, 50 mM Tris pH 8 gelöst. Nach anschließender zweiter Ethanolfällung bei -80°C für mindestens 30 min wurde der Niederschlag getrocknet und in 4.2 ml 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8 gelöst. Nach Zugabe von 4.5 g CsCl und 40 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Lösung auf zwei 5 ml VTi65-Zentrifugenröhrchen verteilt, mit einer Lösung der gleichen obigen Konzentration aufgefüllt und zugeschweißt. Nach 16 Stunden Ultrazentrifugation im Beckman VTi65-Vertikalrotor bei 55000 U/min (20°C) wurde die "supercoiled" Plasmid-Bande abgesaugt und nach Vereinigung der beiden Ansätze für weitere 6 Stunden ultrazentrifugiert. Die "supercoiled" Plasmid-Bande wurde wieder abgesaugt, das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert und die DNA mit Wasser auf 4 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von NaAcetat zu einer Endkonzentration von 0.2 M wurde die DNA mit Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die DNA wurde nach 30 min Zentrifugieren bei 16800×g (4°C) mit 10 ml 80% Ethanol gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde nach Trocknen in Wasser gelöst.

### **Mini-Plasmid-DNA-Präparation**

Die Bakterien wurden in 3 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1.5 ml der Bakterien-Kultur wurden 5 min bei 4000×g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100 µl Lysozym-Lösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 7.8, 25 mM Tris pH 8.0, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1% SDS) und Mischen wurde 150 µl 3 M NaAcetat zugefügt und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol versetzt und 10 min auf Eis gestellt. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde durch 10 min Zentrifugieren bei 13000×g abgetrennt, mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser gelöst.

## **3. Klonierungstechniken**

### **Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen**

Wenn nicht anders angegeben, wurde die DNA in 1× Universal-Verdaupuffer (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA) mit dem entsprechenden Restriktionsenzym 2-3 h bei 37°C verdaut. 1 Enzym-Einheit verdaut in einer Stunde 1 µg Lambda-DNA. Es wurden meist 2-3 Enzym-Einheiten pro µg DNA

eingesetzt. Beim Verdau von Mini-Plasmid-Präparations-DNA wurden 5 µl DNA-Lösung mit 10 Enzymeinheiten Restriktionsenzym und 0.5 µl RNaseA (5 mg/ml) verdaut. Die Verdau-Reaktion wurde mit 5 µl 5× Glycerin-Probenpuffer (1×: 10 mM EDTA pH 8, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) abgestoppt.

### **Dephosphorylierung von DNA**

Die DNA wurde mit 1 µl Alkalischer Phosphatase (1 U/µl) in einem Endvolumen von 50 µl 1× CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidin) versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei 5'-Überhängen durch 30 min Reaktion bei 37°C, Zufügen eines weiteren µl Enzyms und nochmals 30 min Reaktion. Bei 3'-Überhängen und glatten Enden wurde 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C dephosphoryliert, dann 1 µl Enzym zugefügt und nochmals je 15 min bei 37°C und 56°C dephosphoryliert. In beiden Fällen wurde dann 42.5 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 10× TNE (1×: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) und 2.5 µl 20% SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

### **Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern**

Etwa 2 µg Oligonukleotid oder Linker-DNA wurden mit 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) in einem Endvolumen von 10 µl 1× Linker-Kinase-Puffer (66 mM Tris pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 0.2 mg/ml BSA) versetzt. Die Reaktion wurde nach einer Stunde bei 37°C durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt.

### **Auffüllen von 5' Überhängen**

Die DNA wurde mit 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 10 mM Tris pH 7.5) und 1 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl 1× Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH 7.5, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl) versetzt. Nach 30 min Reaktion bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. 3' Überhänge werden bei dieser Prozedur abgebaut.

### **Bal31 Exonuklease-Verdau**

30 µg Plasmid wurden mit einem geeignetem Restriktionsenzym verdaut, mit Phenol/Chloroform extrahiert, Ethanol gefällt und in 145 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Zugabe von 150 µl 2×*Bal31* Puffer (1×: 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5.1 µl *Bal31* Exonuklease (1.18 U/µl) gestartet. Zu bestimmten Zeiten (z.B. alle 5 Sekunden) wurden Aliquots abgenommen und mit 20 mM EGTA die Reaktion abgestoppt.

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

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem geeigneten Verhältnis (meist ein Überschuß des zu inserierenden Fragments) mit 2 µl 10 mM ATP und 1 µl T4 DNA Ligase (2 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl 1× Ligationspuffer (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 15°C über Nacht. Wenn sich die DNA-Fragmente in "low-melting" Agarose befanden, wurde diese 10 min bei 68°C geschmolzen und nach Abkühlen auf 42°C sofort mit obigen Lösungen versetzt. Für Linker-Ligationen wurde 2 µl des phosphorylierten Linkers benutzt. Für Ligationen von Oligonukleotiden in einen Vektor wurden etwa 1 pmol Oligonukleotid mit 100 fmol geschnittenem Vektor ligiert.

## **4. Markierung von DNA mit Radionukleotiden**

### **Kinasierung von DNA**

Etwa 2 pmol Oligonukleotid oder DNA Fragment wurden mit 5 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl 1× Kinase-Puffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) versetzt. Die Reaktion bei 37°C wurde nach einer Stunde durch Zugabe von 0.8 µl 0.5 M EDTA pH 7.8 abgestoppt. Die Probe wurde dann mit 10 µg tRNA, 30 µl 1× TE pH 7.5 (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5) und 50 µl 0.2 M NaCl in 1× TE versetzt. Eine Nacs-Prepac<sup>®</sup>-Säule wurde dreimal mit 1 ml 1 M NaCl/TE gewaschen und fünfmal mit 1 ml 0.1 M NaCl/TE äquilibriert. Nach Aufladen der 100 µl Probe wurde etwa fünfmal je 1 ml 0.1 M NaCl/TE langsam durchgedrückt, bis sich die Radioaktivität im Eluat nicht weiter erniedrigte. Dann wurde die kinasierte Probe dreimal mit 100 µl 1 M NaCl/TE eluiert, mit 10 µg tRNA und 0.25 M NaAcetat versetzt und mit dem 2.5 fachen Volumen Ethanol ausgefällt.

### **Auffüllen von 5' Überhängen mit $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dNTPs**

Etwa 2 pmol Oligonukleotid oder DNA-Fragment wurden in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l 1 $\times$  Polymerasepuffer (7 mM Tris pH 7.5, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) mit 4  $\mu$ l der geeigneten  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dNTPs und je 2  $\mu$ l der restlichen 5 mM dNTP-Lösungen versetzt. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten bei RT wie oben erklärt abgestoppt und über eine Nacs-Prepac<sup>®</sup>-Säule gegeben.

### **Nick-Translation (Rigby et al., 1977)**

Es wurde das "Nick-Translations-Kit" der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig benutzt. In einem Endvolumen von 50  $\mu$ l wurden 10  $\mu$ l Nick-Translations-Kit I (Puffer und dNTPs), 500 ng DNA, 5  $\mu$ l Nick-Translations-Kit II (DNase I und DNA-Polymerase I) und 6.5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP auf Eis gemischt. Nach 2 bis 3 Stunden Reaktion bei 15°C wurde auf Eis gestellt und unmittelbar danach die nicht eingebauten Nukleotide durch Gelfiltration abgetrennt. In einigen Fällen wurde die DNA auch durch "Random-priming" radioaktiv markiert. Dazu wurde ein "Multi-prime-labelling Kit" der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig benutzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **Gelfiltration über Biogel<sup>®</sup> P60**

Das Säulenmaterial Biogel<sup>®</sup> P60 trennt Moleküle von 3000 bis 60000 Dalton auf. Es dient hier zur Abtrennung freier Nukleotide von einem radioaktiven DNA-Fragment. 2 g Biogel<sup>®</sup> P60 wurden in 100 ml 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH 7.8 einige Stunden quellen gelassen. Eine kurze Pasteurpipette wurde mit Glaswolle abgedichtet und eine Schlauchklemme angebracht. Die Pipette wurde bis zur oberen Einengung luftblasenfrei mit dem Säulenmaterial gefüllt, das daraufhin mehrmals mit 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH 7.8 gewaschen wurde. Nach dem vollständigen Einsinken des Puffers in das Säulenmaterial wurde die radioaktive Probe aufgetragen. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l Puffer nachgespült und diese Menge in der ersten Fraktion gesammelt. Dann wurde weiterer Puffer aufgetragen und je 3 Tropfen (etwa 100  $\mu$ l) gesammelt. Nach 12 Fraktionen wurde die Gelfiltration beendet. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde nach der Cerenkow-Methode gemessen und die 3 bis 4 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt.

## 5. DNA-Gelelektrophorese

### Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0.8% bis 1.5% Agarose-Gele benutzt. Es handelt sich hierbei um Mini-Gele: Gelvolumen 50 ml, Puffervolumen 100 ml, Taschenvolumen 25  $\mu$ l. Das Gel ist völlig von Puffer bedeckt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1 $\times$  TBE (90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) gegeben und 5 min im Mikrowellenherd aufgeköcht. Für "low-melting" Gele wurde Agarose Typ VII verwendet. Nach Zugabe von 1.5  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel gegossen und ca. 30 min abkühlen gelassen. Nach Entfernen des Kamms und Eingießen des Laufpuffers (1 $\times$  TBE) wurden die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 100 mA. Die DNA-Banden werden unter UV sichtbar.

### Acrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 6% bis 10% Acrylamid-Gele benutzt. Das Gel wurde zwischen zwei 14 $\times$ 15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Kunststoff-Abstandhaltern gegossen. Für ein 6% Gel benötigt man 6 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung, die mit 3 ml 10 $\times$  TBE (1 $\times$ : 90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) und 21 ml Wasser in einer Saugflasche 2 min entgast wird. Nach Zufügen und Mischen von 25  $\mu$ l TEMED und 250  $\mu$ l 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung wurde das Gel gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach 15 min wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser ausgespült. Die Gelplatten wurden senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und als Anoden- und Kathodenpuffer je etwa 400 ml 1 $\times$  TBE eingefüllt. Nach Auftragen der Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) erfolgte die Auftrennung bis zum Einlaufen der Proben bei 100 V und danach bei 250 bis 300 V. Nach Ende des Laufes wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und 15 min unter leichtem Schütteln in 200 ml 1 $\times$  TBE mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV werden die DNA-Banden sichtbar.

## Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele

Diese Gele dienen zur Auftrennung von DNA unter denaturierenden Bedingungen, hervorgerufen durch die 8.3 M Harnstoff-Konzentration und die hohe Temperatur während der Auftrennung. Es wurden 20×39 cm große Glasplatten benutzt mit 0.1 mm dicken Abstandshaltern. Da diese dünnen Gele an die Glasplatte polymerisiert werden, müssen die beiden Glasplatten vorbehandelt werden. Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt. Auf die Glasplatte mit dem Ausschnitt wurde 1.5 ml 5% Dimethyldichlor-Silan (gelöst in Tetrachlorkohlenstoff) gleichmäßig verteilt und trocknen gelassen. Danach wurde die Glasplatte kräftig mit einem Kleenex® poliert. Auf die ungeschnittene Glasplatte wurde eine Mischung von 3 ml Haftsilan und 100 µl 100% Essigsäure gleichmäßig verteilt und drei Minuten trocknen gelassen. Nach Abspülen mit Ethanol wurde die Glasplatte ebenfalls gut mit einem Kleenex® poliert. Nach kurzer Wartezeit wurden die beiden Glasplatten mit den 0.1 mm dicken Abstandshaltern zusammengebaut. Eine Abdichtung ist nicht nötig. Für ein 6% Gel werden 30 ml einer 6% Acrylamid-Lösung mit 8.3 M Harnstoff benötigt [100 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung werden mit 50 ml 10× TBE (1×: 90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) versetzt und darin 250 g Harnstoff gelöst. Die dann auf 500 ml mit Wasser aufgefüllte Lösung wird noch steril filtriert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt]. Nach 2 min entgasen und Zufügen von 15 µl TEMED und 250 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung wurde das Gel unter einem Winkel von 15° gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach etwa 30 min ist das Gel polymerisiert und kann im Kühlraum einen Tag aufbewahrt werden.

Die Gelplatte wurde dann senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und zur gleichmäßigen Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je etwa 375 ml 0.5× TBE. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einer Spritze von Harnstoff freigespült. Zur Erwärmung des Gels diente ein Vorlauf von 20 bis 30 min bei 25 bis 30 Watt. Die in 3 µl Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) gelösten Proben wurden 3 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die Probenauftragung wurde mit einer speziellen Pipettenspitze vorgenommen, nachdem die Taschen nochmals ausgespült wurden. Die Auftrennung erfolgte bei 25-30 Watt bis zur gewünschten Laufstrecke. Mit einem dünnen Spatel wurde dann die Glasplatte mit dem Ausschnitt abgehoben. Durch sofortiges Einlegen in 10% Essigsäure für 10 bis 15 min wurde der Harnstoff herausgelöst. Das Gel wurde dann nach Spülen unter Wasser für etwa eine Stunde bei 80°C getrocknet und mit der Glasplatte auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm MP®, Amersham) mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

## 6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurde ein 1% Agarose-Gel zwischen zwei 14×15 cm große Glasplatten (hitzesterilisiert) mit 5 mm dicken Kunststoff-Abstandshaltern gegossen. Die Glasplatten wurden mit Klebeband abgedichtet und unten zusätzlich mit einem Acrylamid-Kissen abgedichtet; 8 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung wurden mit 40 µl TEMED und 100 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung versetzt und zwischen die Glasplatten gegossen. Nach 10 min wurde eine im Mikrowellenherd geschmolzene Lösung von 1 g Agarose Typ II in 100 ml 1× PB (3.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) zwischen die Glasplatten gefüllt und der Kamm etwa 5 mm tief in das Gel geschoben. Nach 30 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit 1× PB gespült. Das Gel wurde senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je etwa 400 ml 1× PB. Die Gelelektrophorese erfolgte im Kühlraum bei 4°C. Die RNA (1-5 µg polyA<sup>+</sup>-RNA oder 10-20 µg Gesamt-RNA) wurde in 20 µl Denaturierungspuffer (1× PB, 50% DMSO, 5.85% deionisiertes Glyoxal) gelöst. Nach 3 min Erhitzen auf 50°C und Abschrecken auf Eis wurde 5 µl 5× RNA-Ladepuffer (1× 1× PB, 10% Glycerin, 0.02% Bromphenolblau) zugegeben. Die RNA-Proben wurden dann etwa 3 Stunden (das entspricht 6 cm Laufstrecke der Bromphenolblau-Bande) bei 100 V aufgetrennt. Nach Ende des Laufs wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und 15 min unter leichtem Schütteln in 500 ml 1× PB mit 30 µg/ml Acridinorange gefärbt. Nach dreimal 15 min Entfärbung in 500 ml 1× PB wurde unter UV photographiert.

## 7. Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten

### Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Das DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus einem "low-melting" Agarose-Gel herausgeschnitten. Die Agarose wurde 10 min bei 68°C geschmolzen und das 4 fache Volumen 42°C warmer 0.5 M NaCl in TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5) (bei Fragmenten >1 kb) bzw. 0.2 M NaCl in TE (bei Fragmenten <1 kb) zugegeben und anschließend nach 42°C gestellt. Zur Reinigung wurden Nacs-Prepac<sup>®</sup>-Säulen verwendet, die folgendermaßen vorbehandelt wurden: Die Säule wurde dreimal mit je 1 ml 2 M NaCl in TE gewaschen und anschließend dreimal mit je 1 ml 0.5 M NaCl in TE (Fragmente >1 kb) bzw. 0.2 M NaCl in TE (Fragmente <1 kb) äquilibriert. Es ist wichtig, daß die Säule vor Aufbringen der Agarose 42°C warm ist. Die geschmolzene Agarose mit dem DNA-Fragment wurde dann auf die Säule aufgetragen und mit einer 1000 µl Gilson<sup>®</sup>-Pipette langsam

durchgepreßt. Die gleiche Lösung wurde nochmal durchgepreßt und anschließend 1 ml 42°C warme 0.5 M bzw. 0.2 M NaCl in TE durchgepreßt. Danach wurde die Säule mit etwa 3 ml 0.5 M bzw. 0.2 M NaCl in TE durch Austropfenlassen gewaschen. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit zweimal 200 µl 2 M NaCl in TE (Fragmente >1 kb) bzw. 1 M NaCl in TE (Fragmente <1 kb) durch Austropfen. Das eluierte DNA-Fragment wurde mit 1 µg tRNA und 1 ml Ethanol mindestens 2 Stunden bei -80°C ausgefällt.

### **Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Acrylamid-Gelen**

Die DNA-Bande wurde aus dem Acrylamid-Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und zerkleinert. Für die Zerkleinerung empfiehlt sich eine Zentrifugation des Acrylamids durch ein kleines Loch am Boden eines Eppendorf Reaktionsgefäßes in ein zweites Reaktionsgefäß. Es wurde dann das zweifache Volumen 0.5 M NaCl in TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5) (Fragmente >1 kb) bzw. 0.2 M NaCl in TE (Fragmente <1 kb) zugegeben und über Nacht bei 37°C eluiert. Die wässrige Phase wurde nach Abzentrifugieren der Gelstückchen abgenommen und durch eine Pipettenspitze mit Glaswolle gepreßt. Das eluierte DNA-Fragment wurde nach Zugabe von 1 bis 5 µg tRNA mit Ethanol ausgefällt.

### **Extraktion und Reinigung von Oligonukleotiden**

Die Oligonukleotide wurden auf einen Gene Assembler<sup>®</sup> von Pharmacia synthetisiert und entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt. Das Oligonukleotid wurde aus der Kassette durch 16 Stunden Inkubation bei 50°C mit konzentrierten Ammoniak herausgelöst. Nach Eintrocknen des Ammoniaks wurde das Oligonukleotid (~500 µg) in 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst, die Konzentration bestimmt und 250 µg davon eingetrocknet. Die Reinigung erfolgte über ein denaturierendes 20% Acrylamid/8.3 M Harnstoff-Gel. Für ein 1 mm dickes Gel setzt man 100 ml Gellösung an: 66.7 ml deionisierte Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung werden mit 10 ml 10× TBE (1×: 90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) versetzt und darin 50 g Harnstoff gelöst. Nach zwei Minuten entgasen wurde 50 µl TEMED und 500 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zugemischt. Das Oligonukleotid wurde in 60 µl Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) gelöst, 3 min gekocht und dann in eine etwa 7 cm breite Tasche aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1000 V mit 1× TBE als Laufpuffer. Nach zwei Stunden Laufzeit wurde der Puffer gewechselt. Nach 10 min Anfärben in 1× TBE mit 1µg/ml Ethidiumbromid wurde unter UV die Oligonukleotid Bande ausgeschnitten, die dem vollständig synthetisierten Produkt

entsprach. Das Acrylamid wurde zerkleinert und mit 1 ml H<sub>2</sub>O über Nacht eluiert. Das eluierte Oligonukleotid wurde über Glaswolle filtriert und die Konzentration bestimmt. Zur Hybridisierung komplementärer Einzelstränge wurden gleiche Mengen zusammen gegeben und mit 4 M NH<sub>4</sub>Acetat eine Endkonzentration von 0.25 M eingestellt. Eine Nacs-Prepac<sup>®</sup>-Säule wurde mit 4 M NH<sub>4</sub>Acetat gewaschen und mit 0.25 M NH<sub>4</sub>Acetat äquilibriert. Die Oligonukleotide wurden auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen mit 0.25 M NH<sub>4</sub>Acetat wurde viermal mit je 100 µl 4 M NH<sub>4</sub>Acetat eluiert. Das nun doppelsträngige Oligonukleotid wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dazu war es nötig das zähe Pellet immer wieder in H<sub>2</sub>O aufzunehmen. Die Ausbeute an gereinigtem Oligonukleotid betrug etwa 10 µg.

## 8. Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) mit dem "T7-Sequenase-Kit" der Firma USB, Cleveland Ohio sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde bei Verunreinigung mit RNA zuerst einem RNase-Verdau unterzogen. Danach wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 0.2 mM EDTA, 0.2 M NaOH denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit dem Sequenzier-Primer in einem 1:1 Verhältnis gemischt, auf 65°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit α-<sup>35</sup>S-dATP erfolgte die eigentliche Kettenabbruch-Reaktion mit den vier didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) und 3 min kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Acrylamid/8.3 M Harnstoff Gel aufgetrennt.

## 9. Transformation von Bakterien

### Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation (Hanahan, 1986)

Eine Kolonie von *E. coli* DH5 wurde in 10 ml SOC-Medium (0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 500 ml SOC-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und im 5 l Kolben bei 37°C so lange geschüttelt, bis die E<sub>550</sub> ≈ 0.4 beträgt (ungefähr 2 Stunden). Die Bakterienkultur wurde auf zwei 250 ml Plastik-Zentrifugenbecher verteilt und 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien 15 min bei 1000×g (4°C) zentrifugiert und das Medium gut entfernt. Die beiden Niederschläge

wurden in je 10 ml TFB (100 mM KCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM H<sub>2</sub>CoCl<sub>3</sub>, 10 mM K-MES pH 6.3, 15% Glycerin) durch Schwenken resuspendiert und in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen (eisgekühlt) gegeben. Nach Auffüllen auf 50 ml mit TFB und Mischen blieb die Bakterien-Lösung 15 min auf Eis stehen. Nach 15 min Zentrifugieren bei 1000×g (4°C) wurden die beiden Niederschläge in je 10 ml TFB durch Schwenken resuspendiert und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen (eisgekühlt) vereinigt. Die nun kompetenten Bakterien wurden bei 0°C schnellstmöglichst in 200 µl Portionen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Die Transformationseffizienz liegt bei etwa 1-5•10<sup>6</sup> Kolonien pro µg "supercoiled" pBR322.

### **Transformation von kompetenten Bakterien**

Ein Röhrchen mit kompetenten Bakterien wurde aus dem flüssigen Stickstoff geholt und auf Eis gestellt. Sobald die Bakterien aufgetaut waren, wurde 8 µl des Ligationsansatzes zugemischt und 1 Stunde auf Eis gestellt. Nach 90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis wurde 3 ml SOC-Medium (0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose) zugegeben und 90 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 5 min bei 1000×g zentrifugiert (RT) und der Niederschlag in 200 µl SOC-Medium gelöst. Die gesamte Menge wurde auf eine Selektiv-Agarplatte ausgestrichen.

### **Herstellung von Selektiv-Agarplatten**

In einem 2 l Kolben wurden 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Difco-Agar auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agar-Platten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme zum Platzen gebracht. Nach Erstarren des Agars wurde das Kondenswasser aus dem Deckel ausgeschüttelt und die Platten bei 4°C gelagert.

## 10. RNA-Präparation

### PolyA<sup>+</sup>-RNA-Präparation (Aviv und Leder, 1972)

Für jeden Probenpunkt wurden etwa drei bis fünf subkonfluente 9 cm Petrischalen verwendet. Jede Petrischale wurde zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) gewaschen. Die Zellen eines Probenpunktes wurden in insgesamt 10 ml kaltem STE (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA pH 7.8) mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 300 µg/ml Proteinase K und 0.5% SDS wurde die Mischung 30 Sekunden mit einem Ultraturrax<sup>®</sup> bei 50% Leistung homogenisiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 45 min bei 37°C. Der Lösung wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.5 M zugesetzt und etwa 100 mg in HSB (0.3 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA pH 7.8, 0.1% SDS) resuspendiertes Oligo-dT-VII zugegeben. Durch Mischen über Nacht auf einer Rotationsapparatur wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA an das Oligo-dT-VII adsorbiert. Das Adsorptionsmaterial wurde 4 min bei 330×g zentrifugiert und dreimal mit 10 ml HSB gewaschen. Die E<sub>260</sub> des HSB nach dem 3. Waschgang sollte < 0.05 sein, wenn die rRNA zum größten Teil abgetrennt wurde. Die RNA wurde mit sterilem Wasser aus dem Adsorptionsmaterial eluiert. Dazu wurde das Oligo-dT-VII dreimal mit je 1 ml Wasser gewaschen und die 3 ml RNA-Lösung anschließend nochmals zentrifugiert, um das Oligo-dT-VII vollständig abzutrennen. 300 µl davon wurden zur Konzentrations-Bestimmung abgenommen. Zu den restlichen 2.7 ml wurden in einem 15 ml Greiner-Röhrchen 10 µg tRNA gegeben und die RNA mit Ethanol ausgefällt. Das Oligo-dT-VII wurde durch zweimal Waschen mit 10 ml 0.1 M NaOH, 5 mM EDTA pH 7.8, fünfmal Waschen mit Wasser und zweimal Waschen mit HSB regeneriert.

### Gesamt-RNA-Präparation (Auffray und Rougeon, 1980)

Für jeden Probenpunkt wurden etwa drei bis fünf subkonfluente 9 cm Petrischalen benutzt. Jede Petrischale wurde zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) gewaschen. Die Zellen eines Probenpunktes wurden in insgesamt 5 ml kaltem PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 15 ml Corex<sup>®</sup>-Röhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 1000×g (4°C) wurde der Zell-Niederschlag in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und 1 ml 2× Proteinase K-Puffer (1×: 100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 12.5 mM EDTA, 1% SDS) zugegeben. Bei Raumtemperatur wurde die genomische DNA durch dreimaliges Aufziehen mit einer Kanüle (0.60×25 mm) und viermaliges Aufziehen mit einer Kanüle (0.40×21 mm) geschert. Nach

Zugabe von 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde 30 min bei 37°C inkubiert, 1 ml Phenol (äquibriert mit 1× TNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) zugegeben und kräftig geschüttelt. Danach wurde 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und wieder kräftig geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 10000×g (18°C) wurde die wässrige Oberphase abgenommen und in einem Greiner-Röhrchen mit 2 ml 4 M LiCl versetzt. Die RNA wurde über Nacht bei 4°C ausgefällt und dann 15 min bei 13000×g zentrifugiert (4°C). Nach Lösen in 200 µl H<sub>2</sub>O wurde die RNA auf eine Endkonzentration von 0.3 M NaAcetat eingestellt und mit dem 2.5 fachen Volumen Ethanol ausgefällt. Nach Waschen mit 80% Ethanol und Trocknen wurde der Niederschlag in 100 µl sterilem Wasser gelöst und mit 3 µl die Konzentration bestimmt.

## **11. Northern-Blot und Hybridisierung (Alwine et al., 1977; Denhardt, 1966)**

In eine Plastikwanne wurde 20× SSC (3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat pH 6.5) gefüllt. Auf einen Plastikständer in dieser Wanne wurde eine Glasplatte von der Größe des RNA-Gels gelegt und darüber drei Lagen Whatman® 3MM-Filterpapier, das mit 20× SSC angefeuchtet wurde und nun links und rechts der Glasplatte in die SSC-Lösung eingetaucht war. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Danach wurde das Gel an allen Seiten mit Parafilm®-Streifen umrandet, so daß das SSC nur durch das Gel gesaugt werden konnte. Auf das Gel wurde ein in Wasser und dann in 20× SSC getränktes Nitrocellulose-Filter in Gelgröße luftblasenfrei aufgelegt. Darüber kam nochmals ein 3MM-Filterpapier und dann ein Stapel Kleenex®-Tücher, die mit einer Glasplatte beschwert wurden. Geblotted wurde über Nacht. Der Nitrocellulose-Filter wurde dann kurz in 20× SSC gewaschen, luftgetrocknet und dann zwischen zwei Lagen 3MM-Filterpapier bei 80°C unter Vakuum zwei Stunden gebacken. Anschließend wurde der Filter in Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

**Prähybridisierung:** Die Prähybridisierung wurde im Plastikbeutel durchgeführt. Pro cm<sup>2</sup> Filterfläche wurden 0.2 ml Prähybridisierungs-Lösung genommen. Diese besteht aus 4× SSC, 1× Denhardt's (0.02% BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% PVP), 3.3% PiPPi (0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 0.1% SDS, 60 µg/ml denaturierte Salmon Sperm DNA. Die 65°C warme Prähybridisierungs-Lösung wurde in den Plastikbeutel pipettiert und dieser nach Herausdrücken von Luftblasen zugeschweißt und zwei Stunden bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

**Hybridisierung:** Für die Hybridisierung wurden 50 µl Hybridisierungs-Lösung pro cm<sup>2</sup> Filterfläche genommen. Diese besteht aus 4× SSC, 5× Denhardt's (0.1% BSA, 0.1% Ficoll,

0.1% PVP), 3.3 % PiPPi (0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 0.1% SDS, 60 µg/ml Salmon Sperm DNA und 30 ng/ml radioaktiv markierter Probe (etwa 1-10•10<sup>8</sup> cpm/µg). Die radioaktive Probe wurde vorher durch 15 min Kochen bei 100°C denaturiert, dann sofort auf Eis gestellt. Danach wurden die anderen Bestandteile der Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Die Prähybridisierungs-Lösung wurde aus dem Beutel herausgedrückt und durch die Hybridisierungs-Lösung ersetzt. Nach Entfernen der Luftblasen wurde der Plastikbeutel zugeschweißt und bei 65°C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde der Filter aus dem Plastikbeutel genommen und für je 30 min in 200 ml folgender Lösungen bei 65°C gewaschen: ① 2× SSC, 0.1% SDS; ② 1× SSC, 0.1% SDS; ③ 1× SSC, 0.1% SDS; ④ 0.5× SSC, 0.1% SDS.

Der noch feuchte Filter wurde wieder in einen Plastikbeutel eingeschweißt und auf einem Hyperfilm MP<sup>®</sup>, Amersham, mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert. Wenn der Filter mit einer anderen Probe nachhybridisiert werden sollte, wurde er zweimal 20 min bei 100°C mit 0.1× SSC gewaschen.

## 12. SP6-Polymerase-Kartierung (Melton et al., 1984; Miksicek et al., 1986)

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 100 µCi (250 pmol) α-<sup>32</sup>P-UTP in einem Endvolumen von 20 µl 1× SP6-RNA-Polymerase-Puffer (40 mM Tris pH 7.5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Spermidin, 10 mM DTT) mit 2 U/µl RNasin, 500 µM ATP, 500 µM CTP, 500 µM TTP, 12.5 µM UTP, 500 ng Matrizen-DNA und 10 U SP6-RNA-Polymerase gemischt. Die *in-vitro* Transkription erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 60 min. Danach wurde die Matrizen-DNA abgebaut. Es wurde 23 µl DEPC-Wasser, 5 µl 10× DNase-Verdaupuffer (1×: 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl RNasin (40 U/µl) und 4 µl RQ1-DNase (1 U/µl) zugegeben und weitere 10 min bei 37°C inkubiert wird. Anschließend wurde das Volumen auf 100 µl mit DEPC-Wasser erhöht und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Der Einbau der Radioaktivität wurde durch TCA-Präzipitation überprüft. 1 µl von der wässrigen Phase wurden auf einem Whatman<sup>®</sup> GF/C-Filter eingetrocknet (entspricht Gesamt-Radioaktivität). Ein weiterer µl der wässrigen Phase wurde auf einen Whatman<sup>®</sup> GF/C-Filter gegeben und mit 10% TCA 15 min auf Eis gefällt. Dieser Filter wurde zweimal mit 5% TCA und zweimal mit Methanol gewaschen und getrocknet (entspricht eingebauter Radioaktivität). Die GF/C-Filter wurden dann mit 5 ml Emulsifier Safe<sup>®</sup> im Szintillationszähler gemessen. Der Einbau beträgt etwa 40-70%. Zur wässrigen Phase wurde 10 µg tRNA gegeben und mit 2.5 M NH<sub>4</sub>Acetat und dem dreifachen Volumen Ethanol mindestens 2 Stunden bei -80°C gefällt. Die SP6-Probe wurde 20 min bei 13000×g

zentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 60-120 µl 80% FAB (80% Formamid deionisiert, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA pH 7.8) gelöst.

Es wurden jeweils 20-30 µg RNA mit Ethanol ausgefällt und mit 80% Ethanol gewaschen. Vor der Inkubation der radioaktiven Probe mit der RNA wurde bei RNA aus transient transfizierten Zellen diese noch einem DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurde die RNA in 50 µl 1× DNase-Verdaupuffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) mit 1 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl RQ1-DNase (1 U/µl) gelöst und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen auf 100 µl erhöht und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die RNA wurde dann mit 0.3 M NaAcetat und dem 2.5 fachen Volumen Ethanol ausgefällt. Nach Abzentrifugieren, Waschen mit 80% Ethanol und Trocknen wurde die RNA in 17 µl 80% FAB gelöst und dazu 3 µl der in 80% FAB gelösten radioaktiven SP6-Probe gegeben. Nach 5 min 85°C wurde über Nacht bei 45°C hybridisiert. Anschließend mußte die einzelsträngige RNA abgebaut werden. Zu den Proben wurden auf Eis 300 µl RNase-Verdaupuffer (300 mM NaAcetat pH 7.0, 10 mM Tris pH 7.6, 5 mM EDTA) mit 40 µg/ml RNase A und 600 U/ml RNase T1 gegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Zufügen von 2.5 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 0.2% SDS wurden durch 15 min Inkubation bei 37°C die Enzyme inaktiviert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die RNA wurde mit 5 µg tRNA versetzt und mit dem 2.5 fachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach Abzentrifugieren und Waschen mit 80% Ethanol wurden die Proben in 3 µl Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) gelöst, 3 min bei 95°C denaturiert und auf ein 6% Polyacrylamid/8.3 M Harnstoff-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25 Watt.

### **13. Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen**

Alle Zellen wurden bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% relative Feuchte inkubiert. Eine subkonfluente Kulturflasche wurde nach Waschen mit 10 ml kaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) mit 4 ml 0.25% Trypsin-Lösung versetzt. Nach 1 min Einwirkzeit wurde wieder abgesaugt. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in 10 ml kaltem Medium resuspendiert und auf Eis gestellt. Wenn die Zellen nicht eingefroren werden sollten, wurden alle Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Die Zellzahl wurde bestimmt. Die Zellen wurden dann 5 min bei 330×g zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium aufgenommen, so daß die Zellzahl 2-5•10<sup>6</sup>/ml betrug. Je 1 ml wurden in Einfriererörchen abgefüllt und 30 min auf Eis gestellt. Nach 2 Stunden bei -20°C und 1 Tag bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Zum Auftauen

wurde das Einfrierröhrchen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut war, wurde 5 ml warmes Medium zugegeben und die Zellen 5 min bei 330×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml Medium resuspendiert und in eine 80 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 10 ml Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmal gewechselt.

## **14. Transiente Transfektion und Behandlung von Zellen mit Induktoren**

### **DEAE-Dextran-Methode (Kawai und Nishizawa, 1984)**

HeLa wurden mit  $1.3 \cdot 10^6$ , T47D mit  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro 9 cm Petrischale 24 Stunden vor der Transfektion angesetzt. Für die Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml warmen 1× TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen. Nach Absaugen des TBS wurde 1 ml DNA–DEAE-Dextran–Mischung (10 µg DNA, 500 µg/ml DEAE-Dextran in 1× TBS) auf die Zellen gegeben, die dann 30 min bei RT stehenblieben. Alle 5 min wurden die Petrischalen geschwenkt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 10 ml 1× TBS gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben. Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) gewaschen und dann 10 ml frisches Medium zugegeben, das die entsprechenden Induktoren enthielt.

Bei UV-Bestrahlungen wurden die Zellen nach Waschen mit PBS im trockenen Zustand in der Petrischale mit offenem Deckel bestrahlt. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine Dosis von 20 J/m<sup>2</sup> verwendet. TPA (in DMSO) wurde in einer Endkonzentration von 60 ng/ml zugesetzt. NQO (in EtOH) wurde in einer Endkonzentration von 1.3 µM und MMC (in H<sub>2</sub>O) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Forskolin (in DMSO) wurde in einer Endkonzentration von 20 µM eingesetzt. Zur Blockierung der Proteinsynthese wurde 10 µg/ml Cycloheximid (in H<sub>2</sub>O) oder 100 µM Anisomycin (in EtOH) 15 min vor Behandlung mit dem Induktor gegeben. Zur Hemmung von Proteinkinasen wurde H7 (in EtOH) in einer Endkonzentration von 80 µM eingesetzt. Der Einfluß der Lösungsmittel auf die Genexpression wurde ebenfalls getestet und zeigte, wenn nicht gesondert angegeben, keinen Effekt.

## **DEAE-Dextran-Methode für Lymphocyten**

$1 \cdot 10^7$  Molt-4 oder Jurkat Zellen (~40 ml) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase 5 min bei  $1200 \times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 10 ml warmen  $1 \times$  TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1 ml DNA-DEAE-Dextran-Mischung (10  $\mu\text{g}$  DNA, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEAE-Dextran in  $1 \times$  TBS) aufgenommen und 30 min bei RT unter öfterem Mischen inkubiert. Danach wurden die Zellen für exakt 3 min mit 10% DMSO behandelt (666  $\mu\text{l}$  25% DMSO in  $1 \times$  TBS), zweimal mit 10 ml  $1 \times$  TBS gewaschen und wieder in 40 ml Medium aufgenommen. 8 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Induktoren, wie oben beschrieben, behandelt. Für UV-Bestrahlungen wurden die zentrifugierten Zellen in 2 ml PBS (123 mM NaCl, 17 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3) aufgenommen, auf eine 9 cm Petrischale verteilt, mit  $20 \text{ J}/\text{m}^2$  bestrahlt, von der Platte wieder abgespült und nach Zentrifugieren in 40 ml Medium aufgenommen.

## **CaPO<sub>4</sub>-Methode (Graham und van der Eb, 1973)**

F9 wurden mit  $8 \cdot 10^5$ , NIH 3T3 mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro 9 cm Petrischale 24 Stunden vor Transfektion angesetzt. Drei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium nochmal gewechselt. Für die Herstellung des Präzipitates wurde zu 10  $\mu\text{g}$  DNA in 475  $\mu\text{l}$   $1 \times$  HBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM D-Glucose, 21 mM HEPES pH 7.10) tropfenweise 25  $\mu\text{l}$  2.5 M  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. Das Präzipitat wurde 20 bis 25 min bei RT stehen gelassen. 475  $\mu\text{l}$  dieser Mischung wurden dann in dem Medium einer Petrischale verteilt. Nach 8 bis 12 Stunden Inkubation des Präzipitats mit den Zellen im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3) gewaschen und frisches Medium zugegeben, das, wie oben beschrieben, mit den entsprechenden Induktoren versetzt wurde.

## **15. CAT-Assay (Gorman et al., 1982b)**

42 Stunden nach Behandlung mit Induktoren wurden die Zellen einer Petrischale für den CAT-Assay geerntet. Dazu wurden sie zweimal mit 10 ml  $1 \times$  TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) gewaschen und in 1 ml  $1 \times$  TBS mit einem Gummischaber abgeschabt. Nach 5 min Zentrifugieren bei  $3000 \times g$  wurde das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  0.25 M Tris pH 7.8 resuspendiert und die Zellen

durch dreimaligen Gefrierschock aufgebrochen. Dazu wurden sie für 15 min in ein Trockeneis/Ethanol-Bad gestellt, dann für 5 min in ein 37°C Wasserbad und danach kräftig geschüttelt. Die aufgebrochenen Zellen wurden 10 min bei 13000×g abzentrifugiert und die 100 µl Proteinextrakt abgenommen.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode bei 735 nm (Lowry et al., 1951). Für die Erstellung einer Eichkurve wurden 5 bis 80 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml in Lowry-Reagenz I) und 10 µl 0.25 M Tris, pH 7.8 mit Lowry-Reagenz I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 M NaOH) auf 500 µl aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden jeweils 10 µl in 490 µl Lowry-Reagenz I gegeben. Zu diesen 500 µl wurde 1 ml frisch hergestelltes Lowry-Reagenz IV (1 ml Lowry-Reagenz I mit 100 ml 2% NaK-Tartrat und 1 ml 1% CuSO<sub>4</sub>) gemischt und 15 min stehen gelassen. Danach wurden unter sofortigen Mischen 100 µl 50% Folin-Lösung zugegeben. Nach 90 min bei RT im Dunkeln wurden die Proben nochmal gemischt und dann die Extinktion bei 735 nm gemessen. Anhand der Eichkurve kann man dann die Proteinkonzentration in den Proben bestimmen.

Für den CAT-Assay wurde von den Transfektionsansätzen jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt, die mit 0.25 M Tris pH 7.8 auf 80 µl aufgefüllt wurde. Nach Zugabe von 2 µl <sup>14</sup>C-Chloramphenicol wurde die Reaktion mit 20 µl 4 mM Acetyl-Coenzym A (in 0.25 M Tris pH 7.8) gestartet. Nach genau zwei Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat abgestoppt. Durch kurzes Mischen für 10 Sekunden wurde das Chloramphenicol aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren wieder getrennt und die Ethylacetat-Oberphase abgenommen. Das Ethylacetat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Chloramphenicol wurde in 15 µl Ethylacetat wieder gelöst und punktweise auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Als Laufmittel dienten 150 ml Chloroform:Methanol (9:1) in einer Glas-Chromatographie-Kammer. Nach 50 min wurde die Chromatographie abgebrochen. Nach Lufttrocknung der DC-Platte wurde diese auf einem Hyperfilm MP<sup>®</sup>, Amersham, bei -80°C mit Verstärkerfolie über Nacht exponiert.

Nach Entwicklung des Filmes konnte man die Lage der radioaktiven Flecken auf der DC-Platte markieren. Das unacetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am wenigsten. Die 1'-acetylierte, die 3'-acetylierte und die 1',3'-diacetylierten Formen wandern in der angegebenen Reihenfolge immer weiter. Zur Auswertung wurden die unacetylierte Form und die acetylierten Formen ausgeschnitten und mit 5 ml Emulsifier Safe<sup>®</sup> in einem Szintillationszähler 2 min gemessen. Nach Abzug des cpm-Hintergrunds und der schon im Chloramphenicol von vornherein enthaltenen acetylierten Formen kann berechnet werden, wieviel Prozent des Chloramphenicols acetyliert wurden. Weiterhin kann man die spezifische Enzymaktivität in pmol•mg<sup>-1</sup>•min<sup>-1</sup> berechnen, da bekannt ist, wieviel

pmol  $^{14}\text{C}$ -Chloramphenicol eingesetzt wurde (7000 pmol), wieviel Substrat in 120 min acetyliert wurde und welche Proteinmenge eingesetzt wurde.

## 16. Extrakt-Präparation aus eukaryontischen Zellen

### Gesamtzell-Extrakte

Extrakte wurden aus einer subkonfluenten 9 cm Petrischale ( $\sim 5 \cdot 10^6$  Zellen) präpariert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3) gewaschen, mit einem Gummischaber abgeschabt und in 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem Lysispuffer (250 mM Tris pH 7.5, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen im Trockeneis/Ethanol-Bad wurden die Zellen aufgebrochen. Der Gesamtzell-Extrakt wurde durch 15 min Zentrifugieren bei  $13000\times g$  von den Zelltrümmern befreit. Alle Schritte wurden bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. DTT und PMSF wurde den Puffern frisch zugesetzt. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach der Lowry-Methode (siehe unter CAT-Assay) bestimmt.

### Kern-Extrakte

Extrakte wurden aus einer subkonfluenten 9 cm Petrischale ( $\sim 5 \cdot 10^6$  Zellen) präpariert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3) gewaschen, mit einem Gummischaber abgeschabt und in 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem Zell-Lysispuffer (10 mM HEPES $\cdot$ KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen. Nach exakt 5 min auf Eis wurden die intakten Kerne der aufgebrochenen Zellen durch 5 min Zentrifugieren bei  $1000\times g$  vom Cytoplasma-Extrakt abgetrennt. Der Cytoplasma-Extrakt wurde mit  $\frac{1}{2}$  Volumen Kern-Puffer (250 mM Tris pH 7.5, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) verdünnt und nochmals 15 min bei  $13000\times g$  klar zentrifugiert. Die Kerne wurden einmal vorsichtig mit Zell-Lysispuffer ohne NP-40 gewaschen und dann in 100  $\mu\text{l}$  Kern-Puffer aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen im Trockeneis/Ethanol-Bad wurden die Kerne aufgebrochen. Der Kern-Extrakt wurde durch 15 min Zentrifugieren bei  $13000\times g$  von den Kerntrümmern befreit.

Alternativ wurden in einigen Experimenten die Kerne in 50  $\mu\text{l}$  Hochsalz-Kern-Puffer (250 mM Tris pH 7.5, 600 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen, durch Gefrierschock aufgebrochen, 30 min bei  $140000\times g$  zentrifugiert und anschließend mit dem gleichen Volumen 10 mM HEPES $\cdot$ KOH pH 7.9, 1 mM EDTA, 8%

Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF verdünnt. Durch die Extraktion der Kerne mit 600 mM KCl erhöht man noch etwas die Menge an Transkriptionsfaktoren im Extrakt (getestet im "Bandshift"-Assay). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. DTT und PMSF wurde den Puffern frisch zugesetzt. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach der Lowry-Methode (siehe unter CAT-Assay) bestimmt.

## 17. Konzentration einer Proteinlösung

Die wässrige Proteinlösung wurde mit  $\frac{1}{3}$  Volumen 50% TCA versetzt und die Proteine 20 min auf Eis gefällt. Alternativ wurde auch mit dem vierfachen Volumen Aceton 30 min bei -80°C gefällt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 13000×g wurde das Proteinpellet noch zweimal mit 100% Ethanol gewaschen.

## 18. Proteingele

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein 10% Acrylamid-Gel mit einem 5% Kammgel benutzt, das zwischen zwei 14×15 cm große Glasplatten gegossen wird. Die Glasplatten wurden durch 1 mm dicke Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennt. Für 40 ml einer 10% Trenngel-Lösung werden 13.2 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung mit 10 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 16.6 ml Wasser und 0.2 ml 20% SDS in einer Saugflasche 2 min entgast. Nach Zugabe und Mischen von 10 µl TEMED und 80 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung wurde das Gel bis zu einer Höhe von 1.5 cm unterhalb des Kamms gegossen. Sofort nach dem Gießen wurde es mit 0.1% SDS überschichtet. Wenn nach 30 bis 45 min die Phasengrenze wieder erschien, war das Trenngel auspolymerisiert. Das SDS wurde abgegossen und der Platten-Zwischenraum nach zweimaligen Spülen mit Wasser mit einem Papier getrocknet. Für das 5% Kammgel wurden 3.4 ml der deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung mit 5 ml 0.5 M Tris pH 6.8, 11.5 ml Wasser und 0.1 ml 20% SDS zwei Minuten entgast und mit 20 µl TEMED sowie 100 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung versetzt. Das Kammgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach 15 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen sofort mit 1× Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3) ausgespült. Die Gelplatte wurde dann senkrecht in eine Elektrophorese-

Apparatur eingespannt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je etwa 400 ml 1× Laemmli-Laufpuffer. Es wurden dann 80 V angelegt, bis die Proben in das Kammgel eingelaufen waren, 100 V bis die Proben im Trenngel waren und maximal 30 mA zur Auftrennung im Trenngel bis zum Herauslaufen der Bromphenolblau-Bande aus dem Gel. Über Nacht wurden die Gele bei 40 V im Kühlraum gefahren. Das Gel wurde dann von den Glasplatten gelöst, 10 min mit 10% Essigsäure fixiert, auf Whatman® 3MM-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und in einer Geltrockner-Apparatur getrocknet. Das auf dem Filterpapier festgetrocknete Gel wurde direkt auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP®, Amersham) bei -80°C exponiert.

Gele mit <sup>35</sup>S-markierten Proteinen wurden vor Trocknen mit PPO aktiviert. Dazu wurden sie zunächst dreimal in je 1 l DMSO für je 30 min zur Entwässerung geschüttelt. Anschließend erfolgte die Aktivierung für mindestens 4 Stunden in einer Lösung von 22.2 g PPO in 100 ml DMSO. Danach wurde das geschrumpfte Gel unter fließendem Wasser bis zur Normalgröße gewässert.

In einigen Fällen wurde eine Mini-SDS-Gelapparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments mit einer Gelgröße von 10× 8.3 cm und einer Geldicke von 0.75 mm benutzt.

### **Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen**

Das Proteingel wurde in Coomassie-Blau-Färbelösung (46% Methanol, 8% Essigsäure, 0.2% Coomassie Blau) unter leichtem Schwenken etwa 15 min gefärbt und mit 20% Methanol, 7% Essigsäure so lange unter öfterem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren.

### **Silber-Färbung von Proteingelen**

Das Proteingel wurde für 2 Stunden in 50% Methanol fixiert. In der Zwischenzeit wurde Lösung A (1.6 g AgNO<sub>3</sub> in 8 ml H<sub>2</sub>O lösen) und Lösung B (15.12 ml 1% NaOH mit 26.88 ml H<sub>2</sub>O versetzen und 2.8 ml konzentrierten Ammoniak zugeben) vorbereitet. Lösung C wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt: Lösung A tropfenweise in Lösung B geben (wenn ein brauner Niederschlag auftritt, ist dieser mit konzentriertem Ammoniak wieder aufzulösen). Dann mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen und das Gel in dieser Lösung 15 min färben. Danach wurde das Gel 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und in Lösung D (2.5 ml 1% Zitronensäure und 0.25 ml 38% Formaldehyd mischen und mit H<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen) entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Das Gel wurde dann sofort

herausgenommen und in H<sub>2</sub>O gewaschen. (Für diese Färbemethode sind absolut saubere Gefäße nötig und das Gel darf nur mit Handschuhen berührt werden.)

## **19. Überexpression von Proteinen in Bakterien und Präparation der Fusionsproteine (modifiziert nach Hager und Burgess, 1980)**

*E. coli* DH5 Bakterien wurden mit den Plasmiden ATH2, TE-*v-jun* und TE-*c-jun* transformiert. TE-*v-jun* und TE-*c-jun* sind Expressionsvektoren, die für ein Fusionsprotein aus dem Amino-terminalen Bereich des Tryptophan-E Gens und dem gesamten vJun-Protein bzw. der DNA-Bindedomäne von cJun kodieren (Angel et al., 1988a). ATH2 ist der Kontrollvektor, der nur für den Tryptophan-E Anteil kodiert. Mit diesen Bakterien wurde eine 10 ml Kultur mit M9-Medium (40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 19 mM NH<sub>4</sub>Cl, 8.5 mM NaCl, 2 mM MgAcetat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2% Glucose, 10 µg/ml Thiamin, 0.5% Casaminsäure, 100 µg/ml Ampicillin) mit 20 µg/ml Tryptophan (in DMSO) 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden dann 5 min bei 2000×g zentrifugiert, mit M9-Medium ohne Tryptophan gewaschen und in 100 ml M9-Medium ohne Tryptophan bis zu einer Dichte von E<sub>600</sub>=0.5 wachsen gelassen. Bakterielle Proteine aus 500 µl dieser Kultur und 500 µl von der ersten Kultur in tryptophan-haltigen Medium wurden nach Aufbrechen der Zellen in Laemmli-Probenpuffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0.02% Bromphenolblau) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt, um die Expression der transfizierten Plasmide zu kontrollieren.

Die Bakterien der 100 ml Kultur wurden 10 min bei 4000×g zentrifugiert. Der Bakterien-Niederschlag wurde in 20 ml 10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym, 1 mM PMSF aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligen Gefrierschock im Trockeneis/Ethanol-Bad wurde dreimal 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Stufe 6, pulse 50%). Die unlöslichen Proteine wurden 10 min bei 8000×g abzentrifugiert und der Niederschlag viermal unter gutem Schütteln mit 10 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 gewaschen. Nach weiteren dreimaligen Waschen mit 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 wurde der Niederschlag aus unlöslichen Proteinen in 1.5 ml Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt, 3 min gekocht und die Hälfte davon in die 12 cm breite Tasche eines 14×15 cm großen, 2 mm dicken 10% SDS-Gel aufgetragen. Zur späteren Identifizierung der Proteine wurde in eine Spur 1 µl Protein-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Diese Spur wurde nach Lauf des Gels abgeschnitten und mit Coomassie-Blau gefärbt. Der Rest des Gels wurde 15 min bei 4°C in 0.25 M KCl, 1 mM DTT gefärbt. Die weiße Bande, die den überexprimierten Proteinen entsprach, wurde ausgeschnitten, zweimal 15 min in eiskaltem

H<sub>2</sub>O, 1 mM DTT gewässert und anschließend zerkleinert. Nach Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 5 mM DTT) wurde eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Gelstücke wurden über Glaswolle filtriert, mit 500 µl Elutionspuffer nachgespült und die eluierten Proteine mit dem vierfachen Volumen Aceton ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 13000×g, Waschen mit 80% Aceton/20% 10 mM HEPES•KOH pH 7.9, 1 mM EDTA wurde der Protein-Niederschlag getrocknet. Die Proteine wurden dann in 200 µl 6 M Guanidinium•HCl, 10 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA gelöst, 30 min bei RT inkubiert und 5 min bei 13000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde über 1.5 ml Sephadex® G25 (äquilibriert in 10 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA) filtriert. Nach Zugabe von Glycerin zu einer Konzentration von 10% wurde 12 Stunden bei 4°C renaturiert.

## 20. <sup>35</sup>S-Markierung von Proteinen

Eine 9 cm Petrischale wurde mit  $1.8 \cdot 10^6$  Zellen angesetzt und nach 24 Stunden einen Tag in Medium mit 0.5% FCS gehungert. Anschließend wurde mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) gewaschen und Medium ohne Methionin mit 0.5% FCS für 2 Stunden auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit 4 ml dieses Mediums und 60 ng/ml TPA für 45 min inkubiert, bevor 500 µCi L-<sup>35</sup>S-Methionin zugesetzt und weitere 45 min inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS abgeschabt, 3 min bei 1000×g (4°C) zentrifugiert und in 800 µl eiskaltem RIPA-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>, 1% Triton® X-100, 1% DOC, 0.1% SDS, 10 mM NaMO<sub>4</sub>, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Aprotinin, 100 µM Benzamidin) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 140000×g (4°C) zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingefroren.

## 21. Immunpräzipitation

25% des RIPA-Extrakts einer 9 cm Petrischale (siehe oben) wurde für zweimal eine Stunde mit 1 µl Kontroll-Kaninchenserum und 10 µl Protein A-Sepharose (1:1 mit TSA (10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>) äquilibriert) unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Nach 15 Sekunden Zentrifugieren bei 10000×g wurde der Überstand mit 1 µl polyklonalen Kaninchenserum oder 1 µl Maus-Ascites-Antikörper und 10 µl Protein A-Sepharose (1:1 mit TSA äquilibriert) für 2 Stunden unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde 15 Sekunden bei 10000×g zentrifugiert und mit folgenden Puffern je einmal

gewaschen: ① 10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>, 1% Triton<sup>®</sup> X-100; ② 10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>, 1% Triton<sup>®</sup> X-100; ③ 10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>; ④ 50 mM Tris pH 6.8. Vor dem letzten Wasch-Schritt wurde das Reaktionsgefäß gewechselt. Nach dem letzten Wasch-Schritt wurde das Pellet mit einer Kanüle (0.40×21 mm) trockengesaugt und in 40 µl 1× Laemmli-Probenpuffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0.02% Bromphenolblau) aufgenommen. Nach 3 min Kochen wurden die Proben zusammen mit 2 µl <sup>14</sup>C-methylierten Proteinen als Längenstandard auf einem 14×15 cm großen 10% SDS-Gel aufgetrennt, mit PPO aktiviert und auf Hyperfilm MP<sup>®</sup>, Amersham, bei -80°C mit Verstärkerfolie exponiert.

## 22. Proteinbindung an DNA, *in-vitro*

### DNA-Affinitätschromatographie

Cyanbromid-aktivierte Sepharose wurde mit multimerisierten Oligonukleotiden nach dem Protokoll von Kadonaga und Tjian (1986) gekoppelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Affinitätssäulen wurden von S. Gebel und W. Kugler, Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Die Säule wurde durch zweimal Waschen in Regenerationspuffer (5 mM Tris pH 7.6, 2.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA), zweimal Waschen in Aufbewahrungspuffer (10 mM Tris pH 7.6, 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.03% NaN<sub>3</sub>), dreimal Waschen in Bindepuffer (10 mM HEPES•KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA) vorbereitet. Zur Verarmung von Extrakten an Transkriptionsfaktoren wurde 250 µg Kernextrakt in 250 µl 10 mM HEPES•KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF mit 2 µg poly (dIdC) 10 min bei 4°C inkubiert und dann mit 30 µl Säulenmaterial (~30 ng gekoppeltes Oligonukleotid) versetzt. Nach einer Stunde Rotation bei 4°C wurde 15 Sekunden mit 10000×g zentrifugiert und die Inkubation des Überstandes mit frischem Säulenmaterial zweimal wiederholt.

### "Bandshift"-Analysen

5 µg Kernextrakt wurden mit 0.5 µg poly (dIdC) in 16 µl 10 mM HEPES•KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 4% Ficoll 400, 1 mM DTT 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 fmol radioaktiv markiertes Oligonukleotid (~20000 cpm) in 4 µl des obigen Puffer zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden dann direkt auf ein 14×15 cm großes 4% Acrylamid-Gel (30:0.8) in 0.25× TBE aufgetragen.

Laufpuffer war ebenfalls 0.25× TBE. Die Elektrophorese erfolgte mit 10 V/cm bei RT bis die Bromphenolblau-Bande eines parallel aufgetragenen Farbmarkers 6 cm zurückgelegt hatte. Das Gel wurde dann 10 min in 10% Essigsäure fixiert, auf einem Whatman® 3MM-Papier getrocknet und auf Hyperfilm MP®, Amersham, bei -80°C exponiert. "Bandshift"-Analysen von DNA-affinitätsgereinigtem NF-κB wurden in 12 mM HEPES•NaOH pH 7.9, 4 mM Tris pH 7.9, 60 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM EDTA, 12% Glycerin, 5 mM DTT, 3 mM GTP, 5 µg BSA durchgeführt.

### **"UV-Crosslink" von Proteinen mit DNA**

400 µg Kernextrakt wurden mit 10 µg poly (dIdC) in 300 µl 10 mM HEPES•KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 4% Ficoll 400, 1 mM DTT 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 fmol radioaktiv markiertes Oligonukleotid zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 10 µg poly (dIdC) wurden die Ansätze als Tropfen auf Parafilm® für 20 min auf Eis mit UV 254 nm bestrahlt (~200 kJ/m<sup>2</sup>). Nach Erhöhen der Salzkonzentration mit NaCl auf 140 mM wurden die Proben immunpräzipitiert (4 µl Antikörper) und auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt.

# ERGEBNISSE

## 1. DNA-Schaden als Zwischenprodukt in der Aktivierung von Genen durch UV

UV-Bestrahlung von Säugetier-Zellen führt zu einem Anstieg der RNA-Mengen einer Vielzahl von Genen (Übersicht in Kaina et al., 1989b): Metallothionein (Abb. 2, und Angel et al., 1986; Fornace Jr. et al., 1988); Collagenase (Abb. 1-4, und Angel et al., 1987a); HIV-1 (Abb. 3, 4, und Stein et al., 1989b; Valerie et al., 1988); *c-jun* (Abb. 3, 4) und *c-fos* (Abb. 1, und Angel et al., 1985). UV muß daher in der Zelle eine Signalkette in Gang setzen, die an den entsprechenden Genen endet. Was ist das primäre Ereignis für die Auslösung der UV-Antwort?

### Aktionsspektrum der UV-induzierten Genexpression

UV kann nur dann Wirkung im chemischen/biochemischen Bereich zeigen, wenn UV-Energie absorbiert wird. Eine Reihe von Molekülen mit chromophoren Gruppen kommt daher als "Rezeptor" der UV-Strahlung in Frage. Dies können Substanzen mit aromatischen Ringsystemen oder konjugierten Doppelbindungen wie Nukleinsäuren, Pyrrol-Ringe, tyrosin-haltige Moleküle und Steroide, also Substanzen, die sowohl im Zellkern, im Cytoplasma als auch in der Zellmembran zu finden sind, sein. Jede dieser Substanzen ist durch ein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum ausgezeichnet. Um festzustellen, welche davon in Frage kommen, die Signalkette zu den UV-induzierbaren Genen auszulösen, wurde ein Aktionsspektrum der UV-induzierten Genexpression, das mit dem Absorptionsspektrum des verantwortlichen Moleküls übereinstimmen sollte, gemessen. Dafür wurden primäre menschliche Fibroblasten oder HeLa Zellen mit monochromatischem UV der Wellenlänge 240 nm bis 303 nm sowie 345 nm und 360 nm bestrahlt (Abb. 1). Die UV-Bestrahlung mit dem kontinuierlichen Spektrum von 240 bis 303 nm wurde am Institut für Strahlenbiologie, Giessen bei J. Kiefer durchgeführt. Technische Details sind in Materialien und Methoden erläutert. Es wurde für jede Wellenlänge eine Dosis-Optimumskurve der Genaktivierung aufgenommen. Dazu wurden die Transkripte der endogenen Collagenase und des *c-fos* Gens bestimmt sowie die CAT-Aktivität von transient transfizierten Collagenase- und HIV-1 CAT-Konstrukten. Beispiele für Dosis-Optimumskurven sind in Abb. 2 zusehen. Die relative Genaktivität pro Quantum, erhalten mit einer halb-maximalen Dosis, wurde dann gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abb. 1). Es war aus technischen Gründen nicht immer möglich, für jede Wellenlänge eine vollständige Dosis-Optimumskurve

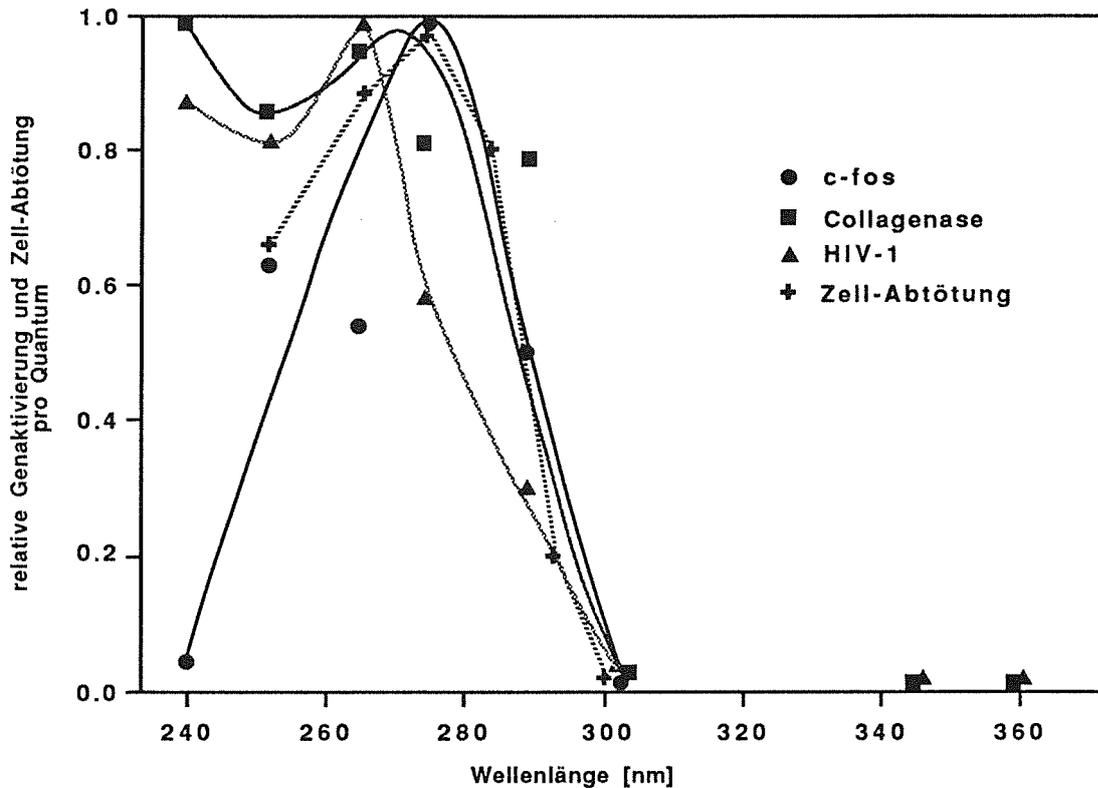


Abb. 1 Aktionsspektrum der UV-induzierten Genexpression. Es wurde die Effizienz der Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen in der Genaktivierung bestimmt. Die relative Aktivität pro Quantum, erhalten mit einer halb-maximalen Dosis, wurde gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Genaktivität wurde durch S1 Nuklease-Kartierung (Berk und Sharp, 1977) von polyA<sup>+</sup>-RNA des endogenen *c-fos* und Collagenase Gens (in primären menschlichen Hautfibroblasten) gemessen (Stein et al., 1989b). Die RNA wurde 45 min (zur Bestimmung der *c-fos* mRNA) und 36 h (zur Bestimmung der Collagenase mRNA) nach Bestrahlung der Zellen präpariert. Für Kontrolle auf gleiche RNA-Menge wurde die RNA auch mit einem cDNA-Klon hybridisiert, der von einem Gen stammt, das nicht durch UV beeinflusst wird (K7; Angel et al., 1986). Die HIV-1-Aktivität eines transient transfizierten HIV-1 CAT-Konstrukts (-121/+232 HIV-1 CAT) in HeLa Zellen wurde im CAT-Assay bestimmt. Das Aktionsspektrum der Zellabtötung (Chinesische Hamster Zell-Linie V79) wurde von Zölzer und Kiefer (1984) nachgezeichnet. Die Zellen wurden bestrahlt wie in Materialien und Methoden beschrieben.

zu messen, was zu geringen Fehlern bei der Bestimmung der halb-maximalen Dosis führen konnte.

Die Aktionsspektren der Aktivierung aller hier untersuchter Gene zeigen ein Optimum bei 265 bis 275 nm und fallen zu längeren Wellenlängen steil ab. Schon bei 280 bis 290 nm erreicht man nur noch halb-maximale Genaktivierung und bei 345 und 360 nm erhält man mit UV-Dosen bis zu 2000 J/m<sup>2</sup> keine Genaktivierung mehr. Eine Lampe, die Strahlung im sichtbaren Bereich ohne UV abgab, verursachte mit Dosen bis zu 600000 J/m<sup>2</sup> keine Aktivierung der oben erwähnten Gene. Die Spektren zwischen 240 und 303 nm stimmen mit dem Spektrum der Zellabtötung überein, das mit derselben UV-Bestrahlungsquelle erhalten wurde (Abb. 1; nachgezeichnet von Zölzer und Kiefer, 1984), und mit dem Spektrum der Thymidin-Dimer-Bildung (Rosenstein und Mitchell, 1987). Das Absorptionsspektrum von isolierter DNA oder die Inaktivierung von Phagen haben dagegen ein zu 260 nm

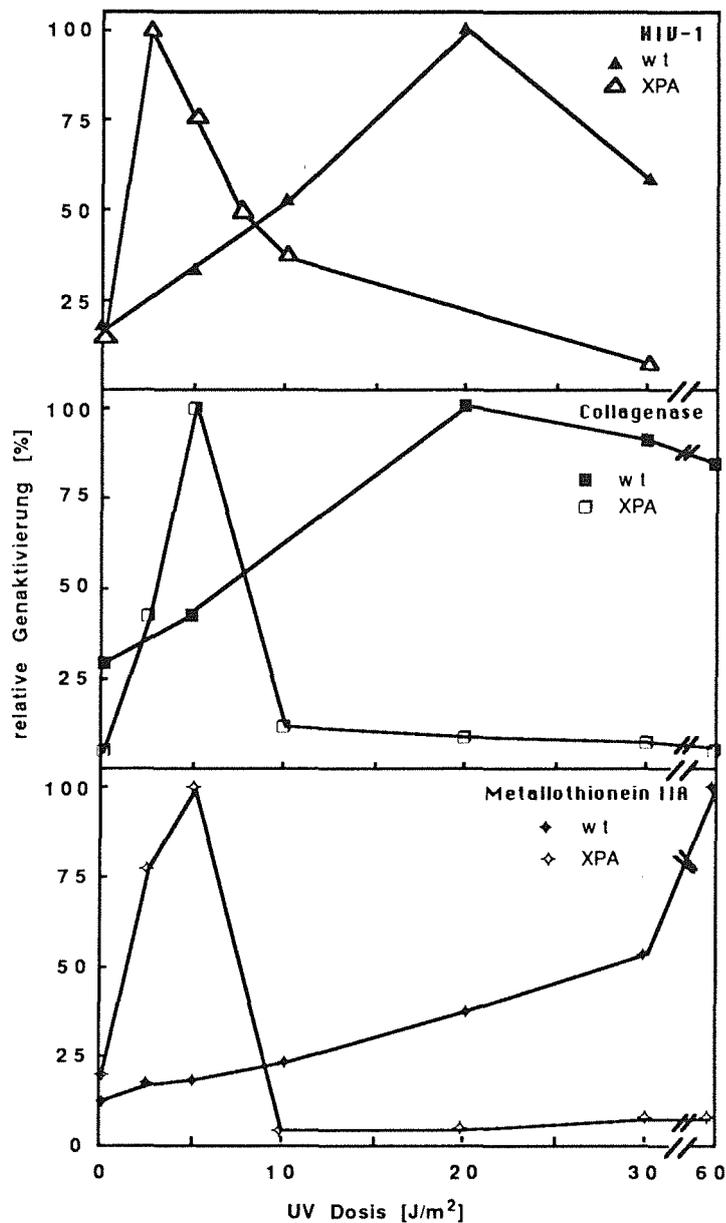
verschobenes Optimum (Daten nicht gezeigt). Dieser Unterschied wird einer bevorzugten Absorption von kurzwelligem UV im Cytoplasma zugeschrieben, was ein Kern-DNA-Absorptionsspektrum zu längeren Wellenlängen verschiebt (Sakharov und Blokhin, 1983). Die Daten der Aktionsspektren lassen darauf schließen, daß nukleinsäure-haltige Moleküle wie DNA oder RNA, aber auch NAD und andere aromatische Verbindungen in der UV-Aktivierung eine Rolle spielen können. Die Absorption durch typische Membranbestandteile wie Proteine und Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen, die zu anderen Wellenlängen verschobene Optima der Absorption haben, kann dagegen ausgeschlossen werden (Rao, 1961).

### **Dosis-Effektkurven der Genexpression in Zellen mit einem DNA-Reparaturdefekt**

Als Konsequenz der absorbierten UV-Strahlung entstehen hauptsächlich Thymin-Dimere und Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukte in der DNA. Es war daher naheliegend zu untersuchen, ob der UV-induzierte DNA-Schaden ein notwendiges Zwischenprodukt in der Genaktivierung ist. Dazu wurden Dosis-Effektkurven der Genaktivierung in primären menschlichen Hautfibroblasten von einer gesunden Person und von einem Patienten mit Xeroderma pigmentosum Gruppe A (XPA) bestimmt. XPA-Zellen unterscheiden sich von den gesunden Zellen lediglich darin, daß UV-induzierte DNA-Schäden nicht repariert werden können (Cleaver, 1969). Deshalb sollte in diesen Zellen eine niedrigere UV-Dosis als in den gesunden Fibroblasten ausreichen, um eine gewisse Zeit nach der Bestrahlung die gleiche Menge an DNA-Schäden in der Zelle vorzufinden (Miskin und Ben-Ishai, 1981; Schorpp et al., 1984).

Für alle hier untersuchten Gene wurde ein deutlicher Unterschied in der Dosis-Effektkurve beobachtet. In XPA-Zellen ist eine Dosis von 2 bis 5 J/m<sup>2</sup> für eine optimale Induktion ausreichend, während in den Wildtyp-Zellen eine rund 10 fach höhere Dosis nötig ist (Abb. 2). Dies trifft sowohl für die Aktivierung der endogenen Collagenase und Metallothionein Gene (Abb. 2, Collagenase, Metallothionein-IIA), als auch für ein transient transfiziertes HIV-1 CAT-Konstrukt (Abb. 2, HIV-1) und Collagenase CAT-Konstrukt (Daten nicht gezeigt) zu. Diese Daten sprechen für DNA als primärer "Rezeptor" von UV und für die Beteiligung eines DNA-Schadens in der UV-induzierten Genaktivierung.

Ähnlich wie UV können auch andere DNA-schädigende Agenzien die Expression von Genen erhöhen. Mitomycin C (MMC),  $\gamma$ -Bestrahlung und 4-Nitroquinolinoxid (NQO) sind Beispiele dafür. Für mehrere Gene wurde eine transkriptionelle Aktivierung durch diese Agenzien beschrieben (Angel et al., 1986; Rahmsdorf et al., 1982; Valerie et al., 1988). Beispiele werden in dieser Arbeit gezeigt (Tabelle 1 auf Seite 54, Abb. 5B).



**Abb. 2** DNA-Schaden als Zwischenprodukt in der UV-induzierten Genexpression. Es wurde die Genaktivierung nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen von UV 254 nm in primären menschlichen Hautfibroblasten einer gesunden Person (wt) und eines Patienten mit Xeroderma pigmentosum Gruppe A (XPA) gemessen. Die HIV-1-Transkription wurde durch Messen der CAT-Aktivität eines transient transfizierten -121/+232 HIV-1 CAT-Konstrukts bestimmt. Die Collagenase und Metallothionein-IIA mRNA-Anhäufung wurde 36 h nach Bestrahlung durch Northern Blot Hybridisierung der endogenen RNAs mit radioaktiven cDNA-Proben (Stein et al., 1989b) gemessen. Die RNA-Menge wurde wie in Abb. 1 beschrieben kontrolliert.

Der durch die Behandlung der Zelle mit DNA-schädigenden Agenzien verursachte DNA-Schaden ist ausreichend für die Auslösung der UV-Antwort. Die direkte Behandlung kann auch durch das Einbringen von UV-bestrahlten oder carcinogen-geschädigten irrelevanten DNA-Sequenzen ersetzt werden (Mai et al., 1989). Damit ist auch gezeigt, daß der Ort des DNA-Schadens und der Ort der Genaktivierung unterschiedlich sein können.

Die entstandenen DNA-Schäden werden durch Reparaturenzyme erkannt und durch Reparaturprozesse wieder entfernt. Dabei kann es zu weiteren Änderungen in der DNA-Struktur kommen. Diese sekundären Änderungen der Struktur spielen aber vermutlich keine Rolle für die UV-Antwort, da in XPA-Zellen diese Prozesse nicht ablaufen können. Das auslösende Signal ist möglicherweise die geänderte DNA-Struktur nach Einwirkung der DNA-schädigenden Agenzien. Eine Blockierung der Replikation der DNA kann ausgeschlossen

werden, da Induktion durch UV von mindestens sechs Genen (*c-fos*, *c-jun*, Collagenase, Metallothionein, HIV-1, SV40) auch in sich nicht-teilenden Zellen nachgewiesen wurde (Kaina et al., 1989b; Stein et al., 1989b; und unveröffentlicht).

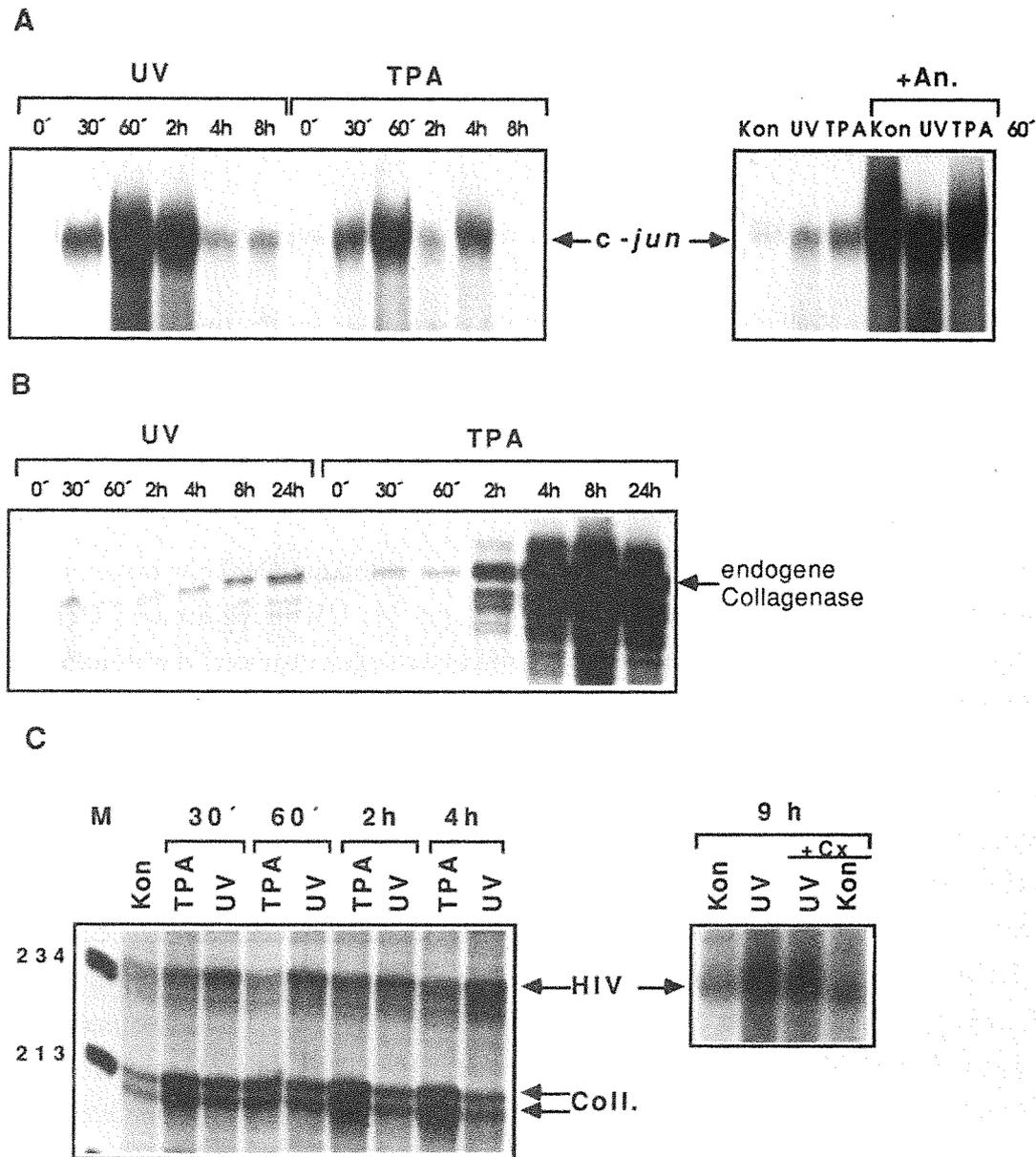
## 2. Transkriptionelle Regulation der UV-aktivierbaren Gene

In UV-bestrahlten Zellen ist die Menge an RNA des endogenen Collagenase und *c-jun* Gens sowie eines transient transfizierten HIV-1 und Collagenase CAT-Konstrukts erhöht (Abb. 3, 4). Ursache dafür kann eine verstärkte Transkription der entsprechenden Gene sein, UV könnte aber auch die Lebenszeit der RNA erhöhen oder die transkriptionelle Verlängerung der RNA (Elongation) beeinflussen.

Um dies aufzuklären, wurde die UV-Induktion von chimären Genkonstrukten untersucht. Diese bestehen aus der 5' flankierenden Region der UV-induzierbaren Gene (*c-jun*, Collagenase, HIV-1), ihrem eigenen oder einem heterologen Promoter und dem bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reporter gen. Die Konstrukte wurden in verschiedene Zellen transient transfiziert und entweder die Menge an CAT-RNA oder die CAT-Enzymaktivität gemessen. In allen Fällen wurde die Expression dieser Konstrukte durch UV erhöht, die Expression der entsprechenden Plasmidvektoren blieb aber unbeeinflusst (Abb. 3-10). Damit kann eine Erhöhung der Lebenszeit der CAT-RNA durch UV ausgeschlossen werden. Der 5' nicht-translatierte Bereich der drei Gene kann ebenfalls keinen Einfluß auf die Lebenszeit oder Elongation der RNA haben, da die Expression von Konstrukten wie -76/+232 HIV-1 CAT (Abb. 5, 6), -60/+63 Coll CAT (Abb. 8), -18/+170 *c-jun* CAT (Abb. 10) nicht durch UV erhöht wird. Dies bedeutet, daß die UREs dieser Gene im verwendeten 5' flankierenden Bereich lokalisiert sind (Abb. 5-10) und zeigt, daß die Gene transkriptionell reguliert werden.

Die RNA-Akkumulation des endogenen *c-jun* Gens nach UV-Bestrahlung ist relativ schnell und ähnlich der des *c-fos* Gens (Büscher et al., 1988). Das Optimum der RNA-Menge nach UV- oder Phorbol ester-Behandlung liegt etwa bei einer Stunde (Abb. 3A, 4). UV aktiviert *c-jun* viel stärker als Phorbol ester. Wie bei *c-fos* (Rahmsdorf et al., 1987) kommt es bei Blockierung der Proteinsynthese zu einer Anhäufung der RNA infolge einer Erhöhung der sonst kurzen Halb-Lebenszeit und Blockierung der schnellen Abschaltung der Transkription (Abb. 3A, rechter Teil; und Herrlich et al., 1989a).

Im Gegensatz dazu ist die Anhäufung von RNA des endogenen Collagenase Gens verzögert (Abb. 3B, 4). Die RNA stammt aus der gleichen Präparation wie die in Abb. 3A getestete RNA. Die Akkumulation von RNA nach UV-Bestrahlung ist wesentlich kleiner als nach



**Abb. 3** UV- und Phorbolster-induzierte Anhäufung von HIV-1- und Collagenase-Promoter kontrollierter CAT-mRNA sowie mRNA der endogenen Collagenase und *c-jun* Gene. HeLa Zellen wurden transient transfiziert mit 5  $\mu\text{g}$  -121/+232 HIV-1 CAT und 5  $\mu\text{g}$  5 $\times$ (-73/-65) ColltkCAT und mit 60 ng/ml Phorbolster (TPA) oder 20  $\text{J}/\text{m}^2$  UV (254 nm) induziert bzw. nicht behandelt (Kon). Nach den angegebenen Zeiten wurde die gesamte cytoplasmatische RNA präpariert. (A) Die RNA (20  $\mu\text{g}$ ) wurde zum Nachweis von endogener *c-jun*-Transkription durch SP6 Polymerase-Kartierung mit der *c-jun* SP6-Probe hybridisiert. Von der RNA-Präparation 2 h nach TPA-Behandlung ist etwas verloren gegangen, was in Abb. 4 ausgeglichen wurde. Im rechten Teil der Abbildung wurde die UV und Phorbolster (TPA) induzierte Anhäufung von *c-jun*-RNA in An- oder Abwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Anisomycin (An) untersucht. Die RNA wurde 60 min nach Induktion präpariert. (B) 20  $\mu\text{g}$  der gleichen RNA-Präparation aus obigen transfizierten Zellen wurde auf Aktivität des endogenen Collagenase Gens durch SP6 Polymerase-Kartierung mit der Coll SP6-Probe untersucht. (C) 20  $\mu\text{g}$  der gleichen RNA-Präparation aus obigen transfizierten Zellen wurde durch SP6 Polymerase-Kartierung auf Aktivität der transfizierten CAT-Konstrukte analysiert (HIV-1 SP6-Probe, tkCAT SP6-Probe). Im rechten Teil der Abbildung wurde die UV-induzierte Anhäufung von HIV-1-RNA in An- oder Abwesenheit von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cycloheximid (Cx) untersucht. Die RNA wurde 9 h nach UV-Bestrahlung präpariert.

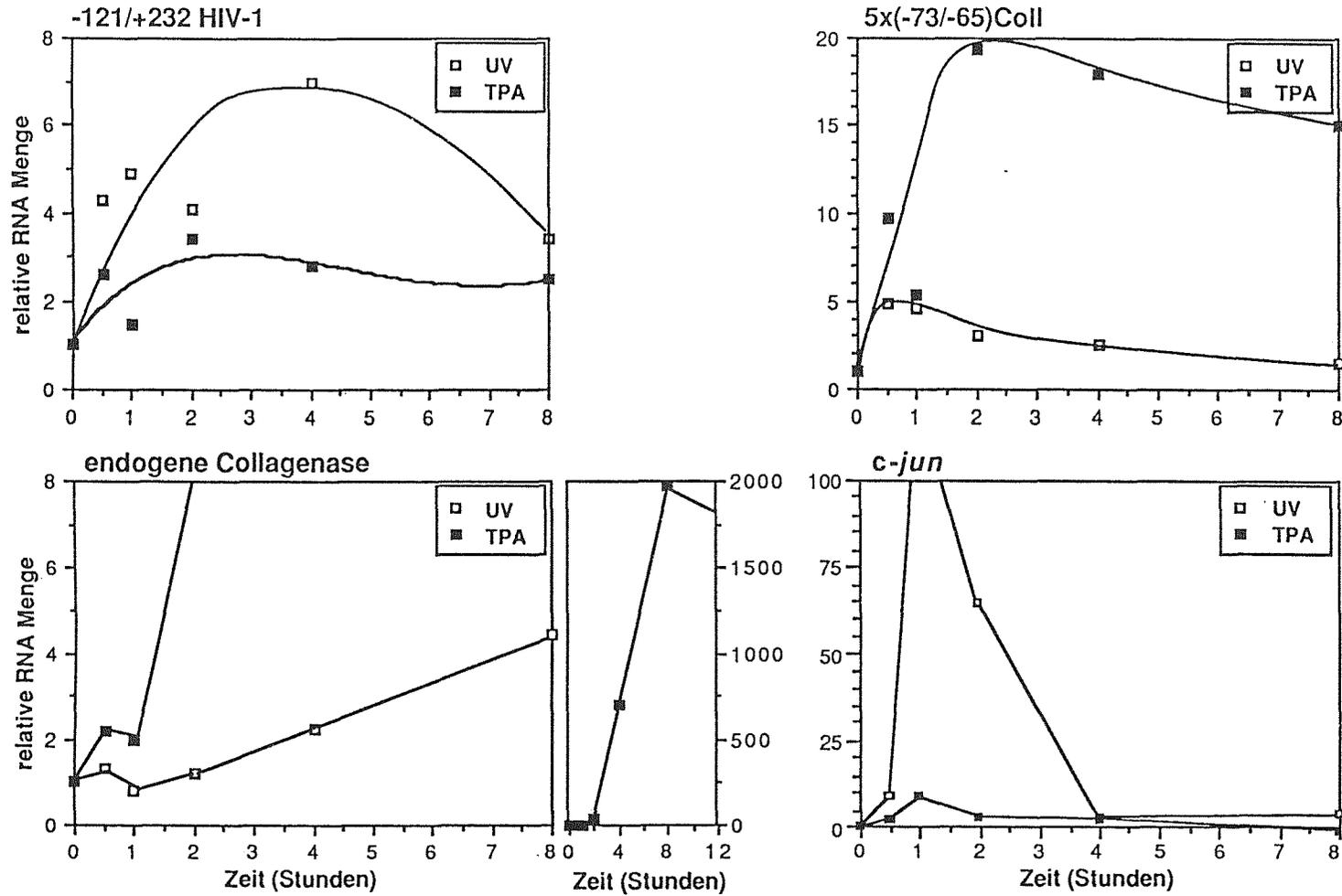


Abb. 4 Quantitative Auswertung der UV- und Phorbol ester-induzierten Anhäufung von HIV-1-, Collagenase- und *c-jun*-RNA. Die Autoradiogramme aus Abb. 3 wurden mit einem Ultrascan<sup>®</sup> XL Laser-Densitometer von Pharmacia-LKB und der GelScan XL Software 2.0 quantitativ ausgewertet. Die Menge an Transkripten in nicht-behandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

Phorbolster-Behandlung, weshalb eine genaue Aussage über den Zeitpunkt des Beginns der Transkription nicht möglich ist. Ein linearer Anstieg der RNA-Menge ist ab zwei Stunden nach UV-Bestrahlung zu beobachten (Abb. 4) und hält bis zu 24 Stunden an, während die RNA-Menge nach Phorbolster-Behandlung der Zelle nach acht Stunden schon wieder abnimmt (Abb. 3B). Die Transkription nach Phorbolster-Behandlung beginnt nach 30 min, der größere Anstieg in der RNA-Menge ist wie nach UV-Bestrahlung erst nach 2 Stunden zu beobachten und zu etwa 80% von Protein-Neusynthese abhängig (Angel et al., 1987a; Jonat et al., 1989; und B. Stein, unveröffentlicht).

Ein transient transfiziertes minimales Collagenase CAT-Konstrukt, das nur aus fünf Kopien der Sequenz zwischen den Positionen -73 und -65 (5×(-73/-65) ColltkCAT) besteht, zeigt ebenfalls schon 30 min nach UV- oder Phorbolster-Behandlung der Zelle einen deutlichen Anstieg in der RNA-Menge mit einem Maximum nach ein bis zwei Stunden (Abb. 3C). Dieser Anstieg wird jedoch nicht durch Hemmstoffe der Proteinsynthese blockiert (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß für dieses minimale Konstrukt die UV-Antwort schnell und direkt erfolgt.

In der 5' flankierenden Region des Collagenase Gens gibt es zusätzlich noch modulierende Sequenzen, die die Induktion durch UV und Phorbolster verstärken. Diese Sequenzen sind zwischen den Positionen -139 und -73 lokalisiert. Es scheint, daß diese Elemente nur bei fortlaufender Proteinsynthese funktionieren, da die UV- und Phorbolster-vermittelte Expression von größeren Promoter-Konstrukten (die diese(s) Element(e) enthalten) sowie des endogenen Gens durch Proteinsynthese-Hemmstoffe zu etwa 80% reduziert wird, nämlich auf das Niveau, das mit dem Minimal-Konstrukt (5×(-73/-65) ColltkCAT) alleine erreicht wird (Jonat et al., 1989; und B. Stein, unveröffentlicht).

HIV-1-Transkription von einem transient transfiziertem Konstrukt (-121/+232 HIV-1 CAT in Abb. 3C, 4) ist schon 30 min nach UV-Bestrahlung nachweisbar. Nach etwa zwei Stunden ist das Maximum der CAT-RNA-Menge erreicht. Die HIV-1-RNA startet an der Initiationsstelle, die auch im Virus benutzt wird. Eine ähnliche schnelle Antwort wird nach Phorbolster-Behandlung der Zellen erreicht (Abb. 3C, 4). Die UV-Induktion ist auch in Anwesenheit von Hemmstoffen der Proteinsynthese möglich (Abb. 3C, rechter Teil).

Durch diese Untersuchungen konnte also gezeigt werden, daß die UV-Antwort des endogenen *c-jun* Gens sowie transient transfizierter Minimal-Konstrukte mit Sequenzen aus dem HIV-1-Enhancer oder dem Collagenase-Enhancer schnell (innerhalb von 30 Minuten) und direkt (ohne Neusynthese von Proteinen) erfolgt. Die Aktivierung der endogenen Collagenase durch UV wird in Anwesenheit von Proteinsynthese durch noch nicht identifizierte DNA-Elemente verstärkt.

### 3. Identifizierung unterschiedlicher UREs in HIV-1, Collagenase und *c-jun*

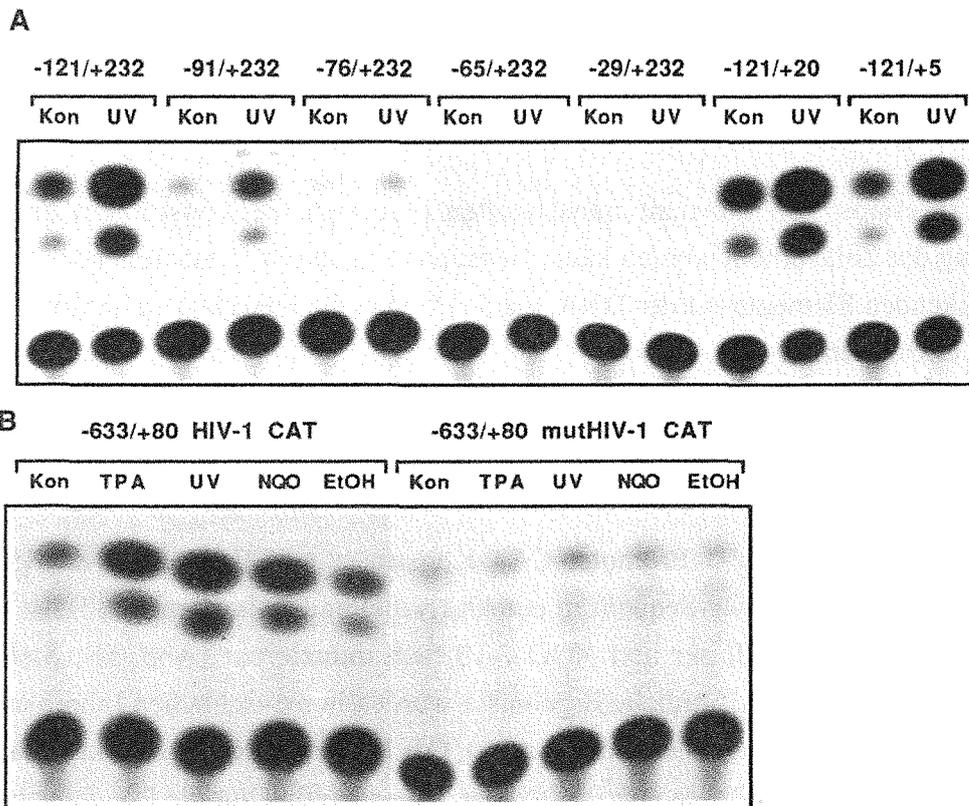
Da die Expression von transient transfizierten chimären Genkonstrukten durch UV-Bestrahlung der Zelle erhöht werden kann, ist es möglich, durch fortschreitende Deletionen die *cis*-wirkenden Elemente auf der DNA, die den Genen die Fähigkeit zur Antwort auf UV verleihen, einzugrenzen.

#### Das URE von HIV-1 ist der HIV-1-Enhancer

Die Expression eines HIV-1 Promoter-CAT-Konstrukts (-633/+80), das den gesamten HIV-1 LTR sowie einige *env*-Sequenzen enthält (Nabel und Baltimore, 1987), ist in HeLa Zellen durch UV, Phorbolster und NQO 7-15 fach induzierbar (Abb. 5B; Stein et al., 1989a; Stein et al., 1989b). Ähnliche Ergebnisse wurden in menschlichen Fibroblasten und lymphoiden Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt). Das Entfernen der *Trans*-Aktivator-Region (*tar*, Position -17 bis +80; Rosen et al., 1985) hat keinen Einfluß auf die UV-Induzierbarkeit (vergleiche -121/+232 und -121/+80 mit -121/+5 in Abb. 5A und 6). Zwei weitere *cis*-wirkende DNA-Elemente, die die Expression von HIV-1 erniedrigen sollen (zwischen den Positionen -340 und -185; Rosen et al., 1985 und zwischen den Positionen -173 und -159; Garcia et al., 1987), sowie eine potentielle AP-1-Bindestelle (zwischen den Positionen -357 und -316; Franza Jr. et al., 1988) zeigen ebenfalls keinen signifikanten Einfluß auf die Induzierbarkeit durch UV oder Phorbolster (vergleiche -633/+80 mit -121/+232 oder -121/+80 in Abb. 6).

Mutationen im HIV-1-Enhancer zerstören dagegen die Antwort des Gens auf UV. Der HIV-1-Enhancer ist nötig für die basale Expression (Rosen et al., 1985) und die Phorbolster-vermittelte Induktion (Dinter et al., 1987; Kaufman et al., 1987). Der HIV-1-Enhancer vermittelt weiterhin Induktionen durch TNF- $\alpha$  (Duh et al., 1989; Israël et al., 1989; Lowenthal et al., 1989), IL-1, cAMP (Osborn et al., 1989; Shirakawa et al., 1989) und durch Signale, die von einem intrazellulären Parasiten abgegeben werden (Ivanov et al., 1989). Er besteht aus zwei fast identischen Kopien eines Sequenzmotivs ( $\kappa$ B-Enhancer), das ursprünglich im Promoter des Gens, das für die Leichte-Kette der kappa-Immunglobuline kodiert, gefunden wurde (Picard und Schaffner, 1984; Sen und Baltimore, 1986).

Deletion von beiden  $\kappa$ B-Sequenzmotiven (-76/+232) oder Punktmutationen in beiden (mut -633/+80) reduzieren die basale Expression von HIV-1 und führen zum Verlust der Aktivierbarkeit durch UV und Phorbolster (Abb. 5, 6). Wenn auch noch die drei Sp1-



**Abb. 5** Der HIV-1 Enhancer reagiert auf UV, Phorbolster und NQO. (A) Von den angegebenen HIV-1 CAT-Konstrukten wurden je 10 µg transient in HeLa Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit UV (20 J/m<sup>2</sup>, 254 nm) bestrahlt oder blieben unbehandelt (Kon). Die CAT-Aktivität wurde 42 h nach Induktion bestimmt. (B) Die experimentellen Bedingungen waren wie in Teil A. -633/+80 mutHIV-1 CAT enthält Punktmutationen in beiden Enhancer-Motiven (Nabel und Baltimore, 1987). TPA-Behandlung war mit 60 ng/ml, NQO-Behandlung mit 1.3 µM. EtOH war das Lösungsmittel für NQO.

Bindestellen (Harrich et al., 1989) entfernt werden (-29/+232), ist keine basale Expression mehr meßbar. Nur Konstrukte, die mindestens eines der Enhancermotive enthalten (z.B. -121/+232, -91/+232, -121/+5, -633/+80), sind durch UV aktivierbar.

Die UV-Induktion des HIV-1 LTR über die beiden Enhancermotive (Abb. 11) ist spezifisch, da die enhancer-losen HIV-1 Promoter-Mutanten (mut-633/+80, -76/+232) zwar noch eine meßbare basale Expression haben, diese aber nicht durch UV beeinflusst wird. Die hier gezeigten Aktivierungen durch UV können daher nicht auf einer Erhöhung der Stabilität der CAT-RNA oder des CAT-Proteins beruhen. Promoter-Konstrukte mit *cis*-wirkenden Elementen für eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren, z.B. der *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase (tk) Promoter, der Rous Sarkoma Virus (RSV) LTR oder Maus Mammary Tumovirus (MMTV) LTR, reagieren nicht auf UV (Daten nicht gezeigt), was die Spezifität der κB-Enhancer-vermittelten UV-Induktion zeigt.

Um zu beweisen, daß der HIV-1-Enhancer nicht nur nötig sondern auch ausreichend für die UV-Induktion ist, wurde ein synthetisches Oligonukleotid, das beide Enhancermotive von den Positionen -105 bis -79 enthält, in beiden Orientierungen vor die TATA-Box des

*Xenopus* Albumingens kloniert. Diese Konstrukte sind durch UV aktivierbar, der Vektor dagegen nicht (Abb. 6).

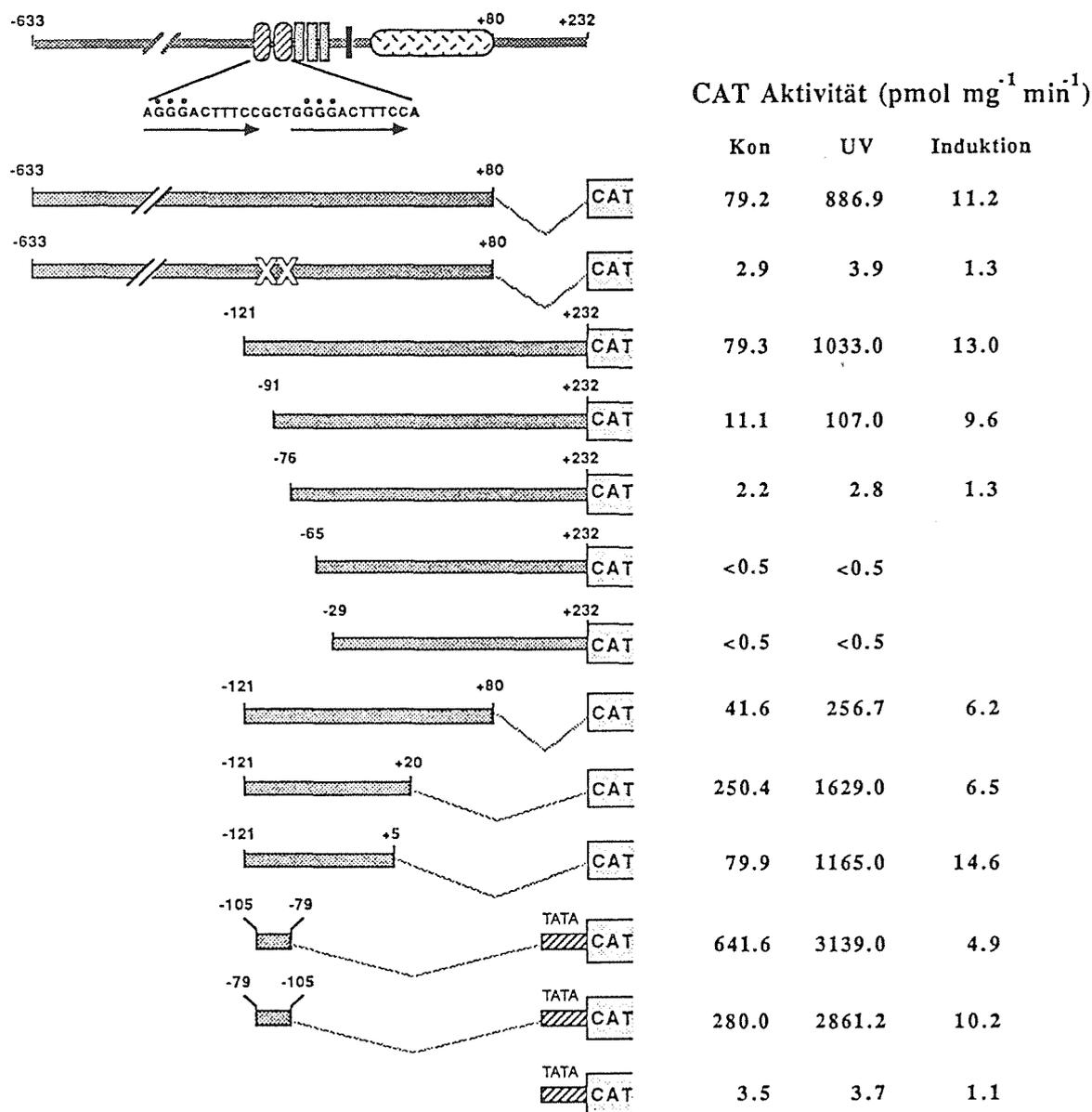


Abb. 6 Eingrenzung des URE im HIV-1 LTR. Ein schematischer Aufbau des HIV-1 LTR mit einigen wichtigen DNA Elementen ist gezeigt. Enhancer-Motive, Sp1-Bindestellen, TATA-Box, tar-Region, nicht-translatierter Bereich aus dem HIV-1 LTR mit 5' und 3' Deletions-Endpunkt, Punktmutationen im HIV-1-Enhancer (-104 GGG -102 → CTC; -90 GGG -88 → CTC). Die CAT-kodierende Region und der *Xenopus* Albumin-Promoter (TATA) sind angegeben. Die verschiedenen HIV-1 CAT-Konstrukte wurden transient in HeLa Zellen transfiziert und 42 h nach UV-Bestrahlung die CAT-Aktivität bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

**Tabelle 1** MMC und NQO aktivieren die UREs von HIV-1, Collagenase und *c-jun*

CAT Plasmid	Kon	MMC	NQO
-121/+232 HIV	58,3	308,9 (5,3)	
-76/+232 HIV	2,5	1,1 (0,5)	
-105/-79 HIV TATA	398,4	3572,1 (8,8)	3072,4 (7,4)
TATA	7,7	1,9 (0,2)	1,5 (0,2)
5x(-73/-65) Coll tk	19,0	81,4 (4,3)	
tk	3,3	0,9 (0,3)	
-1600/+740 <i>c-jun</i>	4,4	85,3 (19,6)	46,0 (10,6)
-79/+170 <i>c-jun</i>	0,24	0,63 (2,6)	0,90 (3,2)
-79/+170 ml.URE <i>c-jun</i>	<0,1	<0,1	<0,1

HeLa Zellen wurden mit je 10 µg der angegebenen CAT-Konstrukte transient transfiziert. 8 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 µg/ml MMC oder 1.3 µM NQO induziert oder blieben unbehandelt (Kon). Die CAT-Aktivität wurde 42 h später bestimmt. Die angegebenen Werte sind CAT-Aktivitäten in pmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> mit Induktionsfaktoren in Klammern. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

Andere DNA-schädigende Agenzien wie Mitomycin C und 4-Nitroquinolinoxid aktivieren die HIV-1 Transkription über die gleichen Enhancermotive (Tabelle 1). Somit ist das HIV-1-URE ein *cis*-wirkendes DNA-Element, auf das die verschiedensten Signalketten konvergieren.

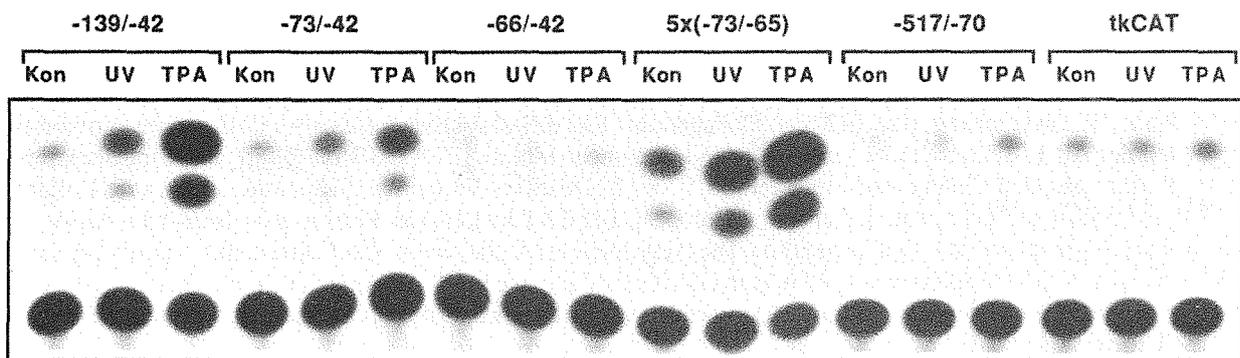
### Das URE der Collagenase ist der Enhancer

Die Expression eines Collagenase CAT-Konstrukt mit Collagenase-Sequenzen von Position -517 bis +63 wird in HeLa Zellen etwa 5 fach durch UV verstärkt (Abb. 8). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in menschlichen und Maus Fibroblasten gefunden (Daten nicht gezeigt). Die UV-Induktion des Collagenase-Promoters wird, wie auch die Phorbolster-Induktion, nach Entfernung von Sequenzen bis Position -73 reduziert, und geht verloren nach Deletion bis Position -60 (Abb. 7, 8). Ein Promoter-Konstrukt von Position -517 bis +63 mit einer Insertionsmutation im Bereich von Position -73/-65 ist nicht mehr durch UV (und Phorbolster) aktivierbar (Abb. 8; Jonat et al., 1989). Das URE der Collagenase liegt

somit zwischen den Positionen -73 und -65, und ist identisch mit der Enhancer-Sequenz, die für die Phorbol ester-Induktion des Collagenase-Promoters beschrieben ist (Abb. 11; Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b). Die Collagenase-Sequenzen zwischen den Positionen -139/-42 oder -73/-42 können vor dem heterologen tk-Promoter Induktion durch UV vermitteln, die Sequenzen -517/-70 oder -60/-42 dagegen nicht (Abb. 7, 8). Dies bedeutet, daß der hier untersuchte Bereich des Collagenase-Promoter nur ein cis-wirkendes DNA-Element hat, das als URE wirkt.

Um zu zeigen, daß dieses URE auch für die Vermittlung der UV-Induktion ausreicht, wurde ein synthetisches Oligonukleotid mit Collagenase-Sequenzen von den Positionen -73 bis -65 vor den tk-Promoter oder die TATA-Box des *Xenopus* Albumingens kloniert. Eine Kopie reicht aus und mit fünf Kopien erreicht man das Niveau der Regulation der Genexpression des gesamten Collagenase-Promoters durch UV (Abb. 7, 8, und Daten nicht gezeigt). Punktmutationen in der Sequenz des URE, die mit der Aktivierung der Collagenase durch Phorbol ester interferieren (Angel et al., 1987a), verhindern auch die Induktion durch UV (Daten nicht gezeigt).

Das URE der Collagenase vermittelt, wie das URE des HIV-1 Enhancers, auch Induktionen durch andere DNA-schädigende Agenzien (Tabelle 1). Es ist identisch mit dem cis-wirkenden DNA-Element der Collagenase, das Induktionen durch Wachstumsfaktoren, TNF- $\alpha$  und Onkogen-Produkte vermittelt (Angel et al., 1987a; Brenner et al., 1989b; Schönthal et al., 1988a; Schönthal et al., 1988b).



**Abb. 7** Der Collagenase-Enhancer reagiert auf UV und Phorbol ester. Von den angegebenen Collagenase tkCAT-Konstrukten wurden je 10  $\mu$ g transient in HeLa Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit UV (20 J/m<sup>2</sup>, 254 nm) bestrahlt, mit 60 ng/ml TPA behandelt oder blieben unbehandelt (Kon). Die CAT-Aktivität wurde 42 h nach Induktion bestimmt.

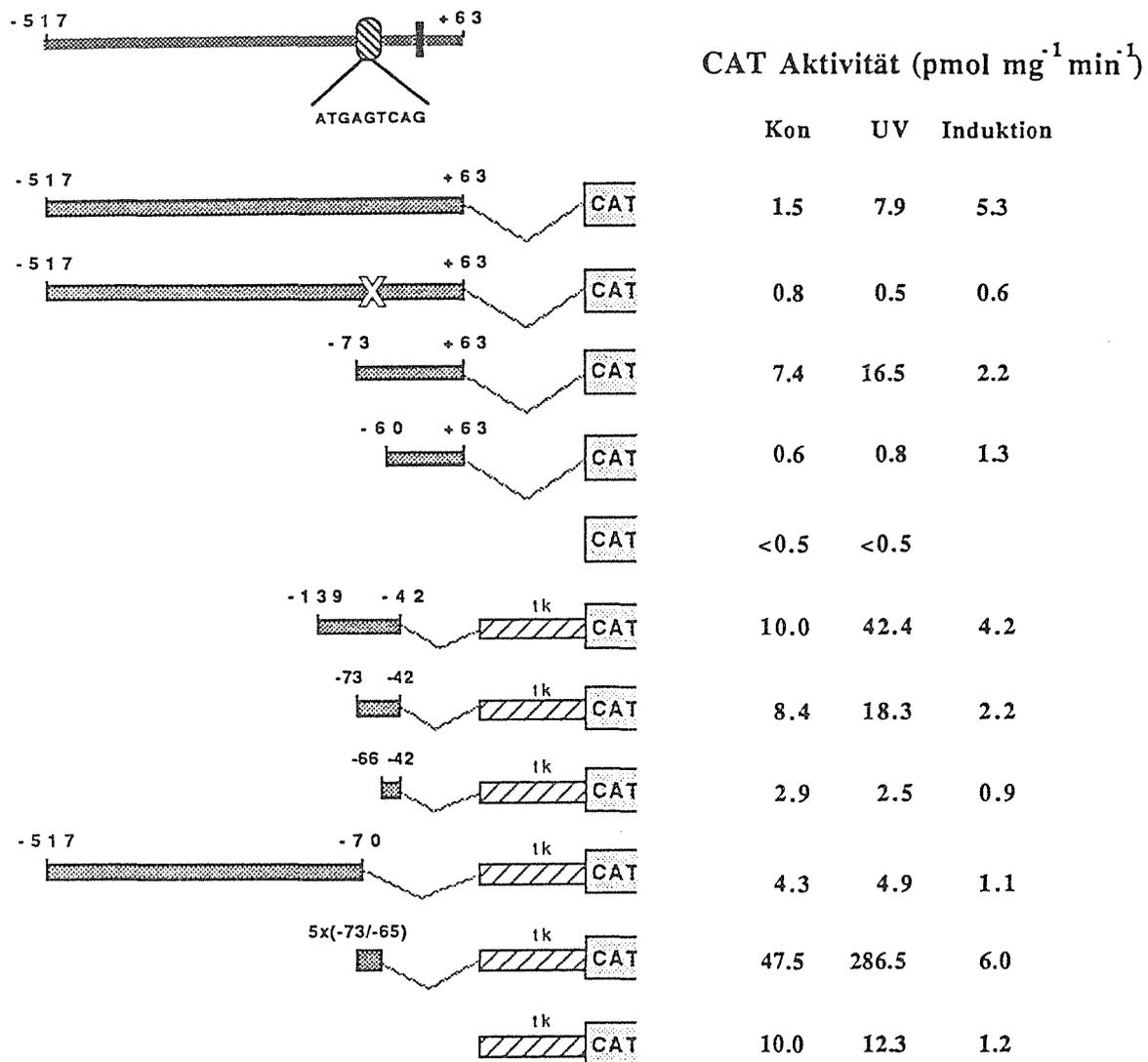


Abb. 8 Eingrenzung des URE der Collagenase. Ein schematischer Aufbau des Collagenase-Promoters mit der AP-1-Bindestelle ist gezeigt. (hatched oval) AP-1 Enhancer-Motife, (vertical bar) TATA-Box, (stippled) nicht-translatierter Bereich aus dem Collagenase-Promoter mit 5' und 3' Deletions-Endpunkt, (X) Punktmutationen im Collagenase-Enhancer (siehe Materialien und Methoden). Die CAT-kodierende Region und der *Herpes simplex* Virus tk-Promoter (tk) sind angegeben. Die verschiedenen Collagenase CAT-Konstrukte wurden transient in HeLa Zellen transfiziert und 42 h nach UV-Bestrahlung die CAT-Aktivität bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

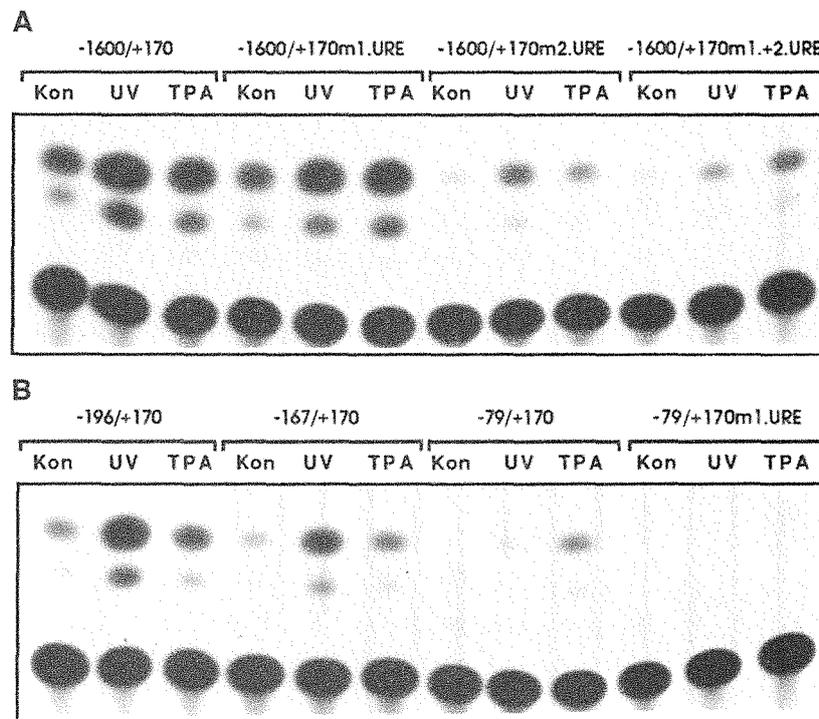
### Der *c-jun* Promoter enthält zwei UREs

Ein *c-jun* CAT-Konstrukt mit Sequenzen von den Positionen -1600 bis +740 (-1100 bis +740 in Angel et al., 1988b), kloniert in pBLCAT5, zeigt in HeLa Zellen nach UV-Bestrahlung eine etwa 9-fach erhöhte Expression (Abb. 10). Deletion von 5' flankierenden Sequenzen bis Position -196 und 3' flankierenden Sequenzen bis Position +170 hat keinen signifikanten Einfluß auf die UV-Induzierbarkeit (vergleiche -1600/+740 mit -196/+170 in

Abb. 10). Entfernen von weiteren 5' flankierenden Sequenzen bis Position -167 reduziert den Faktor der UV-Induktion etwa auf die Hälfte. Entfernen von Sequenzen bis Position -18 führt zum totalen Verlust der UV-Induktion und sehr niedriger basaler Aktivität (Abb. 10). Somit ist zwischen den Positionen -167 und -18 ein URE vorhanden und zwischen den Positionen -1600 und -167 ein zweites Element, das die über das erste URE vermittelte UV-Induzierbarkeit von *c-jun* verstärkt oder ein eigenständiges zweites URE darstellt.

Die Expression eines Minimal-Konstrukts von den Positionen -79 bis +170 wird noch rund 2 bis 3 fach durch UV aktiviert. Punktmutationen im Bereich zwischen den Positionen -72 und -63 führen zum Verlust der Induktion durch UV (und Phorbol ester) (Abb. 9B, 10). Das 1. URE des *c-jun* Promoters (Sequenzbereich -72/-63; Abb. 11) ist somit identisch mit dem *cis*-wirkenden DNA-Element, das für die Induktion durch Phorbol ester beschrieben ist (Angel et al., 1988b).

Promoter CAT-Konstrukte mit Sequenzen von den Positionen -1600 bis +170 mit der gleichen Punktmutation im 1. URE (-1600/+170 mut1.URE), die zum Verlust der UV-Induzierbarkeit des Minimal-Konstrukts -79/+170 *c-jun* CAT führt, oder ein Konstrukt mit Sequenzen von den Positionen -283 bis +170 mit einer internen Deletion des 1. URE (-283/+170Δ(-131/-64)) sind durch UV noch etwa 3 fach aktivierbar (Abb. 9A, 10). Das



**Abb. 9** Der *c-jun*-Promoter enthält zwei UREs. (A) und (B) Von den angegebenen *c-jun* CAT-Konstrukten wurden je 10 µg transient in HeLa Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit UV (20 J/m<sup>2</sup>, 254 nm) bestrahlt, mit 60 ng/ml TPA behandelt oder blieben unbehandelt (Kon). Die CAT-Aktivität wurde 42 h nach Induktion bestimmt.

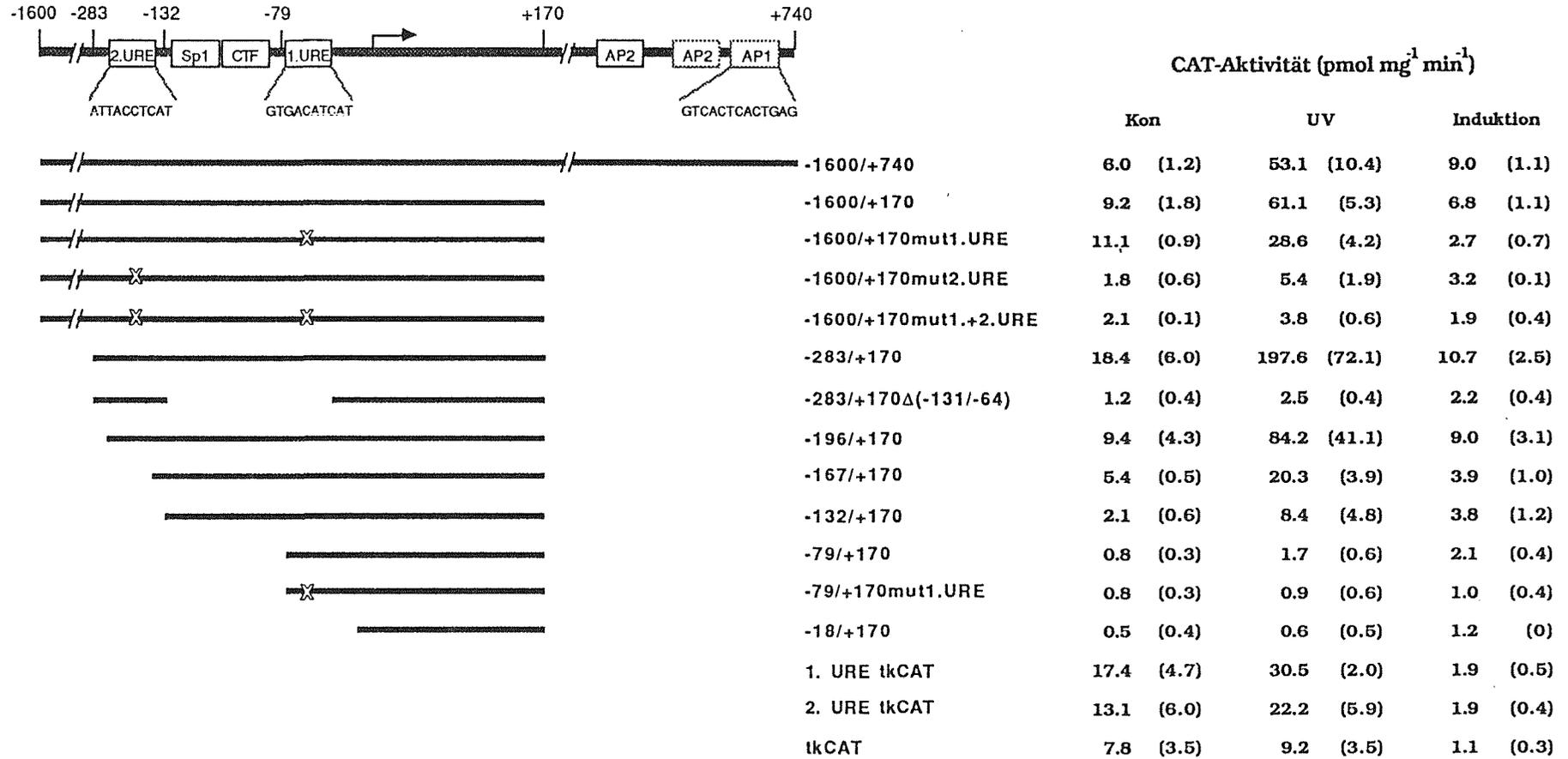


Abb. 10 Eingrenzung der UREs im *c-jun*-Promoter. Ein schematischer nicht-maßstabgetreuer Aufbau des *c-jun*-Promoters mit einigen wichtigen DNA-Elementen ist gezeigt. Der nicht-translatierte Bereich der verschiedenen *c-jun* CAT-Konstrukte ist dargestellt. Die Kreuze symbolisieren Punktmutationen im 1. bzw. 2. URE (siehe Materialien und Methoden). Die Promoter Konstrukte wurden transient in HeLa Zellen transfiziert und 42 h nach UV-Bestrahlung (20 J/m<sup>2</sup>, 254 nm) die CAT-Aktivität bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Experimente mit der Standardabweichung in Klammern.

beweist, daß neben dem 1. URE noch ein zweites unabhängiges URE existieren muß. Durch Austesten der UV-Aktivierbarkeit weiterer Deletionen konnte dieses 2. URE auf den Sequenzbereich -191/-182 (Abb. 11) eingegrenzt werden. Punktmutationen in diesem 2. URE (-1600/+170 mut2.URE) reduzieren den Faktor der Induktion durch UV etwa auf die Hälfte im Vergleich zum intakten Promoter und erniedrigen auch deutlich die basale Aktivität. Somit konnte gezeigt werden, daß beide UREs zusammen zur UV-Induzierbarkeit des gesamten *c-jun* Promoters beitragen (vergleiche -1600/+170 mit -1600/+170mut1.URE, -1600/+170mut2.URE und -1600/+170mut1.+2.URE in Abb. 9, 10).

Die Expression eines Konstrukts mit *c-jun*-Sequenzen von den Positionen -1600 bis +170 mit Punktmutationen in beiden UREs ist jedoch immer noch knapp zweifach durch UV aktivierbar (Abb. 9, 10). Dies läßt vermuten, daß in dem hier getesteten großen *c-jun*-Promoterbereich noch weitere Elemente schwache UV-Induzierbarkeit vermitteln können, zumindest wenn die beiden UREs ausgeschaltet sind und die basale Expression so schwach ist, daß diese Effekte sichtbar werden können.

Die Rolle der beiden UREs für die Phorbolster-Induktion des gesamten *c-jun*-Promoter ist jedoch nicht klar. Punktmutationen in den UREs lassen die Phorbolster-Induktion mehr oder weniger unbeeinflusst, weshalb vermutlich noch andere Elemente Phorbolster-Induktion vermitteln können (Abb. 9). Beide UREs sind ausreichend, um als synthetische Oligonukleotide vor dem heterologen tk-Promoter oder der *Xenopus* Albumin TATA-Box UV- und Phorbolster-Regulation in verschiedenen Zellen zu vermitteln (Abb. 10, 21, Daten nicht gezeigt).

#### **4. Verschiedene Transkriptionsfaktoren vermitteln die UV-induzierte Genexpression**

Nachdem nun Anfang und Ende der Signalkette in der UV-Induktion bekannt sind, konnten als nächstes die Transkriptionsfaktoren, die an die identifizierten UREs binden, charakterisiert werden. Ein Sequenzvergleich der definierten UREs in den drei beschriebenen Genen ist in Abb. 11 gezeigt. Zum Vergleich ist noch die Sequenz des UREs vom *c-fos* Gen angegeben (Stein et al., 1989b), sowie die Sequenz eines *cis*-wirkenden Elements aus dem Fibronectin-Promoter (CRE), das Induktion durch cAMP vermittelt (Dean et al., 1989) und in seiner Sequenz sehr ähnlich den UREs aus dem *c-jun*-Promoter ist. Die UREs von Collagenase und *c-jun* sind in ihrer Sequenz völlig verschieden von dem HIV-1- und *c-fos*-URE. Die beiden UREs aus dem *c-jun*-Promoter unterscheiden sich vom URE der Collagenase im wesentlichen durch eine zusätzliche Base in der Mitte der Sequenz. Dadurch sind diese beiden Sequenzen zwar recht ähnlich dem CRE des Fibronectin Gens, das typische CG-

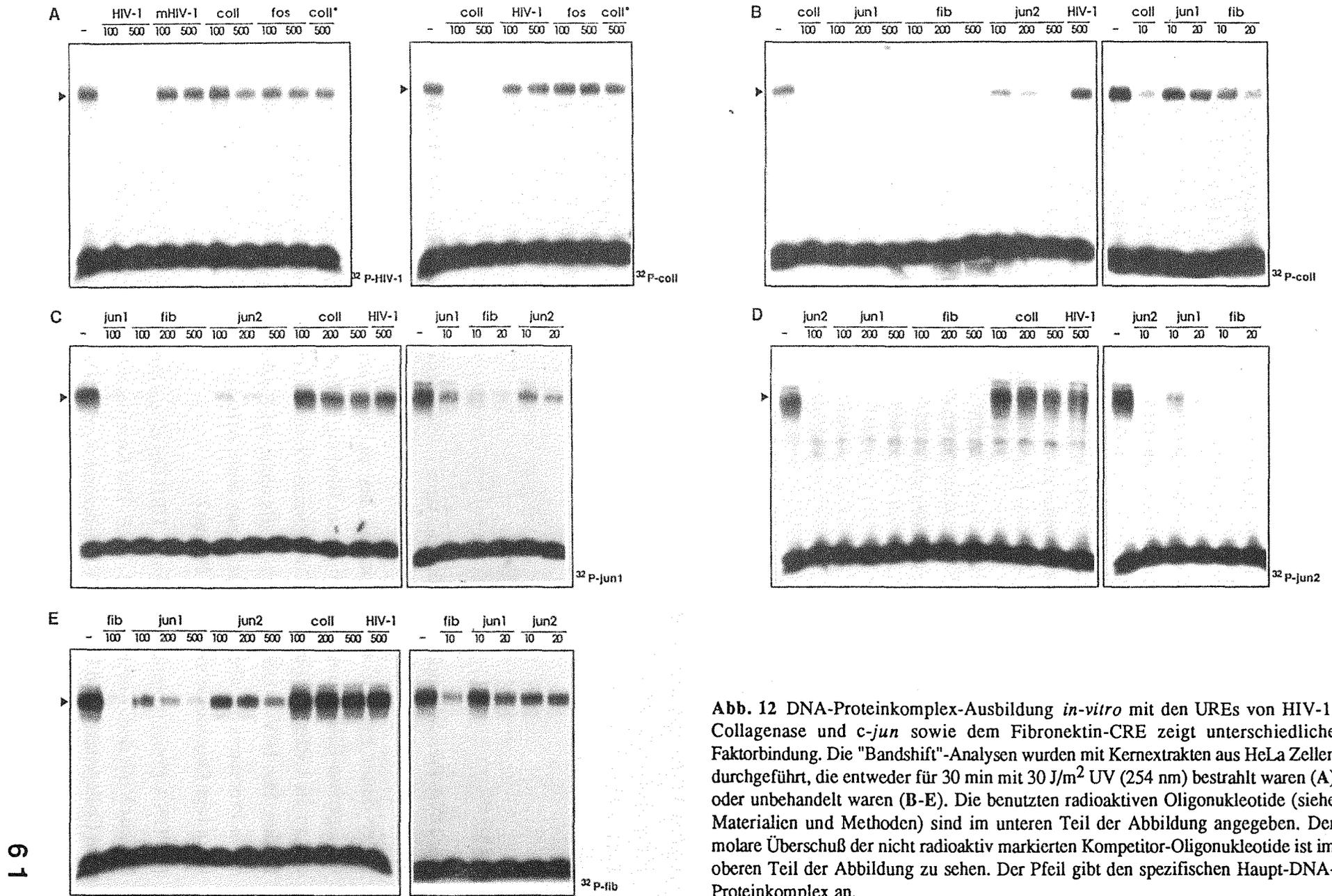
-105	-93	<b>AGGGACTTTCCGC</b>	HIV-1
-91	-79	<b>GGGGACTTTCCAG</b>	HIV-1
-73	-65	<b>ATGAG TCAG</b>	h Collagenase
-72	-63	<b>GTGACATCAT</b>	h c-jun
-191	-182	<b>ATTACCTCAT</b>	h c-jun
-174	-165	<b>GTGACGTCAC</b>	h Fibronectin
-320	-299	<b>GGATGTCCATATTAGGACATCT</b>	h c-fos

Abb. 11 Sequenzvergleich der UREs und des Fibronectin-CRE. Es ist die Sequenz der DNA-Elemente mit ihren 5' und 3' Positionsangaben relativ zum Start der Transkription bei +1 und das dazugehörige Gen angegeben.

Basenpaar-Motiv in der Mitte aller funktioneller CREs ist aber nicht vorhanden (Iguchi-Arigo und Schaffner, 1989; Lin und Green, 1989; Montminy et al., 1986). Um die Faktoren, die an diese Elemente binden, näher zu charakterisieren, wurden Oligonukleotide gleicher Länge synthetisiert, die die jeweiligen Erkennungssequenzen flankiert von identischen Linkersequenzen enthalten. Es wurde dann die *in-vitro* Bindung von Proteinen an die synthetischen URE-Oligonukleotide durch "Bandshift"-Analysen untersucht. Dazu wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotide mit Kernextrakten aus HeLa Zellen inkubiert. Kernextrakte wurden gewählt, weil sich die aktiven Transkriptionsfaktoren im Kern einer Zelle befinden. Während der Inkubation der radioaktiven URE-Oligonukleotide mit Kernextrakten binden Transkriptionsfaktoren an die Oligonukleotide und bewirken dadurch, daß diese DNA-Proteinkomplexe bei der nachfolgenden Elektrophorese auf einem nativen Gel langsamer als die freie DNA (URE-Oligonukleotide ohne gebundene Proteine) wandern.

## HIV-1

Das HIV-1-URE-Oligonukleotid bildet *in-vitro* einen Haupt-DNA-Proteinkomplex mit Kernextrakten aus UV-behandelten HeLa Zellen (Abb. 12A, Pfeil). Dieser DNA-Proteinkomplex hat ein anderes Laufverhalten als der Proteinkomplex, der an das



**Abb. 12** DNA-Proteinkomplex-Ausbildung *in-vitro* mit den URES von HIV-1, Collagenase und *c-jun* sowie dem Fibronectin-CRE zeigt unterschiedliche Faktorbindung. Die "Bandshift"-Analysen wurden mit Kernextrakten aus HeLa Zellen durchgeführt, die entweder für 30 min mit  $30 \text{ J/m}^2$  UV (254 nm) bestrahlt waren (A) oder unbehandelt waren (B-E). Die benutzten radioaktiven Oligonukleotide (siehe Materialien und Methoden) sind im unteren Teil der Abbildung angegeben. Der molare Überschuß der nicht radioaktiv markierten Kompetitor-Oligonukleotide ist im oberen Teil der Abbildung zu sehen. Der Pfeil gibt den spezifischen Haupt-DNA-Proteinkomplex an.

Collagenase-URE (coll) bindet. Dies ein Hinweis für unterschiedliche Proteinkomplexe am HIV-1- und Collagenase-URE, da die in den "Bandshift"-Analysen eingesetzten Oligonukleotide alle fast die gleiche Länge haben, und das Laufverhalten von DNA-Proteinkomplexen in nativen Gelen im wesentlichen durch Form, Größe und Ladung des Proteins bestimmt wird. Die Komplexbildung kann mit einem 100 bis 500 fachen molaren Überschuß eines mutierten, nicht-funktionellen HIV-1-URE (mHIV-1), des Collagenase-URE (coll) oder des *c-fos*-URE (fos) nicht unterdrückt werden. Ein Oligonukleotid mit einer nicht-verwandten Sequenz aus dem Collagenase-Promoter (-62/-50, coll\*) kann ebenfalls nicht um die Bindung kompetieren. Im Gegensatz dazu verhindert das homologe HIV-1-URE schon mit kleinen molaren Überschüssen die Komplexbildung effektiv. Diese Daten zeigen, daß sich *in-vitro* ein spezifischer DNA-Proteinkomplex am HIV-1-URE bildet, und daß zumindest die DNA-Bindedomänen der Transkriptionsfaktoren am HIV-1-, Collagenase- und *c-fos*-URE verschieden sind.

## **Collagenase**

An das URE der Collagenase bindet ein Transkriptionsfaktor, dessen Bindung weder mit dem HIV-1-URE noch mit dem *c-fos*-URE kompetiert werden kann (Abb. 12A). Somit kann dieser Faktor nicht mit den Faktoren am HIV-1- und *c-fos*-URE identisch sein. Die beiden UREs aus dem *c-jun*-Promoter (jun1, jun2) blockieren dagegen wie auch das Fibronectin-CRE (fib) bei höheren Überschüssen die Komplexbildung am Collagenase-URE (Abb. 12B). Dies bedeutet, daß der Proteinkomplex am Collagenase-URE eine gewisse Affinität zu den Sequenzen im *c-jun*- und Fibronectin-Promoter hat.

## ***c-jun***

Der DNA-Proteinkomplex, der sich mit dem 1. URE des *c-jun*-Promoters (jun1) bildet, hat ein nur geringfügig anderes Laufverhalten als der Komplex am Collagenase-URE. Dennoch ist er damit nicht identisch, da mit bis zu 500 fachen molaren Überschüssen des Collagenase-URE kaum Konkurrenz um Bindung zu beobachten ist (Abb. 12C). Dies zeigt, daß an die UREs im *c-jun*- und Collagenase-Promoter verschiedene Transkriptionsfaktoren binden. Das HIV-1-URE kann ebenfalls nicht um Bindung kompetieren. Das 2. URE des *c-jun* Promoters hat aber eine fast gleich hohe Affinität für den Faktor am 1. URE als das homologe Oligonukleotid (Abb 12C, jun2).

Der DNA-Proteinkomplex mit dem 2. URE des *c-jun*-Promoter (jun2) ist im Laufverhalten identisch mit dem Komplex am 1. URE. Die Komplexbildung kann wiederum nicht mit dem Collagenase- und HIV-1-URE gehemmt werden. Dagegen sind sowohl das 1. als auch

das 2. URE fast gleich gute Kompetitoren der Komplexbildung. Das homologe Oligonukleotid kompetiert etwa zweifach besser (Abb. 12D).

Die beiden UREs des *c-jun*-Promoters binden also sehr ähnliche oder identische Proteine, die sich aber aufgrund ihrer DNA-Affinitäten deutlich vom Proteinkomplex am Collagenase-URE unterscheiden lassen. Interessanterweise haben die Transkriptionsfaktoren, die an das 1. und 2. URE von *c-jun* binden, eine genauso große Affinität zu dem CRE des Fibronektin-Promoters wie zu ihrer eigenen Sequenz (Abb. 12C, D). In umgekehrter Weise können die beiden *c-jun*-UREs nur schlecht um Bindung am Fibronektin-CRE kompetieren (Abb. 12E). Das Fibronektin-CRE bindet daher entweder mehr als einen Faktor mit ähnlicher Affinität, oder die *c-jun*-UREs haben aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit auch Affinitäten zu dem Faktor am Fibronektin-CRE. Eine schematische Übersicht der Affinitäten der AP-1-ähnlichen Bindesequenzen zu den verschiedenen Proteinkomplexen ist in Abb. 13 zu sehen.

<u>Probe</u>	<u>Kompetitor</u>
<b>coll</b>	coll > fib > jun1 > jun2 » HIV-1
<b>jun1</b>	jun1 = fib > jun2 » coll = HIV-1
<b>jun2</b>	jun2 = fib > jun1 » coll = HIV-1
<b>fib</b>	fib > jun1 > jun2 > coll = HIV-1

**Abb. 13** Unterschiedliche Faktorbindung an ähnliche Sequenzen. Die Wettbewerbsanalysen aus Abb. 12B-E wurden schematisch dargestellt. Die Reihenfolge und Größe der Kompetitor-Oligonukleotide zeigt ihr abnehmendes Wettbewerbsverhalten.

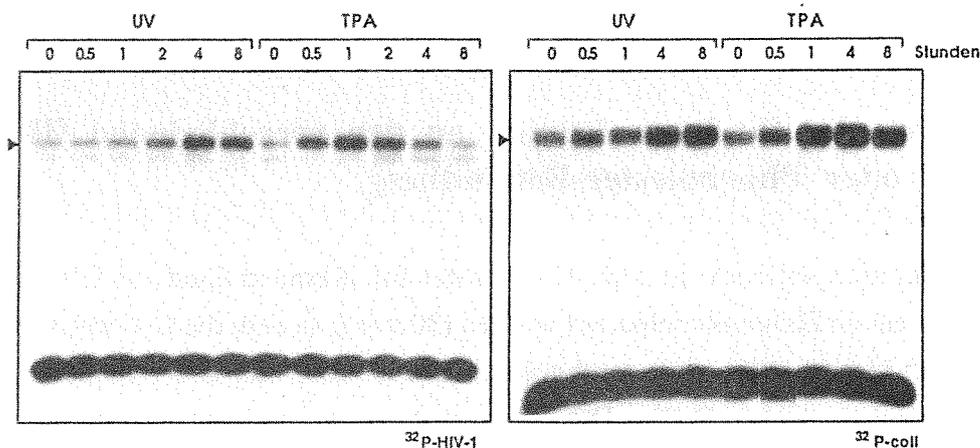
## 5. Erhöhung der Bindungsaktivität an den verschiedenen UREs nach UV- oder Phorbolster-Behandlung

Die Wettbewerbsexperimente in Abb. 12A wurden mit Kernextrakten aus UV-bestrahlten Zellen, die zu einem Zeitpunkt präpariert wurden (30 min), an dem die UV-induzierte RNA-Akkumulation klar zu sehen war, durchgeführt. Die in Abb. 12B-E verwendeten Extrakte stammen aus unbehandelten Zellen. Das Laufverhalten und das Wettbewerbsverhalten der Transkriptionsfaktor-Komplexe ist in unbehandelten, UV- oder Phorbolster-behandelten Zellen gleich (Abb. 12, 14, 24, Daten nicht gezeigt). Daraus kann man schließen, daß identische Transkriptionsfaktor-Komplexe in Extrakten aus nicht behandelten oder UV- und Phorbolster-behandelten Zellen an die jeweiligen UREs binden. Das Binden zusätzlicher

Faktoren an die DNA-Proteinkomplexe in Extrakten aus induzierten Zellen würde das Laufverhalten dieser Komplexe im nativen Gel verändern.

Um zu sehen, ob die erhöhte Transkription der hier untersuchten Gene nach UV-Bestrahlung eine erhöhte Bindung von Transkriptionsfaktoren an den UREs bedeutet, wurden HeLa Zellen mit UV bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung Kernextrakte präpariert. Die Bindungsaktivitäten an den UREs von Collagenase, HIV-1 und *c-jun* sind mit Extrakten aus UV-behandelten Zellen erhöht (Abb. 14, 19, 20, 22, 24). Schon 30 min nach Bestrahlung ist ein leichter Anstieg der Bindung an das Collagenase- und HIV-1-URE zu beobachten, mit einem Optimum der Bindung 4 bis 8 Stunden nach UV-Bestrahlung. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Extrakten aus Phorbolster-behandelten Zellen gefunden, das Optimum der Bindung liegt hier jedoch etwas früher (Abb. 14). Der größte Teil des Anstiegs der Bindung an das Collagenase-URE kann durch Hemmstoffe der Proteinsynthese wie Anisomycin gehemmt werden (gezeigt für TPA in Abb. 19A). Die UV- und Phorbolster-induzierte Bindung an das HIV-1-URE wird dagegen durch diese Hemmstoffe nicht blockiert. Es kommt sogar zu einer Erhöhung der Bindung durch Anisomycin alleine (Daten nicht gezeigt). Der Anstieg der Bindung an den beiden UREs des *c-jun*-Promoters mit Extrakten aus UV- oder Phorbolster-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ist nur etwa zweifach (Abb. 19, 20), wird aber im Gegensatz zur Situation am Collagenase-URE durch Hemmstoffe der Proteinsynthese nicht blockiert (gezeigt für TPA in Abb. 19A).

Aus diesen Daten kann man folgern, daß der späte Anstieg der Bindung an das Collagenase URE auf UV- (und Phorbolster-) induzierte Neusynthese der entsprechenden Transkrip-



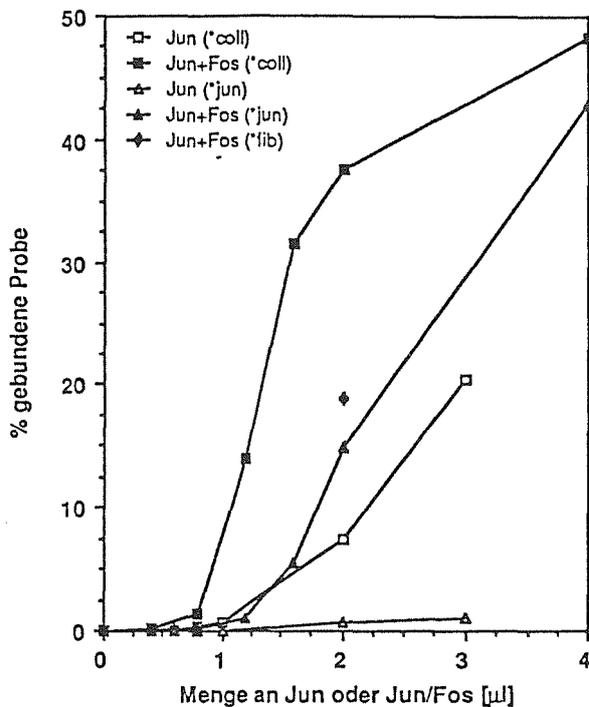
**Abb. 14** UV- und TPA-induzierte erhöhte Bindungsaktivität an den UREs von HIV-1 und Collagenase. Kernextrakte von unbehandelten HeLa Zellen oder von Zellen, die für die angegebenen Zeiten mit UV ( $30 \text{ J/m}^2$ , 254 nm) oder TPA (60 ng/ml) behandelt waren, wurden mit den angegebenen radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt.

tionsfaktoren beruht. Der nach 30 min zu beobachtende Anstieg der Bindung an das Collagenase-URE, die verstärkte Bindung an das HIV-1-URE und an die beiden *c-jun*-UREs beruhen dagegen auf post-translationeller Modifizierung von schon in der Zelle vorhandenen Proteinen.

## **6. An das Collagenase-URE bindet ein cJun/cJun-Homodimer und cJun/cFos-Heterodimer**

Das URE der Collagenase dient als Erkennungssequenz des durch Phorbolster aktivierbaren Transkriptionsfaktors AP-1 (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987b). AP-1 ist eine Multiproteinkomplex, der die Produkte zweier Proto-Onkogene, cJun und cFos, enthält. Für diese Proteine wurde gezeigt, daß sie für die transkriptionelle Aktivierung der Collagenase über die AP-1-Bindestelle notwendig sind (Tabelle 2, 4, und Angel et al., 1988a; Chiu et al., 1988; Gebel et al., 1989; Herrlich und Ponta, 1989; Herrlich et al., 1989a; Lucibello et al., 1988; Schönthal et al., 1988b). Daneben sind noch weitere Proteine aus der AP-1 Familie wie JunB, JunD, CREB, Fra, FosB nachweisbar (Cohen et al., 1989; Curran und Franza Jr., 1988; Hai et al., 1988; Hirai et al., 1989; Nakabeppu et al., 1988; Ryder et al., 1989; Zerial et al., 1989). Die Rolle dieser Genprodukte für die Regulation der Collagenase ist noch unklar. cJun und cFos interagieren über eine  $\alpha$ -helikale Struktur (Leucin-Zipper) in der DNA-Bindedomäne (Landschulz et al., 1988) und binden als Heterodimer an die DNA. cJun kann auch mit niedriger Affinität Homodimere bilden, die ebenfalls an DNA binden, cFos dagegen nicht (Gentz et al., 1989; Halazonetis et al., 1988; Kouzarides und Ziff, 1988; Nakabeppu und Nathans, 1989; Ransone et al., 1989; Turner und Tjian, 1989). vJun und vFos sind die Produkte der entsprechenden viralen Onkogene *v-jun* und *v-fos*. Die viralen Proteine unterscheiden sich von den zellulären Proteinen im wesentlichen durch Deletionen von einigen Aminosäuren außerhalb der DNA-Bindedomäne. Wegen der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz reagieren Antikörper gegen die viralen Proteine auch mit den zellulären Proteinen (Angel et al., 1988a; Angel et al., 1989; Bohmann et al., 1987; Bohmann und Tjian, 1989; Bos et al., 1989; Curran et al., 1984).

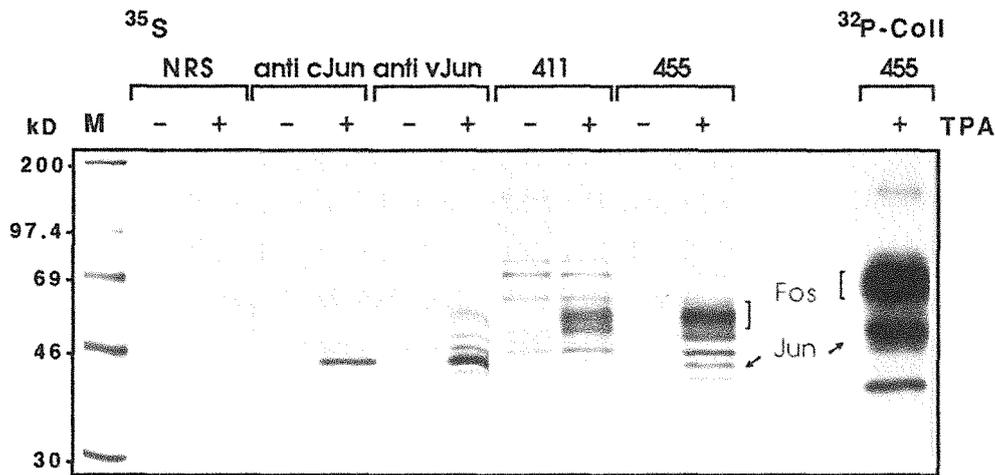
Um die Identität des hier mit HeLa Kernextrakten erhaltenen Proteinkomplexes mit cJun/cFos zu beweisen, wurde zunächst das radioaktiv markierte Oligonukleotid mit bakteriell exprimierten cJun- oder einer Kombination aus cJun/vFos-Fusionsprotein inkubiert. vFos hat die gleichen DNA-Bindeeigenschaften wie cFos, da die DNA-Bindedomänen mit Leucin-Zipper-Struktur identisch sind. Das bakterielle cJun-Fusionsprotein besteht nur aus einem Teil von cJun mit der DNA-Bindedomäne und Leucin-Zipper-Struktur. Sowohl cJun als auch cJun/vFos binden mit hoher Affinität an das URE; an eine



**Abb. 15** Bindung von Jun und Fos an das Collagenase-URE. Steigende Mengen an bakteriell exprimierten trpEcJun (Jun) bzw. einer 1:1 Mischung aus trpEcJun und Fos (Fos wurde freundlicherweise von R. Müller, Marburg zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Fusionsprotein aus einem Teil von *lac z* und FBJv-*fos*; Risse et al., 1989) wurden 10 min bei 4°C inkubiert, bevor die angegebenen radioaktiv markierten Oligonukleotide (\*coll, \*jun=jun1, \*fib) zugesetzt wurden. Nach Auftrennung auf einem nativen Gel wurden die DNA-Proteinkomplexe und die freie DNA ausgeschnitten und im Szintillationszähler gemessen. In der Graphik wurde der prozentuale Anteil der DNA-Proteinkomplexe an der eingesetzten DNA gegenüber der verwendeten Proteinmenge (µl) aufgetragen.

Punktmutation dieser URE-Sequenz, die *in-vivo* auch keine Induktion durch UV mehr vermittelt, dagegen nicht (Abb. 15, und Daten nicht gezeigt). Mit bakteriell exprimierten vJun-Fusionsprotein (gesamtes vJun) wurden die gleichen Resultate erhalten (Daten nicht gezeigt). Die DNA-Bindedomäne von cJun ist also völlig ausreichend für die Interaktion mit Fos und die Bindung an die DNA. Der bakterielle Anteil des Fusionsproteins (Amino-Terminus des bakteriellen Tryptophan-E-Proteins) bindet nicht an das Collagenase-URE (Daten nicht gezeigt).

Die sigmoide Bindungskurve (Abb. 15) spricht für eine kooperative Bindung von cJun und cFos an die DNA. Kooperative Bindungskurven von Proteinen findet man, wenn der entstehende Komplex aus mehreren Untereinheiten, die sich gegenseitig in ihrer Bindung positiv beeinflussen (Koshland, 1970), besteht. cJun und cFos haben eine höhere Affinität miteinander zu interagieren als cJun mit sich selbst (Kouzarides und Ziff, 1988; Ransone et al., 1989; Rauscher III et al., 1988b; Smeal et al., 1989; Turner und Tjian, 1989). Eine Mischung aus 0.75 µl cJun und 0.75 µl vFos bindet z.B. etwa 10 mal besser als 1.5 µl cJun alleine (Abb. 15). Damit ist klar, daß das hier verwendete synthetische Oligonukleotid einschließlich der flankierenden Linker-Sequenzen in der Lage ist, spezifisch mit cJun und cJun/vFos *in-vitro* zu interagieren, und damit auch cJun/cFos aus HeLa Kernextrakten binden kann. Als nächstes wurde die Verteilung des AP-1-Transkriptionsfaktors in der Zelle untersucht. AP-1 wurde bisher nur im Kern einer Zelle gefunden. Ein Vergleich der Bindung von HeLa Kern- und Cytoplasmaextrakten an das Collagenase-URE ergab, daß Bindung von Proteinen an das Oligonukleotid tatsächlich nur im Kern nachzuweisen ist (Abb. 22).



**Abb. 16** Direkter Kontakt von cJun und cFos mit dem Collagenase-URE. Im linken Teil der Abbildung wurden  $^{35}\text{S}$ -markierte RIPA-Extrakte aus unbehandelten und für 90 min mit TPA behandelten HeLa Zellen mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert und auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. M = Protein-Längenmarker; NRS = Kontroll-Kaninchenserum; anticJun = cJun-Antikörper; antivJun = vJun-Antikörper; 411 = Fos-Antikörper 411; 455 = Fos-Antikörper 455. Im rechten Teil der Abbildung wurde das radioaktiv markierte Collagenase-URE mit Kernextrakten aus für 4 h mit 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen inkubiert und anschließend durch UV-Bestrahlung die DNA-Proteinkomplexe vernetzt. Die DNA-Proteinkomplexe wurden dann mit Fos-Antikörper 455 immunpräzipitiert und parallel zu den  $^{35}\text{S}$ -markierten Immunpräzipitationen aufgetragen.

Sowohl Antikörper gegen vJun (die mit cJun kreuzreagieren; Abb. 16) als auch gegen vFos und cFos hemmen die Komplexbildung am Collagenase-URE mit HeLa Kernextrakten, was zeigt, daß dieser Komplex Proteine enthält, die sich immunologisch von cJun und cFos nicht unterscheiden lassen (Abb. 20, 24). Die Hemmung durch die vJun-Antikörper (Kaninchenserum gegen das gesamte vJun) ist spezifisch, da die Bindung von Proteinen an eine nicht-verwandte Sequenz aus dem SV40-Promoter (SV40) unbeeinflusst bleibt. Ebenso zeigt Kontroll-Kaninchenserum (NRS) keinen Einfluß auf die Bindung am Collagenase-URE (Abb. 20). Zum Nachweis von cFos in dem DNA-Proteinkomplex wurden polyklonales Kaninchenserum gegen einen Bereich aus vFos (Abb. 20) und monoklonale Maus-Antikörper gegen Peptide aus verschiedenen Regionen von cFos (ein Beispiel gezeigt in Abb. 24) eingesetzt. In beiden Fällen wird die Komplexbildung effektiv verhindert. Die Bindung von Proteinen an das SV40-Oligonukleotid bleibt dagegen durch die Antikörper unbeeinflusst (Abb. 20, 24).

Eine andere Methode um zu zeigen, daß der in "Bandshift"-Analysen beobachtete Proteinkomplex am Collagenase-URE aus cJun und cFos besteht und beide Proteine auch direkten Kontakt mit der DNA haben, ist das sogenannte "UV-crosslinking". Dazu wurden HeLa Kernextrakte mit dem radioaktiv markierten Collagenase-URE inkubiert, und die entstehenden DNA-Proteinkomplexe durch Bestrahlung mit einer hohen UV-Dosis kovalent vernetzt. Anschließend wurden diese Komplexe mit cJun- oder cFos-Antikörpern

immunpräzipitiert und auf einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (gezeigt für Fos-Antikörper 455 in Abb. 16, rechte Spur). Zum Vergleich sind Immunpräzipitationen von <sup>35</sup>S-Methionin-markierten Proteinen aus HeLa Extrakten mit verschiedenen Jun- und Fos-Antikörpern, die auch für andere Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet wurden, gezeigt. Die Fos-Antikörper 411 und 455 (siehe Materialien und Methoden) präzipitieren Proteine im Bereich von 55-60 kD, die nach 90 min Phorbol ester-Behandlung der Zelle sehr stark vermehrt sind. Dabei handelt es sich um die schon beschriebenen modifizierten Formen von cFos (Müller et al., 1987). Die Präzipitation dieser Proteine durch die Antikörper ist spezifisch, da Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen diese Proteine nicht erkennt (NRS in Abb. 16). Die Fos-Antikörper präzipitieren noch drei weitere Proteine von 39, 42 und 45 kD, die ebenfalls in Extrakten aus Phorbol ester-behandelten Zellen vermehrt sind. In denaturierten Proteinextrakten werden diese Proteine durch Fos-Antikörper nicht mehr erkannt (Müller et al., 1987), was bedeutet, daß diese Proteine mit cFos Heterodimere bilden und nur indirekt präzipitiert werden. Diese drei Proteine werden auch durch den vJun-Antikörper immunpräzipitiert. Der cJun-Antikörper erkennt dagegen nur das 42 kD Protein (Abb. 16). Dies läßt vermuten, daß es sich hierbei um cJun handelt. Die Identität der zwei anderen Proteine von 39 und 45 kD ist nicht bekannt. Beide Jun-Antikörper erkennen hauptsächlich nur cJun-Homodimere und haben zu cJun/cFos-Heterodimeren eine sehr kleine Affinität, da cFos nur schwach kopräzipitiert wird. Die Fos-Antikörper erkennen dagegen, wie schon erwähnt, sowohl freies cFos als auch cJun/cFos-Heterodimere.

Proteine, die an das Collagenase-URE durch "UV-crosslinking" kovalent gebunden wurden, wandern im SDS-Gel durch das angehängte Oligonukleotid verlangsamt. Die Berechnung der Molekülmasse des einzelsträngigen Oligonukleotids und "UV-crosslinking" von Eichproteinen mit diesem Oligonukleotid ergaben einen Beitrag von 5-6 kD (Daten nicht gezeigt). Somit handelt es sich bei den mit Fos-Antikörper 455 präzipitierten 64 kD und 48 kD DNA-Proteinkomplexen um cFos und cJun, die mit dem Collagenase-URE kovalent vernetzt wurden (Abb. 16). In nicht-stimulierten Zellen findet man die gleichen Proteine mit der DNA vernetzt, aber in geringerer Zahl. Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen präzipitiert diese Proteine nicht (Daten nicht gezeigt). Die zwei Banden bei ~35 kD und ~140 kD sind unspezifisch vernetzte und präzipitierte Proteine.

Es bindet also sowohl in nicht-stimulierten, als auch UV- oder Phorbol ester-behandelten Zellen ein identischer Proteinkomplex an den Collagenase-Enhancer, der zumindest zum größten Teil aus cJun/cFos-Heterodimeren besteht. Die Beteiligung von immunologisch kreuz-reagierenden Proteinen ähnlicher Molekülmasse aus der AP-1-Familie wie JunB, JunD, CREB, Fra, FosB usw. kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden (Cohen et al., 1989; Curran und Franza Jr., 1988; Hai et al., 1988; Hirai et al., 1989; Nakabeppu et al., 1988; Ryder et al., 1989; Zerial et al., 1989).

## 7. Von cJun/cFos verschiedene Faktoren aus der AP-1 Familie binden an die UREs von c-jun

Das *c-jun* Gen gehört zu einer Gruppe von Genen, die innerhalb von Minuten durch Wachstumsfaktoren, UV oder Phorbolster aktiviert werden (gezeigt für UV und TPA in Abb. 3A). Im Bereich von den Positionen -72 bis -63 wurde von Angel et al. (1988b) eine Sequenz definiert, die ähnlich der AP-1-Bindestelle im Collagenase-Promoter ist und in F9 Teratokarzinoma-Zellen durch Überexpression von cJun aktiviert wird. Dennoch verhält sich der *c-jun*-Promoter in mehrfacher Hinsicht völlig verschieden von dem Collagenase Promoter. (I) Die Induktion der Expression der Collagenase durch UV ist viel schwächer als durch Phorbolster, während *c-jun* durch UV besser induziert wird als durch Phorbolster (Abb. 3). (II) Das Optimum der RNA-Menge nach UV- oder Phorbolster-Behandlung ist bei *c-jun* viel früher (Abb. 3). (III) Das Adenovirus E1A-Onkogenprodukt hemmt die Collagenase-Expression, erhöht aber die *c-jun*-Transkription (Offringa et al., 1990; van Dam et al., 1990). Die UV- und Phorbolster-vermittelte Induktion sowie die E1A-vermittelte Hemmung der Expression der Collagenase sind vom Vorhandensein der AP-1-Bindestelle abhängig. Für die Aktivierung der *c-jun*-Expression durch UV ist neben der von Angel et al. (1988b) definierten Sequenz noch eine zweite AP-1-ähnliche Bindestelle zwischen den Positionen -191 und -182 verantwortlich. Das unterschiedliche Verhalten der *c-jun* und Collagenase Gene *in-vivo* könnte daher auf Bindung von verschiedenen Faktoren aus der AP-1 Familie an diese Sequenzen beruhen (Stein et al., 1990a; Stein et al., 1990b).

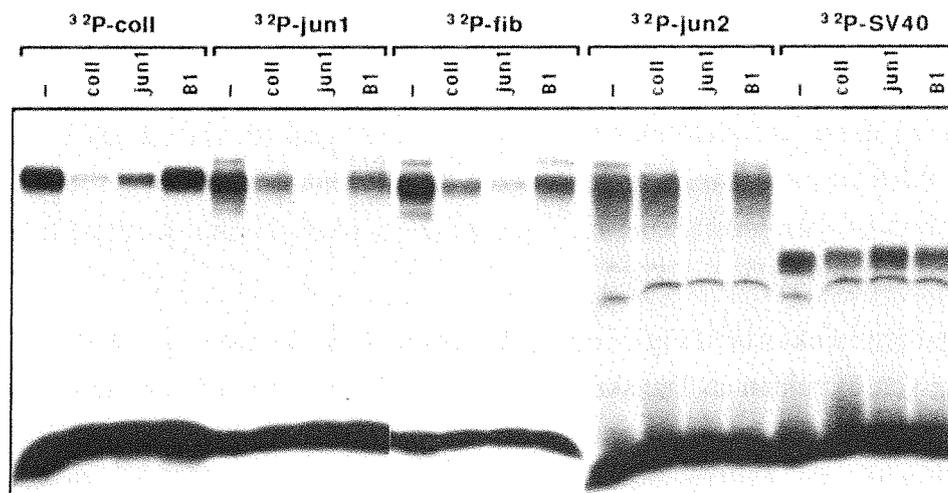
### Verarmung von Extrakten über DNA-Affinitätssäulen

Die schon erwähnten Kompetitions-Experimente haben gezeigt, daß an das 1. und 2. URE des *c-jun*-Promoter *in-vitro* Faktoren binden, die zwar untereinander ein recht ähnliches Kompetitionsverhalten haben, aber nicht identisch sein können mit den Proteinkomplexen am Collagenase- und HIV-1-URE.

Unterschiedliche Faktorbindung an die definierten UREs konnte auch durch spezifische Verarmung von Extrakten an Transkriptionsfaktoren durch Affinitäts-Chromatographie über Oligonukleotid-Säulen gezeigt werden. Dazu wurden drei verschiedene Säulen verwendet, an die entweder das Collagenase-URE (coll), das 1. URE von *c-jun* (jun1) oder als Kontrolle eine irrelevante Sequenz (B1: Aktivator des *Xenopus* B1 Vitellogenin Gens; W. Kugler und K. Ross, unveröffentlicht) gekoppelt wurde. Eine Verarmung der Protein-extrakte über die B1-Aktivator-Säule hat keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität am Collagenase-URE und SV40-Oligonukleotid (Abb. 17). Damit wird unspezifische Adsorp-

tion dieser Faktoren an das Säulenmaterial ausgeschlossen. Die Bindung von Faktoren an des 1. und 2. URE von *c-jun* und an das Fibronectin-CRE wird dagegen durch die B1-Aktivator-Säule beeinflusst. Es ist zur Zeit nicht klar, ob dies auf unspezifischer Adsorption der Faktoren an das Säulenmaterial beruht, oder ob die B1-Aktivator-Sequenz eine Affinität für diese Faktoren hat. In Konkurrenzexperimenten konnte die Proteinbindung an diese zwei Oligonukleotide mit bis zu 500 fachen molaren Überschüssen der B1-Aktivator-Sequenz nicht gehemmt werden.

Dreimalige Verarmung von HeLa Kernextrakten über die Collagenase-Enhancer-Säule reduziert die Bindung am Collagenase-URE auf 7%, im Gegensatz zu einer Verarmung über die jun1-Enhancer-Säule, die die Bindung nur auf 24% abschwächt. In umgekehrter Weise wird die Bindung von Faktoren an das 1. URE von *c-jun* durch die jun1-Enhancer-Säule auf 7% reduziert, durch die Collagenase-Enhancer-Säule dagegen nur auf 34% abgeschwächt. Ein ähnliches Muster der Verarmung findet man am Fibronectin-CRE. Die Proteinkomplex-Ausbildung am 2. URE von *c-jun* wird nur durch Verarmung von Extrakten über die jun1-Enhancer-Säule beeinflusst (20% restliche Bindung bei Verarmung über die jun1-Enhancer-Säule, aber noch 85% Bindung bei Verarmung über die Collagenase-Enhancer-Säule). Zu beachten ist, daß der Teil der Abbildung mit den *c-jun*- und Fibronectin-Oligonukleotiden kürzer exponiert wurde, um im linearen Bereich der Filmschwärzung zu bleiben. Die Bindung von Proteinen an eine nicht-verwandte Sequenz aus dem SV40-Promoter wird durch Verarmung über keine der Säulen signifikant beeinflusst.



**Abb. 17** Verarmung von Extrakten über Affinitätssäulen. Kernextrakte aus für 1 h mit 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen wurden über die angegebenen DNA-Affinitätssäulen (coll, jun1, B1) verarmt oder blieben unbehandelt (-). 5 µg dieser verarmten Extrakten wurden mit 0.5 µg poly(dIdC) und 2 fmol der im oberen Teil der Abbildung gezeigten radioaktiv markierten Oligonukleotide inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt.

Somit bestätigen diese Daten die Kompletions-Experimente. Die Faktoren an den UREs von *c-jun* sind ähnlich, können aber aufgrund ihrer Bindeaktivitäten in den verarmten Extrakten von den Faktoren am Collagenase-URE deutlich abgegrenzt werden. Während in den Kompletionsexperimenten das Collagenase-URE selbst bei 500 fachen molaren Überschüssen kaum um Bindung an den *c-jun*- und Fibronectin-Enhancern kompetieren konnte (Abb. 12), reduziert es zwar hier die Bindung, aber rund fünfmal schlechter als das *c-jun*-URE.

### **Bakteriell exprimiertes cJun/Fos bindet mit größter Affinität an den Collagenase-Enhancer**

Es wurde bereits gezeigt, daß DNA-affinitätsgereinigtes AP-1 aus HeLa Zellen bzw. bakteriell exprimiertes cJun- und cJun/vFos-Fusionsprotein auch an die AP-1-ähnlichen Bindesequenzen des *c-jun*- und Fibronectin-Promoter binden (Abb. 15; Angel et al., 1988b; Hai et al., 1988; Stein et al., 1990a), und daß ein minimales *c-jun* CAT-Konstrukt mit Sequenzen von den Positionen -79 bis +170 durch cJun-Überexpression aktiviert wird (Angel et al., 1988b; van Dam et al., 1990). Da die bisherigen Experimente verdeutlicht haben, daß an die AP-1-ähnlichen Bindesequenzen im *c-jun*- und Fibronectin-Promoter Faktoren binden, die nicht identisch mit den Faktoren am Collagenase-URE sein können, wurde die Affinität von bakteriell exprimierten, gereinigten cJun und vFos zu dem Collagenase-URE, ersten *c-jun*-URE und Fibronectin-CRE verglichen (Abb. 15). cJun-Homodimere binden nur sehr schlecht an das *c-jun*-URE und auch cJun/vFos-Heterodimere binden noch rund 7 fach schlechter an das *c-jun*-URE oder Fibronectin-CRE als an das Collagenase-URE. Die Bindungsstudien mit den bakteriell exprimierten Proteinen zeigen also, wie auch die Kompletionsexperimente mit HeLa Kernextrakten, daß cJun/cFos an das *c-jun*-URE binden kann, jedoch deutlich schlechter als an das Collagenase-URE. Die Möglichkeit, daß das 1. URE des *c-jun*-Promoter wie auch das Fibronectin-CRE ausschließlich cJun/cFos binden, die Stärke der Bindung aber geringer ist als beim Collagenase-URE, kann ausgeschlossen werden. In den Kompletionsexperimenten konnte der Collagenase-Enhancer nämlich nicht um Bindung am *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer kompetieren (Abb. 12), was für unterschiedliche Faktoren spricht.

### **Zelltypspezifische Regulation von Faktoren der AP-1 Familie**

In unbehandelten F9 Teratokarzinoma-Zellen ist weder cJun/cFos, noch *c-jun*- und *c-fos*-RNA nachweisbar (Kryszke et al., 1987; Chiu et al., 1988; Schönthal et al., 1988a; H.J. Rahmsdorf, unveröffentlicht). Ebenso ist in den Neuroblastoma-Zellen Kelly keine Bindeaktivität an die Metallothionein-IIA AP-1-Bindestelle feststellbar (Hay et al., 1989).

Im Gegensatz dazu sind die Faktoren, die an das erste URE des *c-jun*-Promoters und an das Fibronectin-CRE binden, in großer Menge in diesen Zellen vorhanden (Abb. 18). F9 und Kelly Zellen sind daher Beispiele für eine differentielle Regulation von verwandten Transkriptionsfaktoren, die über ähnliche Bindesequenzen ihre Wirkung ausüben.

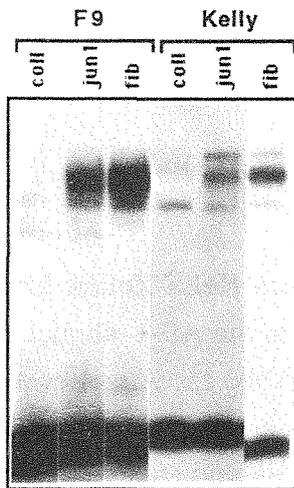


Abb. 18 Keine Bindung an das Collagenase-URE in F9 und Kelly Zellen. Je 10 µg Gesamtzell-Extrakt aus unbehandelten F9 oder Kelly Zellen wurde mit den angegebenen radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt.

#### Die Faktoren am Collagenase-, *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer unterscheiden sich in ihrer Sensitivität gegenüber Proteinkinasen *in-vivo* und Dephosphorylierung *in-vitro*

Es wurde gezeigt, daß verschiedene Faktoren aus der AP-1 Familie, unabhängig von der Antwort der Zelle auf Induktoren, phosphoryliert sind (Angel et al., 1988a; Curran et al., 1984; Montminy und Bilezikjian, 1987; Montminy et al., 1986; Müller et al., 1987). Weiterhin aktivieren die hier verwendeten Agenzien wie UV oder Phorbolster Proteinkinasen (Blumberg, 1988; Büscher et al., 1988; Nishizuka, 1984; Stein et al., 1988). Es wurde daher untersucht, ob Inhibitoren der Proteinkinasen *in-vivo* und Dephosphorylierung von Extrakten *in-vitro* die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die UREs im Collagenase-, *c-jun*- und Fibronectin-Promoter beeinflussen. Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren *in-vitro* konnte nicht untersucht werden, da uns die entsprechenden Expressionsvektoren für Proteinkinasen nicht zur Verfügung standen. Für die Inhibition der Proteinkinasen *in-vivo* wurde das Isoquinolin Derivat H7 verwendet (Hidaka et al., 1984). H7 ist ein sehr effektiver Hemmstoff der verschiedensten Proteinkinasen und blockiert zum Beispiel die Induktion von *c-fos* durch UV, Phorbolster und cAMP (Büscher et al., 1988).

Vierstündige Behandlung der Zellen mit H7 reduziert sowohl die basale als auch die Phorbolster-induzierte Bindung des Transkriptionsfaktor-Komplexes am Collagenase-Enhancer etwa vierfach (Abb. 19A). Diese Reduktion wird auch bei blockierter Proteinsynthese beobachtet (Abb. 19A, Spur 4h15' H7+An). H7 hat also einen direkten

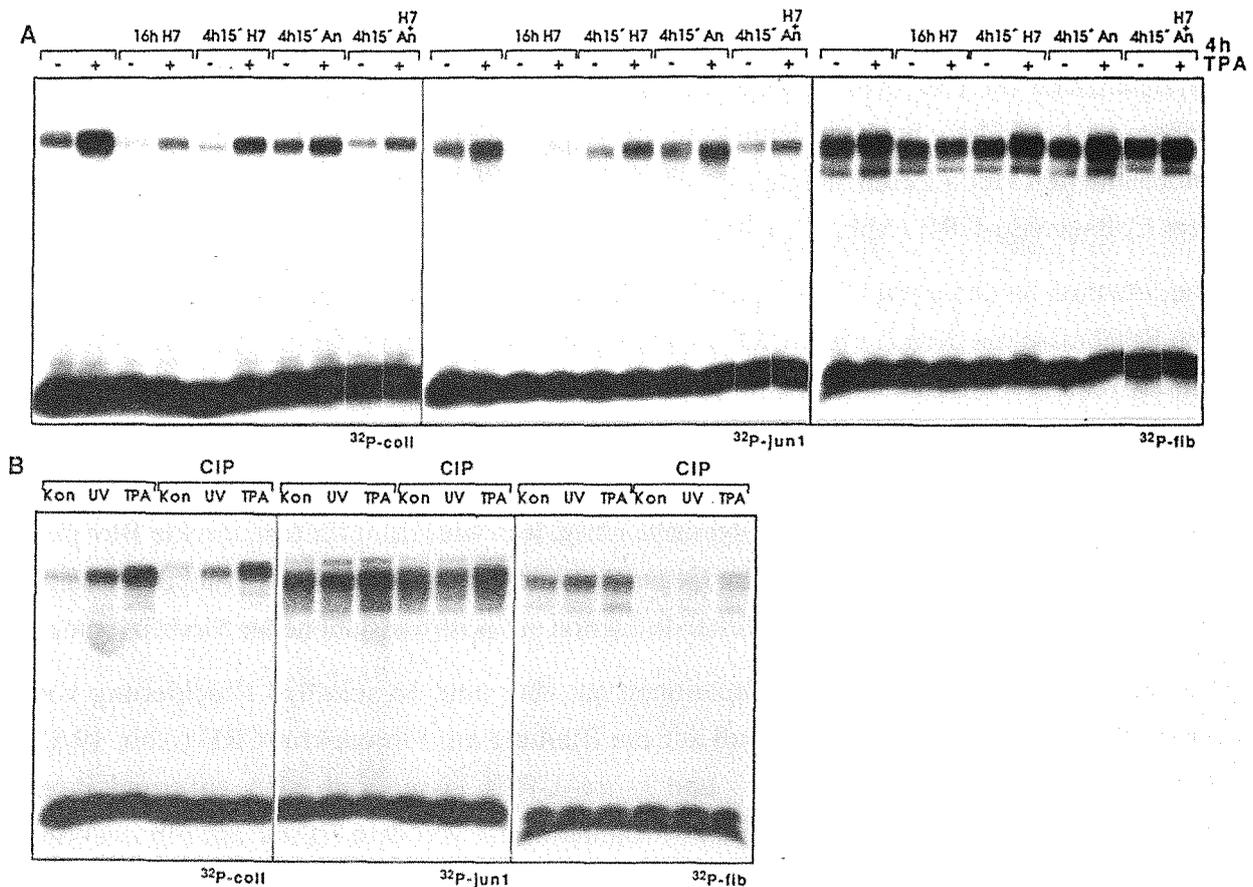


Abb. 19 Unterschiedliche Sensitivität gegenüber Proteinkinasen *in-vivo* und Dephosphorylierung *in-vitro*. (A) HeLa Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit dem Proteinkinase-Inhibitor H7 (80  $\mu\text{M}$ ) und/oder mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin (An; 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Während der letzten 4 Stunden der Inkubation wurde die Hälfte der Ansätze mit 60 ng/ml TPA behandelt (+TPA). Nach Präparation der Kernextrakte wurden diese mit den angegebenen radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt. (B) Kernextrakte aus unbehandelten (Kon), für 4 h mit 30  $\text{J}/\text{m}^2$  UV oder 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen wurden für 20 min mit 12 U Alkalischer Phosphatase (CIP) oder nur mit dem Puffer des Enzyms bei 37°C inkubiert. Der "Bandshift"-Puffer enthielt bei diesen Experimenten kein KCl, da das Salz durch den Puffer der Alkalischen Phosphatase geliefert wurde (75 mM NaCl). Die Oligonukleotide wurden in diesen Fällen durch Auffüllen der 5' Überhänge radioaktiv markiert.

Einfluß auf den Phosphorylierungszustand von cJun/cFos. Behandlung mit Anisomycin alleine läßt die basale Bindung unverändert, verhindert aber die Phorbolster-induzierte Neusynthese von cJun/cFos. Der noch rund zweifache Anstieg in der Bindung nach gleichzeitiger Zugabe von Anisomycin und Phorbolster beruht auf post-translationeller Modifizierung von schon vorhandenem cJun/cFos. Der Abbau des Proteinkomplexes durch Blockierung der Synthese von in der Signalkette zwischengeschalteten Proteinen durch H7 kann ausgeschlossen werden, da das cJun/cFos-Heterodimer relativ stabil ist (keine Änderung der Bindung nach 4 Stunden Blockierung der Proteinsynthese) und die H7-vermittelte Reduktion auch in Gegenwart blockierter Proteinsynthese stattfindet. Der Phorbolster-induzierte Anstieg der Bindung wird aber selbst nach 16 Stunden H7-Behandlung kaum beeinflusst. Der Teil der Abbildung mit dem radioaktiv markierten

Collagenase-URE ist länger exponiert als der übrige Teil der Abbildung, weshalb die basale Bindeaktivität am Collagenase-Enhancer im Vergleich zu den *c-jun*- und Fibronectin-Enhancern hier relativ hoch erscheint. Verschiedene unabhängige Extraktpräparationen aus unbehandelten HeLa Zellen zeigten immer die geringste Proteinkomplex-Ausbildung mit dem Collagenase-URE (Abb. 17, 19B, 20).

Die Situation an den *c-jun* UREs ist ähnlich (Gezeigt ist nur die Situation am 1. *c-jun* URE. Die Ergebnisse mit dem 2. *c-jun* URE waren identisch). Eine rund vierstündige Behandlung mit H7 reduziert die Bindung an das 1. *c-jun* URE mit Extrakten aus nicht-behandelten und Phorbolster-behandelten Zellen etwa zweifach weniger als beim Collagenase-URE, nach 16 Stunden Behandlung geht die Bindung aber auch drastisch zurück (Abb. 19A). Auch hier ist für die Effekte von H7 keine Proteinsynthese nötig, was wiederum für eine direkte Blockierung von Phosphorylierung spricht. Im Gegensatz zum Collagenase-URE beruht der gesamte Anstieg der Bindung nach Phorbolster-Induktion auf post-translationeller Modifizierung.

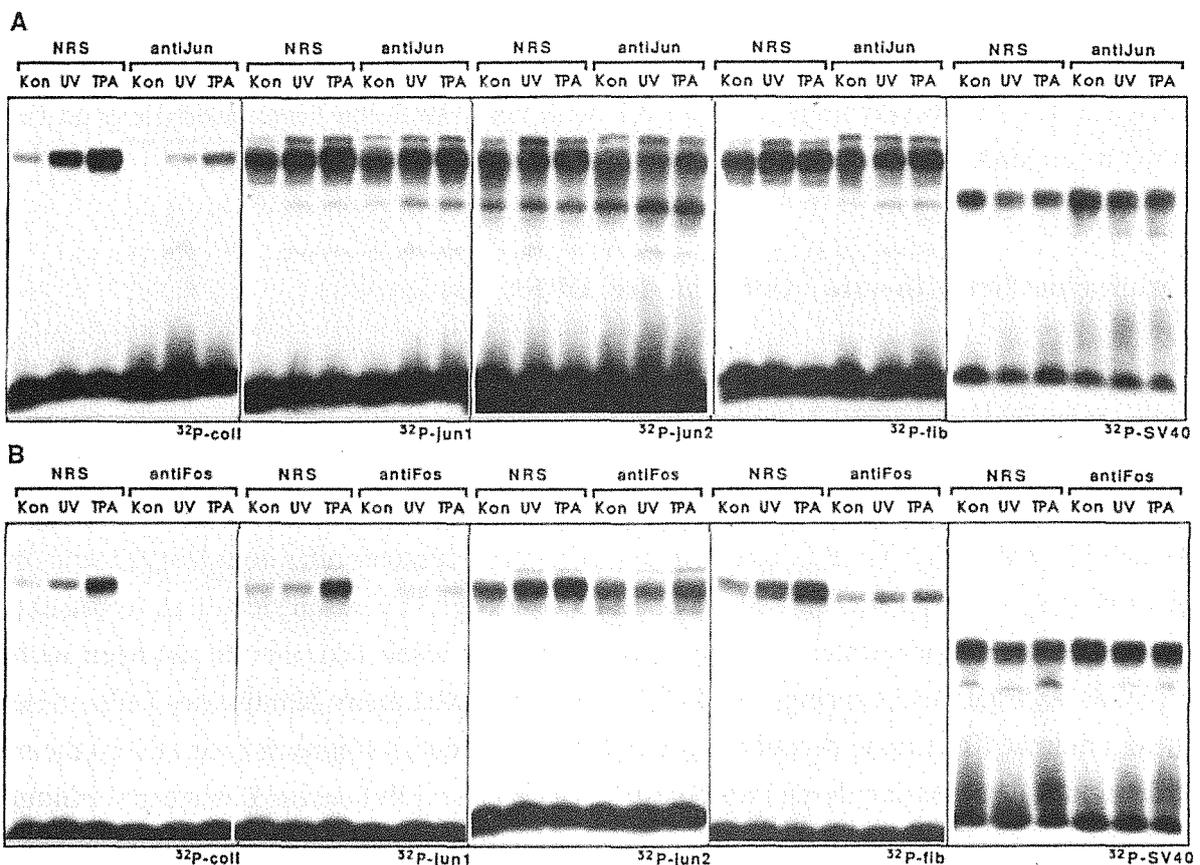
Im Gegensatz zu den bisherigen Situationen hat aber eine 16 stündige Blockierung von Proteinkinasen mit-H7 keinen Einfluß auf die Bindung am Fibronectin-CRE (Abb. 19A). Die Faktoren an den Collagenase- und *c-jun*-UREs lassen sich also aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber H7-blockierbaren Proteinkinasen von dem Faktor am Fibronectin-CRE unterscheiden.

Im Vergleich zu diesen *in-vivo* Experimenten wurde der Effekt der Entfernung von Phosphatgruppen auf die DNA-Bindung *in-vitro* untersucht. Für die *in-vitro* Dephosphorylierung wurden Kernextrakte aus HeLa Zellen für 20 Minuten mit Alkalischer Phosphatase inkubiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit einer Sauren Phosphatase erhalten. Die Spezifität der *in-vitro* Dephosphorylierung wurde durch Blockierung mit Inhibitoren der Alkalischen Phosphatase ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) und Kompetitorsubstraten wie Glucose-6-Phosphat bewiesen (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. 19B zu sehen, reagieren die Transkriptionsfaktoren an den drei UREs verschieden auf Dephosphorylierung. Die Bindung am Collagenase-URE wird etwas reduziert, auffälliger ist jedoch die verlangsamte Wanderung der DNA-Proteinkomplexe. Die Bindung von Proteinen an das 1. URE von *c-jun* wird (wie auch an das 2. URE von *c-jun*; Daten nicht gezeigt) überhaupt nicht durch die Phosphatase-Behandlung der Extrakte beeinflusst, während die Bindung am Fibronectin-CRE völlig verschwindet. Dies zeigt, daß auch für die Bindung des Proteinkomplexes am Fibronectin-CRE Phosphatgruppen nötig sind, was auch von anderen Gruppen bereits gezeigt wurde (Gonzalez und Montminy, 1989; Yamamoto et al., 1988). H7 kann offenbar die Kinase, die dafür verantwortlich ist, nicht blockieren.

Diese Experimente lassen also den Schluß zu, daß unterschiedliche Faktoren an die Enhancer-Elemente im Collagenase-, *c-jun*- und Fibronectin-Promoter binden.

## Antikörper gegen Jun hemmen nur die Bindung von Proteinen am Collagenase-URE, Antikörper gegen Fos dagegen an allen UREs

Die Bindung von AP-1 an den Collagenase-Enhancer mit Extrakten aus unbehandelten, UV- oder Phorbol ester-behandelten Zellen kann, wie schon im Kapitel 6 erläutert, durch Antikörper gegen vJun (die mit cJun kreuzreagieren; Abb. 16) blockiert werden. Um festzustellen, ob cJun auch in den Proteinkomplexen an den *c-jun*-UREs oder dem Fibronectin-CRE beteiligt ist, wurde die Komplexbildung in Anwesenheit von vJun-Antikörpern untersucht (Abb. 20A). Während die vJun-Antikörper die Bindung am Collagenase-Enhancer effektiv blockieren, wurde an den anderen Bindesequenzen nur leichte Hemmung gefunden. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn die Extrakte vor Inkubation mit dem Oligonukleotid durch Immunpräzipitation mit vJun-Antikörpern an cJun



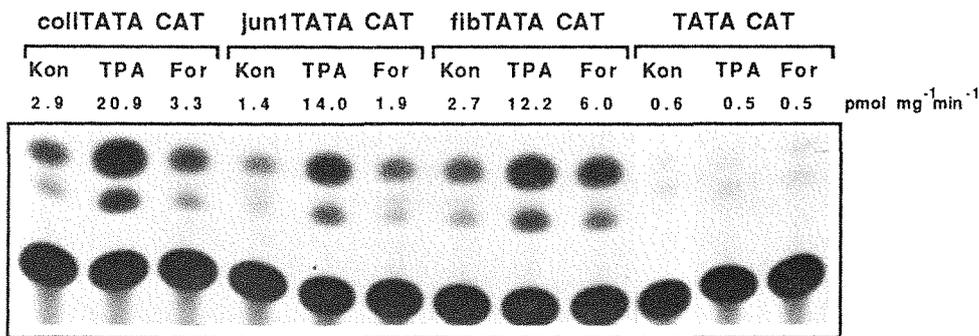
**Abb. 20 (A)** Jun-Antikörper blockieren die Proteinbindung nur am Collagenase-URE. Kernextrakte aus unbehandelten (Kon), für 4 h mit  $30 \text{ J/m}^2$  UV (254 nm) oder für 4 h mit 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen wurden für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  mit Kontroll-Kaninchenserum (NRS) oder vJun-Antikörper (antiJun) inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde bei RT noch 30 min inkubiert bevor die Komplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt wurden. **(B)** Fos ist nötig für die Komplexbildung an den UREs von Collagenase, *c-jun* und dem Fibronectin-CRE. Kernextrakte aus unbehandelten (Kon), für 4 h mit  $30 \text{ J/m}^2$  UV (254 nm) oder für 4 h mit 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen wurden für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  mit Kontroll-Kaninchenserum (NRS) oder Fos-Antikörper 262 (antiFos) inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde bei RT noch 30 min inkubiert, bevor die Komplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt wurden.

Protein verarmt wurden. Dieses Experiment zeigt also, daß cJun in den Proteinkomplexen am *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer höchstens in kleinen Mengen beteiligt sein kann. Die Beteiligung von JunB und JunD an diesen Proteinkomplexen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die vJun-Antikörper mit den immunologisch-ähnlichen Proteinen JunB und JunD kreuzreagieren (P. Angel, persönliche Mitteilung), und der *c-jun*-Promoter durch Überexpression von JunB oder JunD in HeLa Zellen höchstens zweifach *trans*-aktiviert wird (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu hemmen Antikörper gegen vFos die Komplexbildung nicht nur am Collagenase-Enhancer sondern auch an den *c-jun*- und Fibronectin-Enhancern (Abb. 20B). Die Proteinbindung an eine nicht-verwandte Sequenz (SV40) wird durch den vFos-Antikörper nicht beeinflußt. Dies zeigt, daß Fos oder ein immunologisch ähnliches Protein an den Proteinkomplexen dieser drei Gene beteiligt ist. Die etwas schlechtere Blockierung der Bindung am 2. URE von *c-jun* und dem Fibronectin-CRE könnte bedeuten, daß neben einem Heterodimer mit cFos noch ein Homodimer ohne cFos an diese Sequenzen bindet, oder daß die Antikörpermenge nicht ausreichend war, sämtliche Proteinkomplexe an der Bindung zu hindern.

### Unterschiedliche *in-vivo* Aktivität der UREs

Die bisherigen Befunde *in-vitro*, daß die Enhancer der Collagenase, *c-jun* und Fibronectin Gene verschiedene Faktoren binden, werden unterstützt durch unterschiedliche physiologische Regulation *in-vivo* von Promoterkonstrukten, die diese synthetischen Binde-sequenzen enthalten. Diese Konstrukte enthalten die Enhancer-Sequenzen als Oligonukleotide vor der TATA-Box des *Xenopus* Albumin-Promoter oder dem *Herpes simplex* tk-Promoter. In verschiedenen Zellen wie HeLa oder NIH 3T3 lassen sich diese Konstrukte durch UV und Phorbolster aktivieren, die enhancer-losen Promoteren dagegen nicht (Abb. 8, 10, Daten nicht gezeigt). In T47D Zellen, eine Mammary-Karzinoma-Zelle, in der diese Minimal-Konstrukte besonders gut exprimiert werden, vermitteln zwar alle Elemente Induktion der Expression durch Phorbolster, aber nur der Fibronectin-Enhancer vermittelt Induktion durch Forskolin, das über eine Aktivierung der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht (Abb. 21). Die Expression des entsprechenden Vektors wird durch diese Agenzien nicht erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden in NIH 3T3 Zellen mit tk-Promoter-Konstrukten erhalten (Daten nicht gezeigt). Mit HeLa Zellen konnte dieses Experiment nicht durchgeführt werden, da Forskolin in diesen Zellen die Adenylatzyklase nicht aktiviert (Delegeam et al., 1987). Die Faktoren, die nach Forskolin-Behandlung an das Fibronectin-CRE *in-vivo* binden, können somit nicht identisch mit den an die anderen Elemente bindenden Faktoren sein. Die Aktivität des Collagenase-Enhancers und des



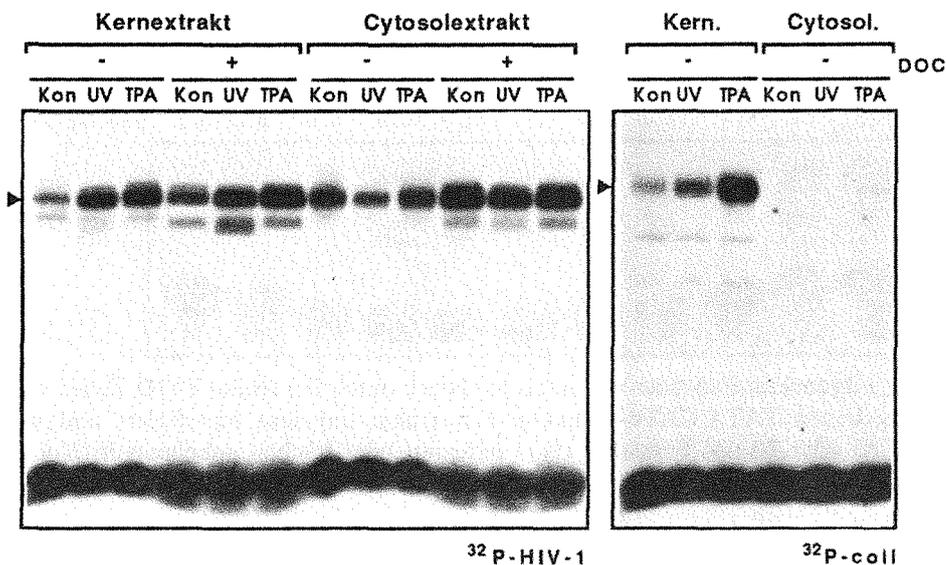
**Abb. 21** Nur der Fibronectin-Enhancer vermittelt Induktion durch Forskolin. T47D Zellen wurden mit je 10 µg der angegebenen TATA CAT6-Promoter-Konstrukte transient transfiziert und mit 60 ng/ml Phorbol ester (TPA) oder 20 µM Forskolin (For) induziert oder blieben unbehandelt (Kon). 42 h nach Induktion wurde die CAT-Aktivität bestimmt und in pmol•mg<sup>-1</sup>•min<sup>-1</sup> angegeben.

1. URE von *c-jun* kann *in-vivo* ebenfalls nicht durch gleiche Faktoren verursacht werden. Sowohl die basale als auch die Phorbol ester-induzierte Aktivität eines minimalen Collagenase-Enhancer-Konstrukts wird durch das E1A-Onkogenprodukt gehemmt (Offringa et al., 1990), während die basale und Phorbol ester-induzierte Aktivität des 1. UREs von *c-jun* durch E1A nicht beeinflusst wird (van Dam et al., 1990).

Aus diesen Experimenten kann man also folgern, daß die Transkriptionsfaktoren, die sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* an das 1. URE des *c-jun*-Promoter binden, nicht identisch mit den Faktoren am Collagenase- und Fibronectin-Enhancer sind.

## 8. An den HIV-1-Enhancer bindet ein Komplex aus NF-κB mit cJun und cFos

Der HIV-1-Enhancer ist eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF-κB (Kawakami et al., 1988; Lenardo und Baltimore, 1989; Nabel und Baltimore, 1987). Es wurde daher vermutet, daß die hier beobachteten *in-vitro* Proteinkomplexe mit Kernextrakten aus HeLa Zellen NF-κB enthalten. Dies wurde durch eine Reihe von Experimenten bewiesen. (I) NF-κB ist im Cytoplasma mit einem Inhibitor assoziiert, kann jedoch durch dissoziierende Agenzien wie Natriumdesoxycholat (DOC) davon befreit werden (Baeuerle und Baltimore, 1988a; Baeuerle und Baltimore, 1988b). Wie in Abb. 22 gezeigt, erhöht DOC die Bindung von cytoplasmatischen Extrakten aus HeLa Zellen an das HIV-1-URE. (II) Hemmstoffe der Proteinsynthese wie Anisomycin oder Cycloheximid verursachen einen Anstieg von NF-κB im Zellkern infolge einer Degradation des labilen cytoplasmatischen Inhibitors (Baeuerle und Baltimore, 1988b; Sen und Baltimore, 1986). In Kernextrakten aus mit Anisomycin-behandelten HeLa Zellen wurde erhöhte NF-κB-Bindeaktivität gefunden (Daten nicht gezeigt). (III) Eine weitere Eigenschaft von NF-κB ist, daß durch Nukleosidtriphosphate die



**Abb. 22** HIV-1 Enhancer-Bindeaktivität im Cytoplasma und Kern. Kern- und Cytoplasma-Extrakte wurden von HeLa Zellen präpariert zu Zeiten, bei denen die Bindeaktivität maximal war (siehe Abb. 14; HIV-1: UV 8h, TPA 1h; Collagenase: UV 4h, TPA 4h). Zum quantitativen Vergleich wurden Kern- und Cytoplasma-Extrakte von der gleichen Anzahl an Zellen eingesetzt. Die Extrakte wurden mit den angegebenen Oligonukleotiden inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt. Wo angegeben wurden die Extrakte zusätzlich mit 0,6% DOC, 1,2% NP-40 (+DOC) behandelt.

Bindungsaktivität erhöht wird (Lenardo et al., 1988). Eine 3 mM GTP Lösung erhöht die Bindung von HeLa Kernextrakten an das HIV-1-URE (Daten nicht gezeigt). (IV) Das Laufverhalten des DNA-Proteinkomplexes mit HeLa Kernextrakten ist identisch mit dem Laufverhalten von Kernextrakten aus lymphoiden Zellen und von NF- $\kappa$ B aus Cytoplasma menschlicher Placenta, das über DNA-Affinitätschromatographie mit der HIV-1-URE-Sequenz gereinigt wurde (Abb. 25, Daten nicht gezeigt).

Ein anderer Transkriptionsfaktor, der an der Induktion von Genen durch UV beteiligt ist, ist das schon erwähnte AP-1. Obwohl die Bindesequenzen für NF- $\kappa$ B und AP-1 verschieden sind (Abb. 11), wurde durch hohe Überschüsse der AP-1-Bindestelle die Bindung am HIV-1-URE reduziert (Abb. 12A). Dies war Anlaß zu untersuchen, ob NF- $\kappa$ B und AP-1 gemeinsame Komponenten enthalten könnten. Es konnte eine Beteiligung von cJun/cFos sowohl an der transkriptionellen Regulation des HIV-1-Enhancers als auch eine direkte Interaktion mit NF- $\kappa$ B gezeigt werden.

### **Fos und Jun sind für die transkriptionelle Regulation des HIV-1-Enhancers nötig**

In früheren Experimenten wurde gezeigt, daß cFos und cJun für die transkriptionelle Aktivierung der Collagenase nötig sind (siehe dazu Kapitel 6). Überexpression von sowohl cFos als auch cJun in der Zelle mit Hilfe von Expressionsvektoren unter der Kontrolle des

RSV LTR aktiviert die Collagenase über die AP-1-Bindestelle (Tabelle 2). Verarmung der Zelle an cFos und cJun durch Kotransfektion von "antisense"-*fos* oder *-jun* Sequenzen reduziert die basale und induzierte Aktivität des Collagenase-Enhancers (Tabelle 4).

**Tabelle 2** Der HIV-1-Enhancer wird durch Fos und Jun *trans*-aktiviert

	CAT-Plasmid	RSV <i>neo</i>	RSV <i>c-fos</i>	RSV <i>c-jun</i>
<b>HeLa</b>	-633/+80 HIV	3,9	12,5 (3,2)	13,5 (3,5)
	-633/+80 mutHIV	0,3	0,4 (1,4)	0,2 (0,6)
	-121/+232 HIV	9,8	28,4 (2,9)	106,0 (10,8)
	-76/+232 HIV	1,6	1,5 (0,9)	0,8 (0,5)
	-105/-79 HIV TATA	39,2	114,2 (2,9)	174,3 (4,4)
	TATA	1,0	1,2 (1,2)	0,8 (0,8)
	-73/+63 Coll	0,8	2,0 (2,6)	7,0 (9,1)
<b>NIH 3T3</b>	-105/-79 HIV TATA	12,1	61,9 (5,1)	21,5 (1,8)
	-73/-65 Coll TATA	0,33	2,4 (7,3)	0,6 (1,7)
	TATA	0,15	0,13 (0,9)	0,17 (1,1)
<b>T47D</b>	-105/-79 HIV TATA	21,6	296,8 (13,8)	220,1 (10,2)
	-73/-65 Coll TATA	2,0	26,8 (13,8)	6,2 (3,2)
	TATA	0,7	0,7 (1,1)	0,7 (1,1)

In HeLa, NIH 3T3 und T47D Zellen wurden je 5 µg der angegebenen CAT-Plasmide mit 10 µg der entsprechenden RSV-Expressionsvektoren transient transfiziert. 8 h nach Transfektion wurde Medium mit 0.5% FCS gegeben und 42 h später die CAT-Aktivität bestimmt. Die angegebenen Werte sind CAT-Aktivitäten in pmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> mit Induktionsfaktoren in Klammern. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

Interessanterweise wird auch der HIV-1-Enhancer sowohl durch cFos als auch durch cJun *trans*-aktiviert und der Effekt der *Trans*-Aktivierung ist vergleichbar mit dem an der Collagenase AP-1-Bindestelle (Tabelle 2). Die *Trans*-Aktivierung ist nicht nur auf HeLa Zellen beschränkt, sondern wurde auch in NIH 3T3 Mausfibroblasten und in T47D Karzinoma-Zellen gefunden. Vergleichbare Resultate wurden erhalten, wenn vFos oder vJun in der Zelle überexprimiert wurde (Tabelle 3, und Daten nicht gezeigt). Die

Unterschiede zwischen den viralen und zellulären Proteinen (Angel et al., 1989; Bos et al., 1989; Curran et al., 1984; Vogt und Bos, 1990) haben daher keinen Einfluß auf die *Trans*-Aktivierung des HIV-1- und Collagenase-Enhancers. cJun- oder vJun-Mutanten, denen die *Trans*-Aktivierungsdomäne fehlt, die aber noch die DNA-Bindedomäne mit Leucin-Zipper-Struktur haben, aktivieren den HIV-1-Enhancer nicht. Es wird im Gegenteil sogar eine knapp zweifache Hemmung beobachtet (RSV v-*jun* $\Delta$ 1-119 in Tabelle 3, und Daten nicht gezeigt). Diese Mutanten können aber noch als Heterodimere mit einem intakten cJun oder vJun den Collagenase-Enhancer *trans*-aktivieren (Angel et al., 1989). Dies bedeutet, daß für die NF- $\kappa$ B-vermittelte Aktivität des HIV-1-Enhancers die *Trans*-Aktivierungsdomäne von Jun unbedingt nötig ist. cJun- oder vJun-Mutanten, die zwar die *Trans*-Aktivierungsdomäne noch besitzen, aber keine DNA-Bindedomäne mehr haben, können den HIV-1-Enhancer (wie auch den Collagenase-Enhancer; Angel et al., 1989) nicht mehr *trans*-aktivieren (RSV v-*jun* $\Delta$ 121-287 in Tabelle 3, und Daten nicht gezeigt). Der Effekt ist spezifisch für die NF- $\kappa$ B-Bindestelle, da nur Promoterkonstrukte mit einer funktionellen NF- $\kappa$ B-Bindesequenz *trans*-aktiviert werden können.

**Tabelle 3** Der HIV-1-Enhancer wird nur durch vJun-Wildtyp *trans*-aktiviert

CAT-Plasmid	RSVpUC	RSV v- <i>jun</i> Wildtyp	RSV v- <i>jun</i> $\Delta$ 1-119	RSV v- <i>jun</i> $\Delta$ 121-287
-105/-79 HIV TATA	41,5	108,5 (2,6)	22,6 (0,5)	31,8 (0,8)
TATA	0,2	0,2 (1,0)	0,2 (1,0)	0,1 (0,5)
-73/+63 Coll	0,6	4,5 (7,0)	0,6 (1,0)	0,8 (1,4)

In HeLa Zellen wurden je 5  $\mu$ g der angegebenen CAT-Plasmide mit 10  $\mu$ g der entsprechenden RSV-Expressionsvektoren transient transfiziert. 8 h nach Transfektion wurde Medium mit 0.5% FCS gegeben und 42 h später die CAT-Aktivität bestimmt. Die angegebenen Werte sind CAT-Aktivitäten in  $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  mit Induktionsfaktoren in Klammern. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

Weiterhin reduzieren "antisense"-*fos* oder -*jun* Sequenzen sowohl die basale als auch die UV- und Phorbolster-induzierte Aktivität des HIV-1-Enhancers (Tabelle 4). Der Grad der Hemmung ist vergleichbar mit Hemmungen an der Collagenase AP-1-Bindestelle. Diese Experimente zeigen also, daß cFos und cJun für die Aktivierung des HIV-1-Enhancers nötig sind, und daß sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die *Trans*-Aktivierungsdomäne von cJun dafür gebraucht werden.

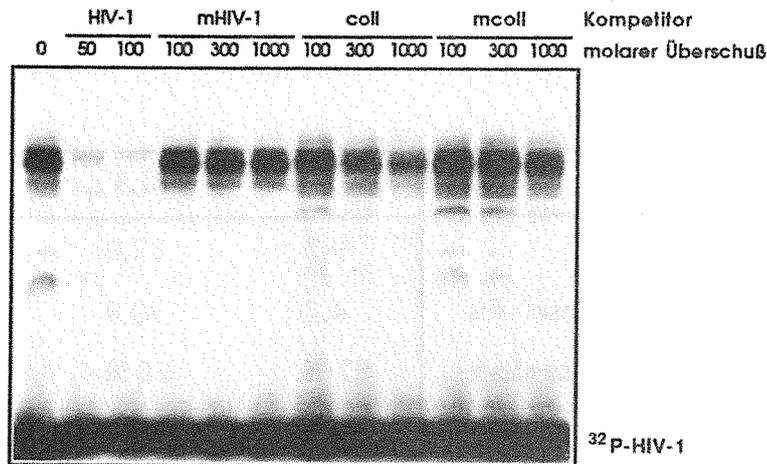
**Tabelle 4** Fos und Jun sind für die basale und induzierte HIV-1-Enhancer-vermittelte Transkription nötig

		K o n	U V	T P A
<b>-121/+232 HIV</b>	Vektor	9,2	82,0	60,0
	"antisense"- <i>fos</i>	4,3	30,9	25,3
	Repression	47 %	38 %	42 %
	Vektor	19,3	108,5	102,4
	"antisense"- <i>jun</i>	8,9	35,9	52,5
	Repression	46 %	33 %	51 %
<b>5×(-73/-65) Colltk</b>	Vektor	1,7	25,3	122,0
	"antisense"- <i>fos</i>	1,1	13,5	70,1
	Repression	65 %	53 %	57 %
	Vektor	4,0	6,5	62,7
	"antisense"- <i>jun</i>	2,2	4,0	20,3
	Repression	54 %	61 %	32 %

HeLa Zellen wurden mit je 5 µg -121/+232 HIV-1 CAT oder 5×(-73/-65) ColltkCAT und 10 µg von "antisense"-*fos* = SV*sof*<sup>+</sup>, dem Vektor dazu = KSV10<sup>+</sup>, "antisense"-*jun* = SV*anti-jun* und dem Vektor dazu = SV65 transient transfiziert. 8 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 20 J/m<sup>2</sup> UV (254 nm) oder 60 ng/ml TPA induziert oder blieben unbehandelt (Kon). Die gezeigten Werte sind CAT-Aktivitäten in pmol•mg<sup>-1</sup>•min<sup>-1</sup> und der Grad der Repression durch die "antisense"-Vektoren. Gezeigt sind die Werte eines repräsentativen Experiments. Alle Transfektionen wurden mehrfach wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

### Indirekte Konkurrenz für Faktorbindung am HIV-1-Enhancer

cFos und cJun können in der Signalkette zum HIV-1-Enhancer eine Rolle spielen, und zum Beispiel ein Protein aktivieren, das dann wiederum NF-κB aktiviert, oder cFos und cJun sind Komponenten des Transkriptionsfaktor-Komplexes am HIV-1-Enhancer. Es sollte daher untersucht werden, ob cFos und/oder cJun zusammen mit NF-κB direkt an den HIV-1-Enhancer binden können. Konkurrenzexperimente mit dem Collagenase-URE und dem HIV-1-URE (Abb. 12A) hatten gezeigt, daß die Transkriptionsfaktor-Komplexe nicht identisch sein können. Auffallend war jedoch die leichte Hemmung der Faktorbindung am HIV-1-URE mit hohen Überschüssen an Collagenase-URE. Wie in Abb. 23 zu sehen,

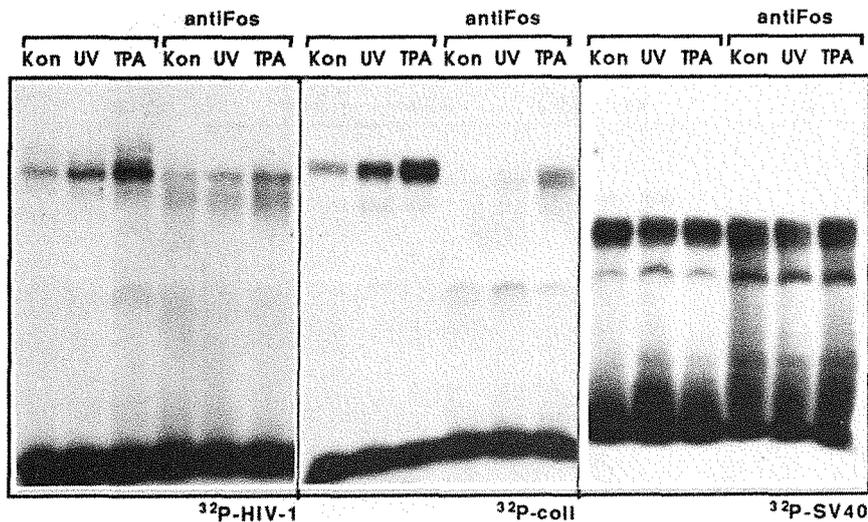


**Abb. 23** Indirekte Konkurrenz um Fos-Protein. Die Konkurrenzanalysen wurden mit Kernextrakten aus HeLa Zellen, die für 1 h mit 60 ng/ml TPA behandelt wurden, durchgeführt. Der molare Überschuss der nicht radioaktiv markierten Oligonukleotide ist im oberen Teil der Abbildung zu sehen. Nach Zugabe des radioaktiven HIV-1-Oligonukleotids wurden die Proteinkomplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt.

reduziert das Collagenase-URE mit 300 bis 1000 fachen Überschüssen deutlich die Bindung am HIV-1-URE. Dieser Effekt ist spezifisch für die AP-1-Bindestelle, da zwei andere Oligonukleotide, nicht-funktionelle Punktmutationen des HIV-1- und Collagenase-URE, nicht kompetieren können. Daraus kann man schließen, daß die Proteinkomplexe an den beiden UREs zwar verschieden sind, aber offenbar als gemeinsame Komponenten cFos und/oder cJun haben.

### **Fos-Antikörper hemmen die Komplexbildung am HIV-1-Enhancer**

Weitere Beweise für eine direkte Interaktion von NF- $\kappa$ B mit cFos wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen Fos gefunden. Sowohl die Bindung von Extrakten aus unbehandelten, als auch UV- oder Phorbol-ester-behandelten Zellen an das HIV-1-URE wird durch cFos-Antikörper blockiert (Abb. 24). Die gleichen cFos-Antikörper hemmen auch effektiv die Bindung am Collagenase-URE. Die Bindung von Proteinen an eine nicht-verwandte Sequenz (SV40) wird durch die Antikörper nicht beeinflusst. Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Extrakte vor Inkubation mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid durch Immunpräzipitation mit cFos-Antikörpern an cFos und cFos/cJun-Heterodimeren verarmt wurden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß cFos (und cJun) zusammen mit NF- $\kappa$ B an die DNA binden. Mit Antikörpern gegen cJun ist dieses Experiment nicht durchführbar, da Jun-Antikörper die Zelle im wesentlichen nur an cJun verarmen (Abb. 16), und daher noch genügend cFos zur Verfügung steht, das mit NF- $\kappa$ B interagieren kann.



**Abb. 24** Fos ist für die Komplexbildung am HIV-1 Enhancer nötig. Kernextrakte aus unbehandelten (Kon) oder für 4 h mit  $30 \text{ J/m}^2$  UV (254 nm) oder für 1 h mit 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen wurden für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Wo angegeben, wurde während dieser Zeit Fos-Antikörper 411 zugesetzt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde bei RT noch 30 min inkubiert, bevor die Komplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt wurden.

### Verstärkte Bindung von NF- $\kappa$ B mit Jun und Fos an den HIV-1-Enhancer

Es könnte nun sein, daß cJun und/oder cFos die Bindung von NF- $\kappa$ B an das HIV-1-URE erhöhen, ähnlich wie cJun/cFos-Heterodimere eine höhere Affinität zum Collagenase-URE haben als Jun-Homodimere. Es wurde daher NF- $\kappa$ B, das aus Cytoplasma menschlicher Placenta über DNA-Affinitäts-Chromatographie mit der HIV-1-URE-Sequenz gereinigt wurde (P. Baeuerle, unveröffentlicht), mit bakteriell exprimierten vJun und vFos inkubiert und die Bindung an das HIV-1-URE analysiert. Gereinigtes NF- $\kappa$ B bindet alleine an das HIV-1-URE. Von den zwei spezifischen DNA-Proteinkomplexen (Abb. 25; Spur 2, Bande a, b) wandert der obere auf der gleichen Höhe wie Kernextrakte von HeLa Zellen (Abb. 25, Spur 1). Eine Kombination aus NF- $\kappa$ B mit vJun aus Fraktion #22 oder vFos bindet wesentlich besser an das HIV-1-URE als NF- $\kappa$ B alleine und zeigt nur noch die obere Bande a. vJun #22 und vJun #23 sind zwei aufeinanderfolgende 0.5 M NaCl-Fractionen von bakteriell exprimierten vJun (gesamtes vJun), das über Heparin-Agarose gereinigt wurde und gegen den Puffer der Bindereaktion dialysiert wurde (P. Angel, unveröffentlicht). Beide Fraktionen haben etwa die gleiche Konzentration an bakteriellen Proteinen. Nur in Fraktion #22 wurde Bindung an den Collagenase-Enhancer festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Bande c, die nur in Kombination mit vJun #22 auftrat, ist vermutlich ein Degradationsprodukt von vJun. Eine ähnliche Bande wurde auch beobachtet, wenn vJun #22 mit dem Collagenase-URE inkubiert wurde (Daten nicht gezeigt). vFos ist ein Fusionsprotein aus einem Teil von *lacZ* und FBJv-*fos*, das durch Ionen-Austausch-Chromatographie gereinigt wurde und ebenfalls gegen den Puffer der Bindereaktion dialysiert wurde (Risse et al.,

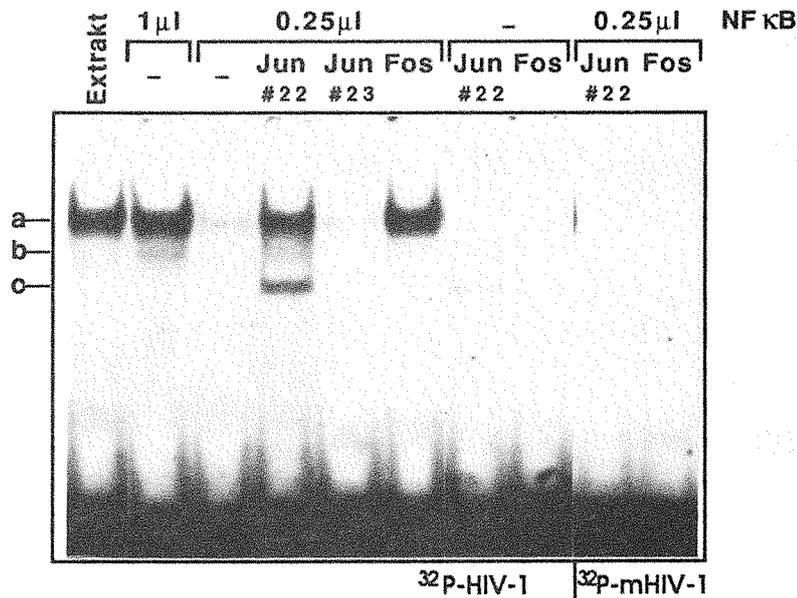


Abb. 25 Verstärkte Bindung von NF- $\kappa$ B mit Jun und Fos an den HIV-1-Enhancer. Die Bindereaktion wurde bei RT 30 min in 20  $\mu$ l 12 mM HEPES $\cdot$ NaOH pH 7.9, 4 mM Tris pH 7.9, 60 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM EDTA, 12% Glyzerin, 5 mM DTT, 3 mM GTP, 5  $\mu$ g BSA durchgeführt. Extrakt = 5  $\mu$ g Kernextrakt aus für 60 min mit 60 ng/ml TPA behandelten HeLa Zellen + 0.5  $\mu$ g poly(dIdC). NF- $\kappa$ B = 1  $\mu$ l bzw. 0.25  $\mu$ l DNA-affinitätsgereinigtes NF- $\kappa$ B aus Cytoplasma menschlicher Placenta (P. Baeuerle, unveröffentlicht) + 0.1  $\mu$ g poly(dIdC). Jun#22, Jun#23 = Ein Plasmid, das für das gesamte vJun kodiert, wurde in den Bakterienstamm BL21, der eine integrierte Kopie des IPTG-induzierbaren T7 RNA-Polymerase Gens enthält transformiert (modifiziert nach Studier und Moffat, 1986). Die Bakterien-Übernachtskultur wurde mit IPTG stimuliert, Extrakte präpariert, diese mit 20-40% Ammoniumsulfat gefällt, über Heparin-Agarose aufgetrennt und mit steigendem NaCl-Gradienten eluiert. Fraktion #22 und #23 sind zwei aufeinanderfolgende Fraktionen der 0.5 M NaCl-Elution Die eluierten Proteinen wurden anschließend noch gegen den Puffer der Bindereaktion ohne GTP und BSA dialysiert (P. Angel, unveröffentlicht). Fos = siehe Legende zur Abb. 15. NF- $\kappa$ B wurde mit Jun oder Fos 10 min bei 4°C inkubiert, bevor die im unteren Teil der Abbildung angegebenen radioaktiven Oligonukleotide zugegeben wurden.

1989). Die Verstärkung der Bindung von NF- $\kappa$ B an das HIV-1-URE durch vJun und vFos ist spezifisch, da beide Proteine gegen den Puffer der Bindereaktion dialysiert wurden und somit Effekte des Puffers auf die Bindung von NF- $\kappa$ B ausgeschlossen werden können. Nur die Fraktion der Heparin-Agarose Reinigung von bakteriell exprimierten vJun, die das vJun-Protein enthält (vJun #22), erhöht die Bindung von NF- $\kappa$ B. Ein Bakterien-Gesamtextrakt hat keinen Einfluß auf die Bindung (Daten nicht gezeigt). Die Komplexbildung wurde in Anwesenheit von 5  $\mu$ g BSA gemacht, so daß auszuschließen ist, daß die bakteriellen Proteine NF- $\kappa$ B vor Degradation schützen. Sowohl vJun als auch vFos binden in den hier benutzten Mengen alleine nicht an das HIV-1-URE (Abb. 25). An das mutierte, nicht-funktionelle HIV-1-URE bindet NF- $\kappa$ B und vJun bzw. vFos nicht (Abb. 25).

Somit sind also sowohl vFos als auch vJun (und wegen der identischen DNA-Bindedomäne auch cJun und cFos) in der Lage, die Bindung von NF- $\kappa$ B an den HIV-1-Enhancer zu erhöhen und sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit Komponenten des Transkriptionsfaktor-Komplexes am HIV-1-URE in der Zelle.

## **9. Zwischenstufen der UV-induzierten Signalkette zu den Genen**

### **Die UV-induzierte Signalkette verläuft über das Cytoplasma**

Wie in den bisherigen Experimenten gezeigt, ist der Signaltransfer in der UV-induzierten Genexpression schnell und nicht von Proteinsynthese abhängig. Da sowohl der DNA-Schaden als auch die durch UV-aktivierbaren Gene im Zellkern lokalisiert sind, könnte man sich eine direkte Informationsübermittlung innerhalb des Zellkerns vorstellen. NF- $\kappa$ B ist jedoch in unbehandelten Zellen im Cytoplasma mit einem Inhibitor, I $\kappa$ B, assoziiert und wird erst durch Phorbolster-Behandlung von diesem Inhibitor freigesetzt und in den Kern transportiert (Baeuerle und Baltimore, 1988a; Baeuerle und Baltimore, 1988b). Es wäre deshalb möglich, daß für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch UV der gleiche Mechanismus gilt, das heißt die UV-induzierte Signalkette würde dann über das Cytoplasma verlaufen. Um dies zu überprüfen, wurde die Bindeaktivität von Cytoplasma- und Kernextrakten in unbehandelten, UV- und Phorbolster-behandelten Zellen untersucht. Zum quantitativen Vergleich der Bindeaktivitäten wurden Cytoplasma- und Kernextrakt der gleichen Zellzahl eingesetzt. Bindung von NF- $\kappa$ B ist im Zellkern und Cytoplasma zu finden. In unbehandelten Zellen ist die größte Bindeaktivität im Cytoplasma. Nach UV-Behandlung der Zellen nimmt wie nach Phorbolster-Behandlung die Bindeaktivität im Cytoplasma ab und steigt dafür im Zellkern an (Abb. 22). Wahrscheinlich inaktiviert UV wie Phorbolster den cytoplasmatischen Inhibitor und setzt damit aktives NF- $\kappa$ B frei. Damit ist zumindest für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B gezeigt, daß die Signalkette in der UV-Induktion vom DNA-Schaden im Zellkern über das Cytoplasma zurück zu den aktivierten Transkriptionsfaktoren im Zellkern verläuft.

### **EPIF als Zwischenstufe in der UV-induzierten Signalkette**

Die Induktion von Genen durch UV kann in einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen werden. In einem Organismus werden aber nur die Zellen der obersten Hautschichten einer direkten Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Es stellte sich daher die Frage, welches Risiko für einen Organismus besteht, daß Gene, wie zum Beispiel HIV-1, durch Sonnenbestrahlung

aktiviert werden. Latentes HIV-1 wird hauptsächlich in Zellen mit dem CD4-Oberflächenmarker gefunden, einschließlich T-Helfer-Zellen (Dalglish et al., 1984; McClure und Weiss, 1987; Tschachler et al., 1987), Makrophagen und ihre vielzellige Abkömmlinge wie die Langerhans-Zellen der Epidermis (McClure und Weiss, 1987; Tschachler et al., 1987) und Mikroglia, also Zellen, die zum größten Teil keiner direkten Sonnenbestrahlung ausgesetzt sind. Es konnte ein Mechanismus aufgeklärt werden, der zeigt, wie diese Zellen indirekt durch UV erreicht werden können.

UV-Bestrahlung von Säugetier-Zellen in Kultur führt zur Freisetzung eines extrazellulären Faktors, welcher in nicht-bestrahlten Zellen die HIV-1-Transkription erhöht. Auch die durch UV-aktivierbare Collagenase wird durch diesen Faktor aktiviert. Dieser Faktor wurde ursprünglich im Medium von UV-bestrahlten Zellen entdeckt, das die Transkription verschiedener UV-induzierbarer Gene in unbestrahlten Zellen beeinflusste (Rotem et al., 1987; Schorpp et al., 1984). Der Faktor wurde von unserem Labor EPIF (Extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor) genannt.

Eine Möglichkeit die Wirkung dieses Faktors zu zeigen, ist UV-bestrahlte nicht-transfizierte Zellen mit nicht-bestrahlten HIV-1-transfizierten Zellen zusammen zu kultivieren. Nur bei Kokultivierung mit bestrahlten Zellen erhöht sich die HIV-1-vermittelte CAT-Aktivität in einer dosis-abhängigen Weise (Stein et al., 1989a). Dies zeigt, daß UV-bestrahlte Zellen einen Faktor auf unbestrahlte Zellen "übertragen" können.

EPIF-Aktivität kann auch in zellfreiem Kulturmedium von UV-bestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Kulturmedium von HeLa Zellen, 48 Stunden nach UV-Bestrahlung, erhöht die Aktivität eines Pentamers des Collagenase-UREs vor dem tk-Promoter (Abb. 26, UV KM). Die Aktivierung ist spezifisch, da Medium von unbestrahlten Zellen die CAT-Aktivität nicht verändert (Abb. 26, Kon KM), ebenso wird der Vektor ohne die UREs durch EPIF nicht beeinflusst. Somit wirkt EPIF über das gleiche *cis*-wirkende DNA-Element der Collagenase wie UV.

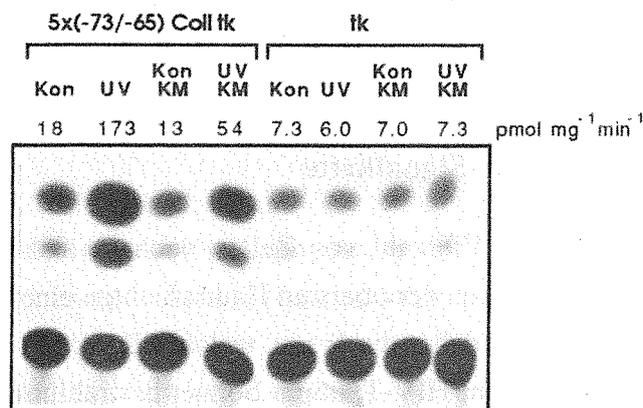
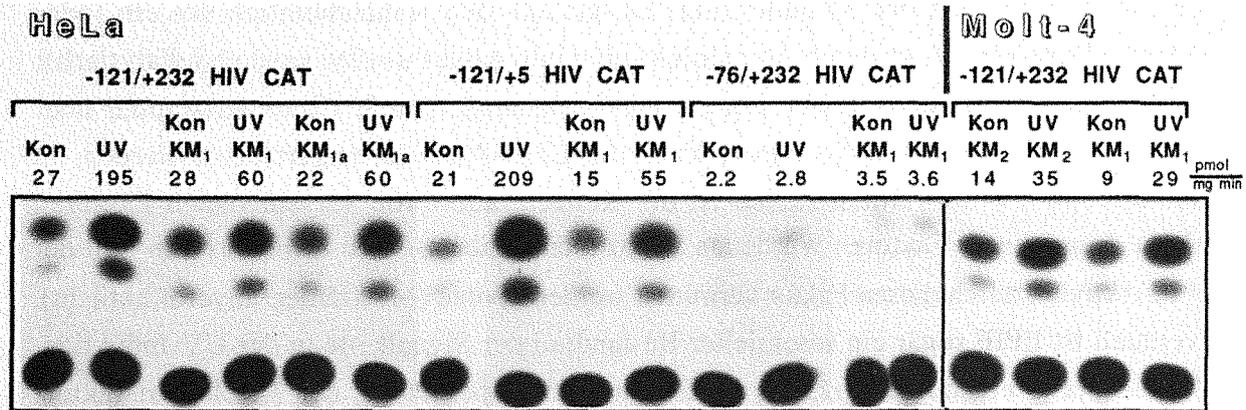


Abb. 26 Das Collagenase-URE wird durch UV und durch Kulturmedium von UV-bestrahlten Zellen aktiviert. HeLa Zellen wurden mit je 10 µg der angegebenen tkCAT-Konstrukte transient transfiziert. 8 h nach Transfektion blieben die Zellen unbehandelt (Kon) oder wurden mit 20 J/m<sup>2</sup> UV (254 nm) bestrahlt oder mit Kulturmedium von nicht-bestrahlten HeLa Zellen (Kon KM) oder von HeLa Zellen 48 h nach Bestrahlung mit 30 J/m<sup>2</sup> (UV KM) inkubiert. 42 h später wurde die CAT-Aktivität bestimmt und in pmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> angegeben.



**Abb. 27** Kulturmedium von UV-bestrahlten Zellen vermittelt die UV-Antwort. HeLa oder Molt-4 Zellen wurden mit je 10 µg der angegebenen HIV-1 CAT-Konstrukte transient transfiziert. 8 h nach Transfektion blieben die Zellen unbehandelt (Kon) oder wurden mit 20 J/m<sup>2</sup> UV (254 nm) bestrahlt oder mit Kulturmedium von nicht-bestrahlten Zellen (Kon KM) oder von Zellen 48 h nach Bestrahlung mit 30 J/m<sup>2</sup> (UV KM) inkubiert. KM<sub>1</sub> und KM<sub>1a</sub> sind zwei unabhängige Präparationen von Kulturmedium aus HeLa Zellen, KM<sub>2</sub> aus Molt-4 Zellen. Bevor das Kulturmedium von HeLa Zellen auf die Molt-4 Zellen gegeben wurde, wurde es gegen RPMI mit 10% FCS und 2 mM Glutamin dialysiert. 42 h nach Induktion wurde die CAT-Aktivität bestimmt und in pmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> angegeben.

Auch die Induktion von HIV-1 durch EPIF verläuft über das URE. Kulturmedium von unbehandelten Zellen verändert die CAT-Aktivitäten von HIV-1-transfizierten Zellen nicht (Abb. 27, Kon KM; vergl. Spur 3 oder 5 mit Spur 1). Im Gegensatz dazu erhöht Medium, das 48 Stunden nach UV-Bestrahlung von Zellen geerntet wurde, die transkriptionelle Aktivität eines HIV-1 CAT-Konstrukts 3-4 fach (Abb. 27, UV KM; vergl. Spur 4, 6 mit Spur 3, 5). Dieser Effekt ist spezifisch. Er beruht nicht auf verstärktem Wachstum der Zellen, da Kon KM und UV KM behandelte Zellen gleich gut wachsen (Daten nicht gezeigt). Das UV KM wirkt konzentrationsabhängig (Daten nicht gezeigt). Der extrazelluläre Faktor im UV KM wirkt über das gleiche *cis*-wirkende Element im HIV-1-Enhancer wie auch direkte UV-Bestrahlung. Die *tar*-Region kann ohne Einfluß auf die EPIF-vermittelte Aktivierung entfernt werden (Konstrukt -121/+5 in Abb. 27), die beiden NF-κB-Bindestellen dagegen nicht (Konstrukt -76/+232 in Abb. 27).

Da HIV-1 zum größten Teil in CD4-positiven Zellen nachgewiesen wurde, wurde die transkriptionelle Aktivierung in diesen Zellen untersucht. Erhöhte HIV-1-Promoter-Aktivität nach UV-Bestrahlung wurde in den CD4-positiven Lymphocyten Molt-4 (Minowada et al., 1972) und Jurkat (Kaplan et al., 1974) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sowohl Medium von UV-bestrahlten Molt-4 als auch von HeLa Zellen HIV-1 in Molt-4 aktiviert (Abb. 27). HIV-1-Aktivität in CD4-positiven Lymphocyten wird also auch durch Kulturmedium von UV-bestrahlten nicht-lymphoiden Zellen erhöht. EPIF wirkt somit nicht zelltyp-spezifisch.

Die Identität des Faktors ist unbekannt. Es handelt sich wahrscheinlich um ein (oder mehrere) Protein(e), da es durch Ammoniumsulfat präzipitiert werden kann und dialysierbar ist, das heißt mindestens 15000 Dalton groß sein muß. Durch Chromatographie über Heparin-Sepharose und Q-Sepharose kann die EPIF-Aktivität angereichert werden. In Medium aus UV-bestrahlten Zellen ist die Konzentration von verschiedenen Faktoren erhöht. Einer dieser Faktoren wurde als IL-1 $\alpha$  identifiziert, so daß zumindest ein Teil der EPIF-Aktivität durch diesen Faktor vermittelt werden könnte (M. Krämer, unveröffentlicht). Eventuell ist EPIF sogar ein essentieller Bestandteil der Signalkette in der UV-Induktion. Verlust der UV-Induzierbarkeit von Genen nach Blockierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit der Substanz Suramin lassen diesen Schluß zu (M. Krämer, unveröffentlicht).

## DISKUSSION

UV ist ein extrazellulärer Einfluß auf die äußeren Zellen der meisten Organismen, weshalb eine Untersuchung der UV-Wirkung auf die Genexpression aus biologischer Sicht sehr interessant ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der UV-induzierten Genexpression charakterisiert. Als Beispiele wurden ein Protoonkogen (*c-jun*), ein Gen, das für ein extrazelluläre Matrix-abbauendes Enzym kodiert (Collagenase), und ein virales Gen (HIV-1) gewählt. UV aktiviert eine Signalkette, deren Anfangspunkt die UV-induzierten DNA-Schäden sind, und die über mehrere Zwischenstufen mit der verstärkten Bindung von Transkriptionsfaktoren an den UREs der durch UV-aktivierbaren Genen endet. Der Endpunkt einer Signalkette ist immer als relativ anzusehen, da die Genprodukte von UV-induzierten Genen wiederum andere Gene aktivieren können, was im Prinzip eine Fortsetzung der Signalkette bedeutet.

### DNA als "Rezeptor" von UV

Das primäre Ereignis für die Auslösung der UV-induzierten Expression von Genen ist die Absorption von UV durch die DNA. Dies konnte durch drei unterschiedliche experimentelle Ansätze gezeigt werden. (I) Das Aktionsspektrum der Genaktivierung durch UV ist identisch mit dem Spektrum der Zellabtötung und der Thymidin-Dimer-Bildung in der Zelle (Abb. 1). Beides sind Prozesse, die Absorption von UV durch die DNA voraussetzen. Somit ist es unwahrscheinlich, daß UV-Absorption in Membranen (Proteine, Lipide mit konjugierten Doppelbindungen) für die Aktivierung von Genen eine Rolle spielt, da die Absorptionsspektren dieser Membranbestandteile zu anderen Wellenlängen verschobene Optima haben. (II) In XPA-Zellen ist im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Fibroblasten eine 10 fach niedrigere UV-Dosis zur maximalen Aktivierung der Gene ausreichend (Abb. 2). Da der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Zelltypen die fehlende "Excisions"-Reparatur in den XPA-Zellen ist, spielt vermutlich der DNA-Schaden eine Rolle für die UV-Induktion. Es war deshalb nicht überraschend, daß andere DNA-schädigende Agenzien die gleichen Gene aktivieren wie UV. (III) Weiterhin konnte die direkte Bestrahlung der Zelle mit UV durch das Einbringen von UV-bestrahlter oder karzinogen-geschädigter DNA der unterschiedlichsten Sequenzen ersetzt werden (Mai et al., 1989). Dies spricht dafür, daß der durch UV ausgelöste DNA-Schaden sich nicht in dem Gen, das durch UV aktiviert werden soll, ereignen muß. Dies war auch unwahrscheinlich, da in XPA-Zellen UV-Dosen von nur  $2 \text{ J/m}^2$  eine maximale Genaktivierung auslösen. Eine Dosis von  $2 \text{ J/m}^2$  verursacht etwa 1 Thymidin-Dimer in 20000 Basenpaaren der DNA (Wulff, 1963). Bei dieser Häufigkeit würde sich in den kurzen UREs der Gene nur sehr selten ein DNA-Schaden ereignen, was

nicht ausreichen dürfte, um die Transkription in einer Massenkultur von rund  $10^6$  Zellen nachweisbar zu verändern.

Für die Auslösung der UV-Antwort ist weder die DNA-"Excisions"-Reparatur noch die "Postreplikations"-Reparatur notwendig. XPA-Zellen fehlt nämlich die "Excisions"-Reparatur und eine Aktivierung von Genen durch UV wird auch ohne DNA-Replikation in sich nicht-teilenden Zellen gefunden (Kaina et al., 1989b; Stein et al., 1989b). Für die Auslösung der UV-Antwort ist daher vermutlich nur die geänderte sekundäre Struktur der DNA ausschlaggebend. Diese veränderte Struktur muß als Signal dienen und von Proteinen, die Teile der Signalkette sind, erkannt werden. Die Struktur der geschädigten DNA kann sehr vielfältig sein, da neben UV auch andere DNA-schädigende Agenzien, wie z.B. MMC oder NQO, die UV-Antwort auslösen können. Es ist bis jetzt nicht bekannt, ob jeder Typ von DNA-Schaden durch unterschiedliche Proteine erkannt wird, oder ob ein einziges Protein durch ein breites Spektrum an DNA-Schäden aktiviert wird.

### **Die durch UV aktivierte Signalkette endet an verschiedenen UREs**

Am anderen Ende der Signalkette in der UV-Induktion stehen die UV-induzierbaren Gene. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene *c-jun*, Collagenase und HIV-1 werden durch UV transkriptionell reguliert (Abb. 3-10). Die verstärkte Transkription kann nicht auf einer Vermehrung der Kopien-Zahl der Gene beruhen, da signifikante Genamplifikation erst nach Tagen beobachtet wird (Lavi, 1981; Lücke-Huhle und Herrlich, 1986; Schimke, 1984) und die Transkription der hier untersuchten Gene schon 30 min nach UV-Bestrahlung erhöht ist (Abb. 3, 4). Auch die transient transfizierte Plasmid-DNA wird in der Zelle nicht amplifiziert (S. Mai, unveröffentlicht). Weiterhin trägt keines der verwendeten Plasmide einen "origin" der Replikation, noch gibt es irgendwelche Hinweise, daß die definierten UREs als "origin" der Replikation fungierten. UV-induzierte Amplifikation und Genaktivierung sind zwei völlig verschiedene Prozesse. Zum Beispiel ist eines der UREs des SV40-Enhancers eine NF- $\kappa$ B-Bindestelle (Daten nicht gezeigt). Der "origin" der Replikation dagegen ist ein völlig anderes *cis*-wirkendes DNA-Element (Lavi, 1981), an das ein Protein bindet, das an keines der definierten UREs binden kann (Mai et al., 1990; Lücke-Huhle et al., 1989). Die Sequenz dieses minimalen "origins" diente daher als Kontrolle für eine Reihe von Experimenten in dieser Arbeit (SV40-Oligonukleotid).

Durch UV wurde keine veränderte Stabilität der mRNA oder des CAT-Proteins festgestellt. Die Expression von chimären Genkonstrukten wird nur dann durch UV erhöht, wenn UREs vorhanden sind. Die entsprechenden Vektoren oder Konstrukte mit deletierten oder mutierten UREs lassen sich nicht durch UV aktivieren (Abb. 5-10). Die UV-Induktion ist spezifisch für die UREs, da mehrere andere Promotoren, die auch *cis*-wirkende DNA-Elemente für

Transkriptionsfaktoren haben, wie z.B. der MMTV- oder der tk-Promoter (Beispiele in Abb. 7, 8, 10), nicht durch UV aktiviert werden. Die unterschiedliche DNA-Struktur der transient transfizierten Plasmide (nackte, ringförmige DNA) und der endogenen Gene (Chromatinstruktur mit Histonen) scheint keinen Einfluß auf die UV-Induzierbarkeit zu haben. In beiden Fällen ist die UV-Dosis für optimale Genaktivierung identisch (Abb. 2, und Daten nicht gezeigt).

Die Kinetiken der UV- und Phorbol-ester-induzierten Anhäufungen von *c-jun*-RNA sind mit einem Optimum bei einer Stunde identisch (Abb. 3, 4). Auch der zeitliche Verlauf der Anhäufung von Transkripten von transient transfizierten HIV-1- und Collagenase-CAT-Konstrukten (-121/+232 HIV-1, 5x(-73/-65) ColltkCAT in Abb. 3, 4) ist nach UV- und Phorbol-ester-Behandlung der Zellen identisch. Eine Ausnahme macht die UV-induzierte Transkription der endogenen Collagenase. Während das Optimum der RNA-Menge nach Phorbol-ester-Behandlung bei 8 Stunden liegt, hält die UV-induzierte RNA-Anhäufung bis über 24 Stunden an (Abb. 3, 4). Der unterschiedliche Verlauf der Kinetiken beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von weiteren *cis*-wirkenden DNA-Elementen in der 5' flankierenden Region der Collagenase. Diese Elemente verstärken die UV- und Phorbol-ester-vermittelte Induktion der Collagenase-Expression und zeigen ihre Wirkung nur in Anwesenheit von Proteinsynthese (Jonat et al., 1989; und unveröffentlicht). Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung der hier untersuchten Gene über die UREs nicht von Proteinsynthese abhängig (Abb. 3, und Daten nicht gezeigt).

Die UREs sind auch Endpunkte der Signalkette in der Aktivierung durch Phorbol-ester, Wachstumsfaktoren und Onkogen-Produkte (siehe Literaturzitate im Ergebnis-Teil). Das bedeutet, daß verschiedene Signalketten auf das gleiche *cis*-wirkende Element konvergieren und ihre Effekte durch den gleichen Transkriptionsfaktor ausüben. Andererseits wird die UV-induzierte Expression in verschiedenen Genen durch verschiedene Transkriptionsfaktoren und UREs vermittelt (Abb. 11). Das Collagenase Gen hat nur ein einziges URE, der HIV-1-Enhancer enthält direkt nebeneinander zwei fast identische Kopien eines UREs und das *c-jun*-Gen hat zwei UREs ähnlicher Sequenz in seiner 5' flankierenden Region.

Das Zusammenwirken der beiden UREs aus dem HIV-1-Enhancer bei der Induktion von HIV-1 durch UV ist noch nicht völlig geklärt. Während beide für die basale Aktivität verantwortlich sind (je etwa 6 fache Reduktion der basalen Aktivität bei sukzessiver Deletion der beiden UREs; vergl. -121/+232, -91/+232, -76/+232 in Abb. 6) wird der Faktor der Induktion durch UV bei Deletion des distalen UREs nur unwesentlich erniedrigt (vergl. -121/+232, -91/+232 in Abb. 6). Analysen der Proteinbindung an diese zwei UREs lieferten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Während Kawakami et al. (1988) selektive Bindung von NF- $\kappa$ B an das distale URE beschreiben, haben andere (Garcia et al., 1987) mit HeLa Extrakten nur Bindung am proximalen URE beobachtet, und in Extrakten aus Phorbol-ester-

behandelten Zellen oder lymphoiden Zellen sind beide UREs besetzt (Wu et al., 1988b). Diese Untersuchungen wurden mit isolierten Bindestellen gemacht, wobei mögliche Stabilisierung von Komplexen an den UREs durch Bindung von Sp1 an die benachbarten Bindestellen außer acht gelassen wurde.

Die zwei UREs aus dem *c-jun*-Enhancer tragen beide je zur Hälfte zur UV-Induzierbarkeit des gesamten *c-jun*-Promoter bei (Abb. 10). Punktmutationen im distalen 2. URE haben, im Gegensatz zu Punktmutationen im proximalen 1. URE, zudem eine drastische Reduktion der basalen Aktivität zur Folge. Wenn beide UREs mutiert sind, wird trotzdem noch eine knapp zweifache Aktivierung des *c-jun*-Promoters durch UV und Phorbolster beobachtet (-1600/+170 mut1.+2.URE in Abb. 10). Wahrscheinlich können auch andere DNA-Elemente, wie zum Beispiel Sp1- oder CTF-Bindestellen, in geringem Maße Induzierbarkeit durch UV und Phorbolster vermitteln, zumindest wenn die zwei UREs ausgeschaltet sind und/oder die basale Aktivität des *c-jun*-Promoter so niedrig ist, daß diese schwachen Effekte sichtbar werden.

### **Erhöhte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die UREs nach UV-Bestrahlung der Zelle**

UV und Phorbolster erhöhen die DNA-Bindeaktivität von Transkriptionsfaktoren an den UREs. Dies wurde durch "Bandshift"-Analysen mit Kernextrakten aus HeLa Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach UV- oder Phorbolster-Behandlung präpariert wurden, gezeigt (Abb. 14, 19, 20, 22, 24). Ein Vergleich der Kinetik der UV- und Phorbolster-induzierten Bindungserhöhung an dem HIV-1- und Collagenase-URE ist in Abb. 14 zu sehen. Auffällig ist der unterschiedliche zeitliche Verlauf am HIV-1-URE nach Behandlung der Zellen mit UV oder Phorbolster. Während die Bindung in Extrakten aus für zwei Stunden mit Phorbolster behandelten Zellen schon wieder zurückgeht, wird in UV-behandelten Zellen erst nach 8 Stunden die Bindung wieder reduziert. Dies liegt an dem besonderen Aktivierungsmechanismus von NF- $\kappa$ B: Die durch Phorbolster und UV vermittelte Freisetzung von aktiven NF- $\kappa$ B von einem cytoplasmatischen Inhibitor beruht auf einer Inaktivierung dieses Inhibitors (Bauerle und Baltimore, 1988b). Sobald der Inhibitor wieder aktiv ist, wird vom Zellkern ins Cytoplasma zurück diffundiertes NF- $\kappa$ B wieder inaktiviert. Die durch UV induzierte Signalkette hält vermutlich den Inhibitor für längere Zeit in einem inaktiven Zustand als die Signalkette in der Phorbolster-Induktion. Blockierung der Proteinsynthese hat zur Folge, daß der Inhibitor aufgrund seiner kurzen Halb-Lebenszeit abgebaut wird, und dadurch die Menge an freiem NF- $\kappa$ B im Zellkern ansteigt, was zu verstärkter Bindung an das HIV-1-URE führt.

Die erhöhte Bindung eines Transkriptionsfaktors kann noch andere Ursachen haben. Es kann die Neusynthese des Faktors ausgelöst werden, schon vorhandene Proteine können modifiziert werden (z.B. durch Anhängen von Phosphatgruppen) und dadurch besser an DNA binden, oder im induzierten Zustand binden andere oder zusätzliche Proteine an die DNA-Elemente. Das Laufverhalten der Proteinkomplexe mit den UREs der drei hier untersuchten Gene in nativen Gelen, ihr Kompetitionsverhalten gegenüber den jeweiligen anderen URE-Sequenzen, sowie die Hemmung der Bindung durch Antikörper sind in unbehandelten, UV- und Phorbolster-behandelten Zellen nicht drastisch verschieden. Daraus kann man schließen, daß sowohl im induzierten als auch im nicht-induzierten Zustand die gleichen Proteine an die jeweiligen UREs binden.

Die verstärkte Bindung des Proteinkomplexes am Collagenase-URE beruht sowohl auf post-translationeller Modifizierung als auch Neusynthese von cJun/cFos (Abb.19A). In Extrakten aus für 4 Stunden mit Phorbolster behandelten Zellen können 75% des Anstiegs der Bindung durch Hemmstoffe der Proteinsynthese blockiert werden (Abb. 19A). Die Bindungserhöhung an den UREs von *c-jun* und am Fibronectin-CRE erfolgt durch post-translationelle Modifizierung (Abb.19A). Damit kann ausgeschlossen werden, daß die erhöhte Bindung an die *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer-Elemente nach UV- oder Phorbolster-Behandlung ausschließlich auf cJun/cFos-Neusynthese beruht. Verstärkte cJun/cFos-Bindung würde auch bedeuten, daß dieser Anstieg durch Competition mit dem Collagenase-URE blockierbar sein müßte, was nicht der Fall ist (Daten nicht gezeigt). Dies sind weitere Beweise dafür, daß sowohl in unbehandelten, als auch UV- und Phorbolster-behandelten Zellen verschiedene Faktoren an die UREs von Collagenase und *c-jun* binden.

### **Die UREs von *c-jun* binden einen von cJun/cFos verschiedenen Faktor der AP-1 Familie**

Kompetition um Bindung mit den verschiedenen UREs zeigte, daß die Faktorkomplexe am HIV-1-, Collagenase-URE und den *c-jun*-UREs verschieden sind (Abb. 12). Obwohl die DNA-Sequenzen der beiden *c-jun*-UREs ähnlich der Sequenz des Collagenase-URE sind, binden erstere einen Faktor aus der AP-1 Familie, der nicht mit cJun/cFos identisch ist. Dies zeigen Kompetitions-Experimente und Verarmung von Extrakten über DNA-Affinitäts-säulen. Beide experimentelle Ansätze beruhen auf der Affinität eines Proteins zu seiner Bindesequenz. Das Collagenase-URE kann nicht um Bindung am 1. und 2. *c-jun*-URE kompetieren (Abb. 12C, D). Das heißt, das Collagenase-URE, eine hoch-affine cJun/cFos-Bindestelle, hat keine Affinität zu den Faktoren an den *c-jun*-UREs, was bedeutet, daß die Proteinkomplexe am Collagenase-URE und an den *c-jun*-UREs verschieden sein müssen. In umgekehrter Weise haben die *c-jun*-UREs eine gewisse Affinität zu dem cJun/cFos-

wahrscheinlich, daß in HeLa Zellen an das Fibronectin-CRE ein CREB-verwandtes Protein bindet, das mit Fos Heterodimere bildet .

### **NF- $\kappa$ B interagiert mit cJun und cFos**

Der HIV-1-Enhancer ist eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Kawakami, et al., 1988; Lenardo und Baltimore, 1989; Nabel und Baltimore, 1987). NF- $\kappa$ B ist, wie hier gezeigt werden konnte, Bestandteil der *in-vitro* gebildeten Proteinkomplexe mit HeLa Kernextrakten am HIV-1-URE. NF- $\kappa$ B wurde von mehreren Forschungsgruppen aus verschiedenen Zellen isoliert und gereinigt (Baeuerle und Baltimore, 1989; Kawakami, et al., 1988; Lenardo et al., 1988). Es ist ein Protein von 42 bzw. 50-52 kD Größe. NF- $\kappa$ B ist im Cytoplasma von unbehandelten Zellen mit einem Inhibitorprotein, I $\kappa$ B, assoziiert und wird erst nach Stimulation der Zelle, z.B. durch UV, davon freigesetzt und in den Kern transportiert (Baeuerle und Baltimore, 1988a; Baeuerle und Baltimore, 1988b; Stein et al., 1989b). NF- $\kappa$ B gehört zu den weniger häufigen Transkriptionsfaktoren und liegt in der Zelle nur in einigen tausend Molekülen vor (P. Baeuerle, persönliche Mitteilung). Bis jetzt ist es noch niemandem gelungen, Antikörper gegen NF- $\kappa$ B herzustellen. Dies erschwert viele Versuche, den Transkriptionsfaktor-Komplex an der NF- $\kappa$ B-Bindestelle näher zu charakterisieren. Eine Reinigung über DNA-Affinitätschromatographie und Analyse des Transkriptionsfaktor-Komplexes am HIV-1-URE aus Cytoplasma von HeLa Zellen zeigte, daß ein Homodimer von 50 kD mit zwei anderen Proteinen von 65 kD an das HIV-1-URE bindet (Baeuerle und Baltimore, 1989). Die Identität des 65 kD Proteins ist unbekannt, von seiner Funktion weiß man nur, daß es für die Interaktion von NF- $\kappa$ B mit dem Inhibitorprotein I $\kappa$ B nötig ist (Baeuerle und Baltimore, 1989). Es ist bis jetzt nicht eindeutig gezeigt, ob die zwei Proteine von 50 kD ein NF- $\kappa$ B-Homodimer darstellen, oder ob sie ein Heterodimer zwischen NF- $\kappa$ B und einem anderen 50 kD Protein sind. DNA-affinitätsgereinigtes NF- $\kappa$ B zeigt auf silber-gefärbten Gelen neben zwei Banden bei 50 und 65 kD noch weitere Proteinbanden, die Verunreinigungen, Degradationsprodukte oder weitere Bestandteile des Transkriptionsfaktor-Komplexes sein können (Baeuerle und Baltimore, 1989). Das 65 kD Protein soll keinen direkten DNA-Kontakt haben (Baeuerle und Baltimore, 1989).

Durch meine Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß cJun und/oder cFos Bestandteile des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor-Komplexes sind und NF- $\kappa$ B wahrscheinlich über eine Leucin-Zipper-Struktur mit cJun und cFos interagiert. NF- $\kappa$ B wäre dann nach AP-1 ein zweites Beispiel einer Transkriptionsfaktor-Familie, die über eine Leucin-Zipper-Struktur verfügt. Da NF- $\kappa$ B bis jetzt weder sequenziert ist, noch das dazugehörige Gen isoliert werden konnte, steht diese Bestätigung noch aus.

Faktoren, die an die beiden *c-jun*-UREs binden, nicht ganz identisch, oder die zwei Bindestellen haben unterschiedliche Affinitäten zum gleichen Faktor. Auffällig ist auch, daß die Bindung an den *c-jun*-UREs durch die B1-Aktivator-Säule beeinflusst wurde. Die B1-Aktivator-Sequenz hat zwar eine gewisse Ähnlichkeit mit einer AP-1-Bindestelle im Bereich -49 ATGCGCCAG -41, die Basen an Position -46 und -44 sollen aber mit der Bindung von cJun/cFos interferieren (Risse et al., 1989). In Kompetitions-Experimenten konnte die B1-Aktivator-Sequenz als Monomer nicht um Bindung an den UREs kompetieren (Daten nicht gezeigt).

Das 1. *c-jun*-URE ähnelt sehr stark der AP-1-Bindestelle aus dem Metallothionein-IIA-Promoter (GTGACTCAG), während das 2. *c-jun*-URE mehr der AP-1-Bindestelle aus dem SV40-Promoter ähnelt (ATTAGTCAG). Bis jetzt gibt es noch keine Untersuchungen, die zeigen, daß an die Collagenase, SV40 und Metallothionein AP-1-Bindestellen wirklich exakt die gleichen Faktoren binden.

In F9 und Kelly Zellen, in denen kein cJun/cFos nachweisbar ist, sind die Faktoren, die an die *c-jun*-UREs und das Fibronectin-CRE binden, in großer Menge vorhanden (Abb. 18). Neben einer differentiellen Regulation von verwandten Transkriptionsfaktoren zeigt das auch, daß an das Collagenase-URE, obwohl kein cJun/cFos vorhanden ist, die anderen Transkriptionsfaktoren nicht binden können. Nur unter Bedingungen mit großem DNA-Überschuß (DNA-Affinitätssäulen) erreicht man mit dem Collagenase-URE Verarmung von Extrakten an den Faktoren, die an die *c-jun*-UREs binden.

Das Fibronectin-CRE wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, weil sich die zwei *c-jun*-UREs ähnlich wie das Fibronectin-CRE durch eine zusätzliche Base in der Mitte ihrer Sequenz von der Collagenase AP-1-Bindestelle unterscheiden. Deutsch et al. (1988) haben gezeigt, daß eine zusätzliche Base in ansonsten gleicher Sequenz-Umgebung darüber entscheidet, ob eine AP-1-Bindestelle Induktion durch Phorbolster und/oder cAMP vermittelt. Es genügen daher minimale Unterschiede in der DNA-Sequenz, um unterschiedliche Bindung von Faktoren zu verursachen. Alle bis jetzt bekannten CRE-Sequenzen, die Induktionen durch cAMP vermitteln, haben, wie auch das Fibronectin-CRE, ein CG-Basenpaar-Motiv in der Mitte ihrer Sequenz (Iguchi-Arigo und Schaffner, 1989; Lin und Green, 1989; Montminy et al., 1986). Den *c-jun*-UREs fehlt dieses Motiv (Abb. 11) und der *c-jun*-Promoter ist auch nicht durch cAMP aktivierbar (Angel et al., 1988b). Dies spricht dafür, daß die Faktoren, die an die *c-jun*-UREs binden, nicht mit dem Faktor am Fibronectin-CRE identisch sind. Die Kompetitions-Experimente mit dem Fibronectin-CRE haben keine klare Aussage über die Verwandtschaft dieser Faktoren erlaubt. Transfektionen von Promoter-Konstrukten, die diese Elemente vor einer TATA-Box enthalten, lieferten dagegen Hinweise für Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren. Die durch die Enhancer-Elemente vermittelte Expression aller Konstrukte läßt sich durch UV und

armen die Zelle, wie schon erwähnt, im wesentlichen nur an cJun, weshalb dies zu keiner Reduktion der Bindung am HIV-1 URE führen kann, da noch cFos vorhanden ist.

Eine Interaktion von DNA-affinitätsgereinigtem NF- $\kappa$ B mit cJun und/oder cFos könnte zu einer verstärkten Bindung an das HIV-1-URE führen, ähnlich wie die Bindung von DNA-affinitätsgereinigtem AP-1 an das Collagenase-URE durch cFos erhöht wird. Obwohl DNA-affinitätsgereinigtes AP-1 ein 1:1 Verhältnis an cJun und cFos aufweisen sollte, geht cFos aus nicht bekannten Gründen (Degradation?) während der Aufreinigung und beim wiederholten Einfrieren und Auftauen des Proteins verloren. Eine ähnliche Situation könnte bei DNA-affinitätsgereinigtem NF- $\kappa$ B vorliegen. Da das hier verwendete NF- $\kappa$ B aus Cytoplasma menschlicher Placenta gereinigt wurde, könnte man sich auch vorstellen, daß es überhaupt kein cJun und cFos enthält, denn cJun und cFos sind bisher nur im Zellkern nachgewiesen worden. NF- $\kappa$ B bindet alleine an das HIV-1-URE, die Bindung wird aber durch bakteriell exprimiertes  $\nu$ Jun und  $\nu$ Fos dramatisch gesteigert (Abb. 25). Der Transkriptionsfaktor-Komplex am HIV-1-URE ist im Gegensatz zum AP-1-Komplex vermutlich komplizierter aufgebaut ist, das heißt, stellt kein einfaches Heterodimer aus NF- $\kappa$ B mit cJun und/oder cFos dar. Dafür sprechen die Untersuchungen von Baeuerle und Baltimore (1989), die einen Komplex aus vier Untereinheiten postulieren: zwei 50 kD und zwei 65 kD Proteine, und daß das Laufverhalten von DNA-Proteinkomplexen mit gereinigtem NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B mit Jun oder Fos und mit HeLa Kernextrakten in nativen Gelen identisch ist. Dies bedeutet, daß der Proteinkomplex so groß sein muß, daß 42-55 kD mehr oder weniger (die Größe von Jun oder Fos) sich im Laufverhalten nicht bemerkbar machen, oder daß Jun und Fos ein anderes Protein aus dem Komplex verdrängen. Die Bande b in Abb. 25, die mit 1  $\mu$ l NF- $\kappa$ B auftrat, ist vermutlich ein Proteinkomplex, der ein 42 kD Abbauprodukt des 50 kD Protein enthält (P. Baeuerle, persönliche Mitteilung). Dies würde bedeuten, daß ein Verlust von 8 bzw. 2 $\times$ 8 kD das Laufverhalten des Proteinkomplexes ändert. Vermutlich besteht daher der Komplex am HIV-1-URE aus mehreren Untereinheiten und NF- $\kappa$ B interagiert gleichzeitig immer nur mit cJun oder cFos, was zu einer Verdrängung einer anderen Untereinheit des Proteinkomplexes führt.

Durch die Interaktion mit  $\nu$ Jun oder  $\nu$ Fos erhöht sich die DNA-Bindeaffinität des Proteinkomplexes. Es ist zur Zeit nicht bekannt, ob dazu direkter Kontakt von cJun oder cFos mit der DNA nötig ist. HeLa Kernextrakte, gereinigtes NF- $\kappa$ B aus HeLa oder anderen Zellen und die gereinigte 50 kD Untereinheit ergaben alle das gleiche Methylierungs-Interferenz-Muster am HIV-1-URE (Baeuerle und Baltimore, 1989; Kawakami et al., 1988; Lenardo et al., 1988). Durch Methylierungs-Interferenz erhält man Informationen über die Kontaktstellen von Proteinen mit der DNA. Da offenbar in allen hier untersuchten Fällen die DNA-Bindedomänen der Komplexe identisch sind, spricht dies für eine Interaktion zwischen cJun und cFos mit NF- $\kappa$ B ohne direkten Kontakt mit der DNA, oder müßte

Proteinkinasen, die nicht H7 sensitiv sind, oder es kommt erst bei höheren Konzentrationen von H7 zu einer vollständigen Blockierung aller Proteinkinasen.

Die Proteinkomplexe an den *c-jun*- und Fibronectin-Enhancern unterschieden sich vom Collagenase-Enhancer weiterhin dadurch, daß in ihnen zwar kein cJun, aber cFos nachweisbar ist. Antikörper gegen vJun, die aufgrund der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auch mit cJun (Abb. 16), JunB und JunD (P. Angel, persönliche Mitteilung) interagieren, blockieren die Bindung von Proteinen nur am Collagenase-URE effektiv (Abb. 20A). In den Proteinkomplexen an den *c-jun*- und Fibronectin-Enhancern lassen sich höchstens kleine Mengen von cJun nachweisen. Diese Proteinkomplexe müssen jedoch auch cFos oder ein immunologisch ähnliches Protein enthalten, da Fos-Antikörper die Komplexbildung am Collagenase-, *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer blockieren (Abb. 20B). Der Effekt der Antikörper ist spezifisch, weil die Bindung von Proteinen an eine nicht-verwandte Sequenz aus dem SV40 "origin" der Replikation unbeeinflusst bleibt und Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen keinen Effekt zeigt. Die Fos-Antikörper blockieren die Bindung von Proteinen an die *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer schlechter als am Collagenase-Enhancer. Dies könnte bedeuten, daß an diese Sequenzen neben einem Heterodimer mit Fos auch noch ein anderer Faktorkomplex bindet, der kein Fos enthält (z.B. ein Homodimer), oder daß die Menge an Antikörpern nicht ausgereicht hat, um alle Proteinkomplexe abzufangen. Über die zellulären Mengenverhältnisse, der an die Enhancer-Sequenzen bindenden Faktoren, ist nichts bekannt. Die Bindungsstärke in Extrakten aus unbehandelten Zellen ist aber an den *c-jun*- und Fibronectin-Enhancern größer als am Collagenase-Enhancer, was bedeuten könnte, daß die Zelle auch mehr von diesen Faktoren hat, und dadurch auch größere Antikörper-Mengen für eine vollständige Blockierung der Bindung nötig sind. Aufgrund der Kreuzreaktion der vJun-Antikörper mit JunB und JunD kann man ausschließen, daß diese Proteine an die *c-jun*-UREs binden. Dafür spricht auch, daß JunB den *c-jun* Promoter in F9 Teratokarzinoma-Zellen nicht *trans*-aktiviert (Chiu et al., 1989).

Das Fibronectin-CRE entspricht in seiner Sequenz einer Bindestelle für den Transkriptionsfaktor CREB, der aus PC12 Zellen und Ratten-Gehirn isoliert und gereinigt wurde (Montminy und Bilezikjian, 1987; Yamamoto et al., 1988). Es gibt eine Familie von CREB-verwandten Proteinen, zu der beispielsweise ATF (Hai et al., 1988; Hai et al., 1989) und CRE-BP1 (Maekawa et al., 1989) gehören. Es ist bis jetzt nicht gezeigt, ob der Faktor, der in HeLa Zellen an das Fibronectin-CRE bindet, identisch mit dem von Montminy und Bilezikjian (1987) und Yamamoto et al. (1988) isolierten CREB ist. CREB bindet als Dimer an DNA und hat wie cJun und cFos eine Leucin-Zipper-Struktur (Gonzalez und Montminy, 1989; Hoeffler et al., 1988; Montminy und Bilezikjian, 1987; Yamamoto et al., 1988). *In vitro* translatiertes CREB (von einer Ratten CREB-cDNA; Gonzalez und Montminy, 1989) soll mit Fos kein Heterodimer bilden können (Dwarki et al., 1990). Es ist daher

Komplex am Collagenase-URE (Abb. 12B). Dies bedeutet, daß die *c-jun*-UREs zwar cJun/cFos binden können, aber eine viel höhere Affinität für ihren eigenen Faktor haben und daher die Proteinkomplexe an den *c-jun*-UREs zumindest zum größten Teil nicht aus cJun/cFos-Heterodimeren bestehen können. Dies konnte auch durch einen Vergleich der Bindung von bakteriell exprimierten cJun/vFos an die Collagenase- und *c-jun*-UREs gezeigt werden (Abb. 15). Das Collagenase-URE hat die größte Affinität für cJun/vFos. Die *c-jun*-UREs sind aber nicht nur schwach-affine cJun/vFos-Bindestellen, sondern binden, wie die Kompetitions-Experimente gezeigt haben, andere Faktoren. Ein minimales *c-jun*-Promoter-Konstrukt, das nur noch das 1. *c-jun*-URE enthält, läßt sich zwar durch cJun *trans*-aktivieren, aber nur wenn man große Mengen an cJun in der Zelle überexprimiert (Angel et al., 1988b).

Bei der Verarmung von Extrakten über DNA-Affinitätssäulen gelten ähnliche Bedingungen wie bei den Kompetitionen um Bindung. Die Bindesequenzen sind immer in einem großen Überschuß gegenüber den jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Der Unterschied gegenüber den Kompetitions-Experimenten ist, daß die Extrakte dreimal über die DNA-Affinitätssäulen gegeben wurden. Das heißt, bei jedem Verarmungsschritt werden die Proteine, die an die Säule gebunden haben, aus dem Extrakt entfernt. Somit verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Protein. Beim ersten Schritt der Verarmung über die Collagenase-URE-Säule werden nur die Proteine herausgefangen, die mit höchster Affinität an diese Sequenz binden, d.h. cJun/cFos-Heterodimere. Etwa 70% der cJun/cFos-Menge einer Zelle wird bei diesem ersten Schritt herausgefangen, aber nur knapp 20 % der Faktoren, die an das proximale 1. *c-jun*-URE binden (Daten nicht gezeigt). Die nächsten zwei Schritte verarmen die Zelle noch einmal um etwa 25% der gesamten cJun/cFos-Menge. Beim zweiten und dritten Verarmungsschritt werden aber auch zum Teil schon die Proteine herausgefangen, die nur mit niedriger Affinität an das Collagenase-URE binden. Dies erklärt, warum eine dreimalige Verarmung von Extrakten über die Collagenase-URE-Säule die Bindung am 1. *c-jun*-URE auf ~35% erniedrigt, während in Kompetitions-Experimenten bei 500 fachen Überschüssen des Collagenase-UREs kaum Erniedrigung der Bindung am *c-jun*-URE zu sehen ist (vergl. Abb. 12C mit Abb. 17). Ein prinzipieller Unterschied bei der Verarmung über Affinitätssäulen ist auch, daß die URE-Bindesequenzen hier als Multimere vorliegen. Es ist möglich, daß ein Faktor an multimeren UREs besser bindet als an Monomere.

Das distale 2. *c-jun*-URE hat sich in Kompetitions-Experimenten ähnlich wie das 1. *c-jun*-URE verhalten. Verarmung von Extrakten über die *jun1*-URE-Säule reduziert die Bindung am 2. *c-jun*-URE aber nur auf 20%, dagegen am 1. *c-jun*-URE auf 7%. Ebenso wurde festgestellt, daß Extrakte, die über die Collagenase-URE-Säule verarmt wurden, eine auf nur ~85% reduzierte Bindung aufweisen (~35% beim 1. *c-jun*-URE). Offenbar sind die

Ausgangspunkt für meine Untersuchungen war, daß cFos und cJun nicht nur für die transkriptionelle Aktivierung des Collagenase Gens nötig sind (Kapitel 6), sondern auch von HIV-1 CAT-Konstrukten, die eine NF- $\kappa$ B-Bindestelle besitzen. Während Überexpression von cJun und cFos in HeLa, NIH 3T3 und T47D Zellen den HIV-1 Enhancer *trans*-aktiviert (Tabelle 2), führt eine Verarmung der Zelle an cJun und cFos durch Kotransfektion von "antisense"-*fos* oder *-jun* Sequenzen zur Reduktion der Enhancer-Aktivität (Tabelle 4). Dies bedeutet, daß für die transkriptionelle Aktivität des HIV-1-Enhancers cJun und cFos nötig sind, eine zum Collagenase-Enhancer vergleichbare Situation. Von Arenzana-Seisdedos et al. (1989) wurde gezeigt, daß Überexpression von Ras-Onkoprotein ebenfalls den HIV-1-Enhancer aktiviert. Da Ras auch die *c-fos* Expression erhöht (Schönthal et al., 1988), könnte die dort beschriebene *Trans*-Aktivierung durch Ras auch indirekt über cFos verlaufen. Die Aktivierung des HIV-1-Enhancers über die NF- $\kappa$ B-Bindestelle durch Überexpression von cJun und cFos kann durch die Aktivierung eines Proteins vermittelt werden, das dann wiederum NF- $\kappa$ B aktiviert oder durch eine direkte Interaktion zwischen NF- $\kappa$ B und cJun und/oder cFos.

Eine direkte Interaktion von NF- $\kappa$ B mit cJun und cFos konnte durch Analysen des Transkriptionsfaktor-Komplexes am HIV-1-URE nachgewiesen werden. Hohe Überschüsse an Collagenase-URE-Bindesequenzen verarmen Extrakte an cJun und cFos, was sich in "Bandshift"-Analysen in einer reduzierten Bindung am HIV-1-URE bemerkbar macht (Abb. 23). Diese indirekte Konkurrenz kann nicht auf unspezifischer Bindung von NF- $\kappa$ B an DNA-Sequenzen in großem Überschuß beruhen, da Oligonukleotide mit mutierten AP-1-Bindestellen, nicht kompetieren können. In umgekehrter Weise kann aber ein hoher Überschuß an HIV-1-URE die Bindung von AP-1 am Collagenase-URE nicht beeinflussen. Dies erklärt sich dadurch, daß die Zelle viel weniger NF- $\kappa$ B-Moleküle als AP-1-Moleküle hat, und deshalb ein Verarmung von Extrakten an NF- $\kappa$ B die Gesamtmenge an cJun und cFos nur wenig reduziert.

Antikörper gegen Fos lieferten weitere Beweise für eine direkte Interaktion von NF- $\kappa$ B mit Fos. Monoklonale Maus-Antikörper gegen ein Peptid aus dem Amino-Terminus von cFos (Fos-Antikörper 411 in Abb. 24) blockieren die Bindung von Proteinen an das HIV-1-URE. Da die gleichen Antikörper die Proteinbindung an eine nicht-verwandte Sequenz (SV40) nicht beeinflussen, kann Degradation der Kernextrakte durch die Antikörper ausgeschlossen werden. Auch andere Antikörper gegen Fos (Fos-Antikörper 262) hemmen die Komplexbildung am HIV-1-URE, wenn HeLa Kernextrakte mit Hilfe dieser Antikörper an cFos und cJun/cFos-Heterodimeren verarmt wurden (Daten nicht gezeigt). Da die hier getesteten Antikörper gegen verschiedene Regionen des cFos gerichtet sind, ist es wahrscheinlich, daß cFos und nicht ein Fos-verwandtes Protein, das nur ein gewissen Bereichen Aminosäure-Homologie aufweist, mit NF- $\kappa$ B interagiert. Jun-Antikörper ver-

Phorbolster erhöhen, aber nur das Fibronectin-CRE vermittelt Induktion durch Forskolin (Abb. 21). Obwohl also die *c-jun*-UREs in ihrer Sequenz sehr ähnlich dem Fibronectin-CRE sind, stellen sie keine funktionellen CREs dar, woraus man folgern kann, daß sie auch verschiedene Faktoren binden. Weiterhin interagiert das E1A-Onkogen-Produkt mit den Faktoren am Collagenase- und am 1. *c-jun*-URE auf verschiedene Weise. E1A hemmt die basale und Phorbolster-induzierte Aktivität von Promoter-Konstrukten mit dem Collagenase-URE, läßt dagegen die basale und Phorbolster-induzierte Aktivität des 1. *c-jun*-URE unbeeinflusst (van Dam et al., 1990). Gene mit CRE-Sequenzen in ihrer Promoterregion werden dagegen synergistisch durch E1A und cAMP aktiviert (Engel et al., 1988; Lee und Green, 1987; Leza und Hearing, 1988).

Behandlung von Zellen mit dem Proteinkinase-Hemmstoff H7 reduziert sowohl die basale als auch Phorbolster-induzierte Bindung am Collagenase- und an den *c-jun*-UREs, auch bei blockierter Proteinsynthese (Abb. 19A). Dies spricht dafür, daß diese Faktoren nur in einem phosphorylierten Zustand an die DNA binden können, und daß diese Modifikationen durch H7-sensitive Proteinkinasen ohne zwischengeschaltete Proteinsynthese verursacht werden. H7 kann daher keinen Einfluß auf die Synthese der entsprechenden Transkriptionsfaktoren haben. Die Effekte von H7 sind schon nach vierstündiger Blockierung von Proteinkinasen zu sehen, eine vierstündige Blockierung der Proteinsynthese hat dagegen noch keinen Einfluß auf die Faktorbindung an die UREs.

Die Bindung von Faktoren am Fibronectin-CRE wird aber durch H7 nicht beeinflußt. Dies kann nicht bedeuten, daß dieser Proteinkomplex nur in einem nicht-phosphorylierten Zustand bindet, da Dephosphorylierung von Extrakten *in-vitro* mit einer Alkalischen Phosphatase die Bindung von Proteinen an das Fibronectin-CRE völlig verhindert (Abb. 19B). H7 kann offenbar die Proteinkinase, die für die Phosphorylierung des Faktors am Fibronectin-CRE verantwortlich ist, nicht blockieren. Die Phosphatase-Behandlung von Extrakten hat aber keinen Einfluß auf die Bindungsstärke am Collagenase- und an den *c-jun*-UREs. Die Proteine am Collagenase-URE wandern jedoch nach Dephosphorylierung langsamer (Abb. 19B). Dies könnte auf Verlust von negativer Ladung durch Entfernen von Phosphat-Gruppen beruhen. Die Faktoren am Collagenase-, *c-jun*- und Fibronectin-Enhancer unterscheiden sich somit in ihrer Sensitivität gegenüber H7-blockierbaren Proteinkinasen *in-vivo* und Zugänglichkeit zu Phosphatasen *in-vitro*.

Die Phorbolster-induzierte Bindungserhöhung an den Enhancern der drei Gene wird durch H7 nicht blockiert. Zumindest Neusynthese von cFos in Anwesenheit von H7 kann ausgeschlossen werden, da für die *c-fos* Expression gezeigt wurde, daß H7 die Aktivierung durch UV und Phorbolster blockiert (Büscher et al., 1988). Über die Effekte von H7 auf die *c-jun* Expression ist nichts bekannt. Möglicherweise aktivieren Phorbolster noch andere

bedeuten, daß die gereinigte 50 kD Untereinheit ein Heterodimer aus NF- $\kappa$ B mit cJun oder cFos ist.

Da von den hier verwendeten bakteriellen Jun- und Fos-Proteinen keine Mutanten in der DNA-Bindedomäne existieren, war es nicht möglich zu testen, ob z.B. Mutanten im Leucin-Zipper nicht mehr mit NF- $\kappa$ B interagieren. Es war aber möglich, den Effekt verschiedener Jun-Mutanten in der *Trans*-Aktivierung des HIV-1-Enhancers zu testen. Zunächst wurde die *Trans*-Aktivierung mit viralen und zellulären Proteinen verglichen. Das virale Jun unterscheidet sich zwar in einigen Bereichen von dem zellulären Jun (Angel et al., 1989; Bos et al., 1989; Vogt und Bos, 1990), dennoch wurden keine signifikanten Unterschiede in der *Trans*-Aktivierung des HIV-1 (wie auch des Collagenase) Enhancers gefunden (Tabelle 2, 3). cJun- oder vJun-Mutanten ohne *Trans*-Aktivierungsdomäne aber mit intakter DNA-Bindedomäne zeigen statt einer Aktivierung des HIV-1-Enhancers eine Hemmung (RSV v-jun $\Delta$ 1-119 in Tabelle 3). Diese Hemmung ist zwar nur rund zweifach, wurde aber in mehreren unabhängigen Experimenten beobachtet. Dies läßt den Schluß zu, daß diese Mutanten zwar noch mit NF- $\kappa$ B interagieren, da der Leucin-Zipper vorhanden ist, die entstehenden Heterodimere aber transkriptionell nicht aktiv sind, da die *Trans*-Aktivierungsdomäne von Jun fehlt. Dies bedeutet, daß für die NF- $\kappa$ B vermittelte HIV-1-Enhancer-Aktivität diese Domäne von Jun unbedingt nötig ist. Heterodimere aus der Mutante ohne *Trans*-Aktivierungsdomäne und dem Wildtyp-vJun zeigen aber noch 50% der transkriptionellen Aktivierung des Collagenase-UREs (Angel et al., 1989). Jun-Mutanten ohne DNA-Bindedomäne können weder den HIV-1-Enhancer noch den Collagenase-Enhancer aktivieren (RSV v-jun $\Delta$ 121-287 in Tabelle 3), was zeigt, daß die Interaktion von Jun mit NF- $\kappa$ B über die DNA-Binderegion, vermutlich also den Leucin-Zipper, verläuft.

Für weitere Charakterisierungen des Transkriptionsfaktor-Komplexes am HIV-1-URE sind daher Jun- und Fos-Proteine mit Mutationen in verschiedenen Regionen nötig, damit man deren Interaktion mit NF- $\kappa$ B in "Bandshift"-Analysen und in "*in-vitro*"-Transkriptionen testen kann.

### **EPIF als Zwischenstufe in der UV-induzierten Signalkette**

Der Signaltransfer in der UV-vermittelten Genexpression ist schnell und zum größten Teil nicht von Proteinsynthese abhängig. NF- $\kappa$ B wird nach UV-Bestrahlung der Zelle im Cytoplasma von einem Inhibitor losgelöst, ein Aktivierungsmechanismus wie auch nach Phorbolster-Behandlung der Zellen. Die Signalkette vom DNA-Schaden im Zellkern muß daher über das Cytoplasma verlaufen. cJun und cFos sind dagegen ausschließlich im Zellkern lokalisiert, obwohl natürlich ihre Synthese auch im Cytoplasma erfolgt. Ob die

Signalkette in der UV-Antwort für ihre Aktivierung auch über das Cytoplasma verläuft, ist noch ungeklärt.

Für die biologische Relevanz der hier beschriebenen Experimente stellte sich die Frage, ob die hier angewendeten UV-Dosen überhaupt in der Natur auftreten. Die Aktivierung von HIV-1 und anderer Gene kann nur durch den UV-Anteil des Sonnenlichts erfolgen. Eine UV-Dosis, die in der Zellkultur zu einer halb-maximalen Aktivierung von Genen führt ( $10 \text{ J/m}^2$  in Abb. 2), wird nach längerer Sonnenbestrahlung an der Hautoberfläche erreicht [z. B. nach 40 minütiger Sonnenbestrahlung zur Mittagszeit im September in Dallas, Texas (Harm, 1979), oder nach 25 minütiger Sonnenbestrahlung zur Mittagszeit im Juli in 2300 m Meereshöhe (Klocker et al., 1984)]. Von dieser UV-Dosis erreichen etwa 5% die lebenden Zellschichten der Epidermis (Bruls et al., 1984). Diese Werte sind allerdings nur Anhaltspunkte und variieren mit der Bräunung der Haut und der Dicke der Keratinschicht (Longstreth, 1988). Eine 30 minütige Sonnenbestrahlung reicht aus, um ein HIV-1-CAT-Konstrukt in HeLa Zellen zu aktivieren (Valerie et al., 1988). Weiterhin wird durch die UV-Bestrahlung in der Zellkultur in den meisten Zellen die Aktivierung von Genen ausgelöst, während es *in-vivo* schon Konsequenzen haben könnte, wenn nur in wenigen Zellen die UV-Antwort ausgelöst wird.

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob nur die Gene in den Zellen der obersten Hautschichten durch UV aktiviert werden können. Latentes HIV-1 wird z.B. hauptsächlich in CD4-positiven Zellen gefunden, die zum größten Teil keiner direkten Sonnenbestrahlung ausgesetzt sind. Durch die Entdeckung eines extrazellulären Faktors (EPIF) in Medium von UV-bestrahlten Zellen (Schorpp et al., 1984) konnte gezeigt werden, daß die hier untersuchten Gene HIV-1 und Collagenase durch diesen Faktor über das gleiche *cis*-wirkende DNA-Element, über das auch UV wirkt, aktiviert werden (Abb. 26, 27). Die Aktivierung durch EPIF ist spezifisch, da nur Medium von UV-bestrahlten Zellen die Expression von HIV-1 und Collagenase erhöht, Kulturmedium von unbehandelten Zellen aber nicht. Medium von UV-bestrahlten Zellen verändert im Vergleich zu Medium von unbestrahlten Zellen das Wachstum von Zellen nicht. Promotoren ohne UREs, z.B. der *tk*-Promoter, werden durch EPIF nicht aktiviert (Abb. 26).

Da der Faktor wahrscheinlich ein Protein ist, wird er mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren. Dies wurde durch Experimente mit der Substanz Suramin bestätigt. Suramin blockiert die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren auf der Zelloberfläche, soll aber nicht in die Zelle aufgenommen werden (Betsholtz et al., 1986; Coffey Jr. et al., 1987). Die Genaktivierung durch EPIF wird durch Suramin blockiert, nicht aber die Aktivierung durch andere Agenzien wie z.B. Phorbol ester, die nicht über Wachstumsfaktor-Rezeptoren wirken. Da Suramin in einigen Zellen auch die Induktion von Genen durch UV blockiert hat, liegt der Schluß nahe, daß EPIF ein essentieller Bestandteil der Signalkette in

der UV-Induktion ist (M. Krämer, unveröffentlicht). Die Identität von EPIF ist bis jetzt unbekannt. Wahrscheinlich ist es eine Mischung aus verschiedenen Faktoren, die zelltypspezifisch Gene über die UREs aktivieren. Einer dieser Faktoren wurde als IL-1 $\alpha$  identifiziert (M. Krämer, unveröffentlicht).

Die Möglichkeit, daß HIV-1 in unbestrahlten Zellen im Körperinnern indirekt durch einen Faktor, der von UV-bestrahlten Zellen der Haut abgegeben wird, aktiviert wird, könnte bedeutsam für den natürlichen Verlauf von AIDS sein. Die biologische Bedeutung der Aktivierung anderer Gene, wie Collagenase oder *c-jun*, durch UV ist bis jetzt eine noch ungeklärte Frage. Nicht absehbar sind aber die Langzeitwirkungen in der UV-Antwort. Die Genprodukte von UV-aktivierten Genen (wie z.B. cJun oder cFos) können als Transkriptionsfaktoren wiederum andere Gene aktivieren. Um- und Abbau des extrazellulären Collagengerüsts in der Haut könnte eine Folge der Aktivierung der Collagenase sein. Amplifizierte DNA und aktivierte Retroviren können an anderer Stelle des Genoms wieder integriert werden und dort eine Vielzahl von Mutationen auslösen. EPIF kann die UV-Antwort innerhalb eines vielzelligen Organismus ausbreiten und kann auch selbst Mutationen auslösen.

UV-Bestrahlung einer Zelle bedeutet also nicht einfach, daß diese Zelle stirbt, oder daß sie den UV-Schaden repariert, sondern löst eine Vielzahl von Kurz- und Langzeitwirkungen aus, von denen in dieser Arbeit der Teil der frühen UV-Wirkungen charakterisiert wurde.

# LITERATURVERZEICHNIS

- Alwine, J. C., Kemp, D. J. und Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5350-5354.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature (London)* **332**: 166-171.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2256-2266.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**: 875-885.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739.
- Angel, P., Pötting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Schorpp, M. und Herrlich, P. (1986). Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1760-1766.
- Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Pötting, A. und Herrlich, P. (1985). *c-fos* mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle. *Cancer Cells* **3**: 315-319.
- Angel, P., Smeal, T., Meek, J. und Karin, M. (1989). Jun and v-Jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol.* **1**: 35-43.
- Arenzana-Seisdedos, F., Israël, N., Bachelier, F., Hazan, U., Alcami, J., Dautry, F. und Virelizier, J.-L. (1989). *c-Ha-ras* transfection induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription through the HIV-enhancer in human fibroblasts and astrocytes. *Oncogenes* **4**: 1359-1362.
- Auffray, C. und Rougeon, F. (1980). Purification of mouse immunoglobulin heavy chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* **107**: 303-314.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1989). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Ass. and Wiley-Interscience, 1+2.
- Aviv, H. und Leder, P. (1972). Purification of biological active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1409-1412.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988a). Activation of DNA binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF $\kappa$ B transcription factor. *Cell* **53**: 211-217.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988b). I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF $\kappa$ B transcription factor. *Science* **242**: 540-546.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1989). A 65-kD subunit of active NF- $\kappa$ B is required for inhibition of NF- $\kappa$ B by I $\kappa$ B. *Genes Dev.* **3**: 1689-1698.
- Baldwin, A. S., Jr. und Sharp, P. A. (1988). Two transcription factors, NF- $\kappa$ B and H2TF1, interact with a single regulatory sequence in the class I major histocompatibility complex promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 723-727.
- Banerji, J., Rusconi, S. und Schaffner, W. (1981). Expression of a  $\beta$ -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**: 299-308.
- Benoist, C. und Chambon, P. (1981). *In vivo* sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature (London)* **290**: 304-310.

- Berk, A. J. und Sharp, P. A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNA's by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* **12**: 721-732.
- Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.-H. und Westmark, B. (1986). Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6440-6444.
- Birboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blumberg, P. M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* **48**: 1-8.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. und Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**: 1386-1392.
- Bohmann, D. und Tjian, R. (1989). Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: Differential activity of c- and v-Jun. *Cell* **59**: 709-717.
- Böhnlein, E., Lowenthal, J. W., Siekevitz, M., Ballard, D. B., Franza, B. R. und Greene, W. C. (1988). The same inducible nuclear protein regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell* **53**: 827-836.
- Bos, T. J., Rauscher III, F. J., Curran, T. und Vogt, P. K. (1989). The carboxy terminus of the viral jun oncoproteins is required for complex formation with the cellular fos protein. *Oncogene* **4**: 123-126.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**: 521-530.
- Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappolee, D. A., Pedersen, R. A. und Werb, Z. (1989a). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* **3**: 848-859.
- Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. und Karin, M. (1989b). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature (London)* **337**: 661-663.
- Brown, P. C., Tlsty, T. D. und Schimke, R. T. (1983). Enhancement of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by treatment of mouse 3T6 cells with hydroxyurea. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1097-1107.
- Bruls, W. A. G., Slaper, H., van der Leun, J. C. und Berrens, L. (1984). Transmission of human epidermis and stratum corneum as function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photobiol.* **40**: 485-494.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988). Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**: 301-311.
- Chiu, R., Angel, P. und Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* **59**: 979-986.
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. und Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**: 541-552.
- Clark, L., Pollock, R. M. und Hay, R. T. (1988). Identification and purification of EBP1: a HeLa cell protein that binds to a region overlapping the core of the SV40 enhancer. *Genes Dev.* **2**: 991-1002.
- Cleaver, J. E. (1969). Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 428-435.
- Coffey Jr, R. J., Leof, E. B., Shipley, G. D. und Moses, H. L. (1987). Suramin inhibition of growth factor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J. Cell. Physiol.* **132**: 143-148.

- Cohen, D. R., Ferreira, P. C. P., Gentz, R., Franza Jr., B. R. und Curran, T. (1989). The product of a *fos* related gene, *fra-1*, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.* **3**: 173-184.
- Curran, T. und Franza Jr., B. R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**: 395-397.
- Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. und Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* **36**: 259-268.
- Dalgleish, A. G., Beverley, C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. und Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature (London)* **312**: 763-767.
- Dean, D. C., Blakeley, M. S., Newby, R. F., Ghazal, P., Hennighausen, L. und Bourgeois, S. (1989). Forskolin inducibility and tissue-specific expression of the fibronectin promoter. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1498-1506.
- Delegeam, A. M., Ferland, L. H. und Mellon, P. L. (1987). Tissue specific enhancer of the human glycoprotein hormone subunit gene: dependence on cyclic AMP-inducible elements. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3994-4002.
- Denhardt, D. T. (1966). A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641-646.
- Deutsch, P. J., Hoeffler, J. P., Jameson, J. L. und Habener, J. F. (1988). Cyclic AMP and phorbol ester-stimulated transcription mediated by similar DNA elements that bind distinct proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7922-7926.
- Dinter, H., Chiu, R., Imagawa, M., Karin, M. und Jones, K. A. (1987). In vitro activation of the HIV-1 enhancer in extracts from cells treated with a phorbol ester tumor promoter. *EMBO J.* **6**: 4067-4071.
- Distel, R. J., Ro, H.-S., Rosen, B. S., Groves, D. L. und Spiegelman, B. M. (1987). Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell* **49**: 835-844.
- Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S. und Rabson, A. B. (1989). Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF- $\kappa$ B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5974-5978.
- Dwarki, V. J., Montminy, M. und Verma, I. M. (1990). Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J.* **9**: 225-232.
- Dynan, W. S. und Tjian, R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature (London)* **316**: 774-778.
- Engel, D. A., Hardy, S. und Shenk, T. (1988). cAMP acts in synergy with E1A protein to activate transcription of the adenovirus early genes E4 and E1A. *Genes Dev.* **2**: 1517-1528.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**: 889-895.
- Fornace Jr., A. J., Schalch, H. und Alamo Jr., I. (1988). Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4716-4720.
- Franza Jr., B. R., Josephs, S. F., Gilman, M. Z., Ryan, W. und Clarkson, B. (1987). Characterization of cellular proteins recognizing the HIV enhancer using a microscale DNA-affinity precipitation assay. *Nature (London)* **330**: 391-395.
- Franza Jr., B. R., Rauscher III, F. J., Josephs, S. F. und Curran, T. (1988). The fos complex and fos related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* **239**: 1150-1153.
- Garcia, J. A., Wu, F. K., Mitsuyasu, R. und Gaynor, R. B. (1987). Interactions of cellular proteins in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* **6**: 3761-3770.

- Gebel, S., Stein, B., König, H., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Risse, G., Neuberg, M., Müller, R. und Herrlich, P. (1989). Two nuclear oncogene products cooperate in the formation of the transcription factor AP-1. In "Vectors as Tools for the Study of Normal and Abnormal Growth and Differentiation". (H. Lother, Ed.) Springer-Verlag, Berlin, **34**: 385-397.
- Gentz, R., Rauscher III, F. J., Abate, C. und Curran, T. (1989). Parallel association of fos and jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* **243**: 1695-1699.
- Gonzalez, G. A. und Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**: 675-680.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. und Howard, B. H. (1982a). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6777-6781.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982b). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.
- Guarente, L. (1988). UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* **52**: 303-305.
- Hager, D. A. und Burgess, R. R. (1980). Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* **109**: 76-86.
- Hai, T., Liu, F., Allegretto, E. A., Karin, M. und Green, M. R. (1988). A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev.* **2**: 1216-1226.
- Hai, T., Liu, F., Coukos, W. J. und Green, M. R. (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* **3**: 2083-2090.
- Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. und Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* **55**: 917-924.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of *E. coli*. In "DNA cloning". (D. M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford, **1**: 109-135.
- Harm, W. (1979). Relative effectiveness of the 300-320 nm spectral region of sunlight for the production of primary lethal damage in *E. coli* cells. *Mutat. Res.* **60**: 263-270.
- Harrich, D., Garcia, J., Wu, F., Mitsuyasu, R., Gonzalez, J. und Gaynor, R. (1989). Role of SP1-binding domains in in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **63**: 2585-2591.
- Harris Jr., E. D., Welgus, H. G. und Krane, S. M. (1984). Regulation of the mammalian collagenases. *Coll. Rel. Res.* **4**: 493-512.
- Hay, N., Takimoto, M. und Bishop, J. M. (1989). A FOS protein is present in a complex that binds a negative regulator of MYC. *Genes Dev.* **3**: 293-303.
- Heldin, C. und Westmark, B. (1984). Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* **37**: 9-20.
- Herr, W. und Gluzmann, Y. (1985). Duplications of a mutated simian virus enhancer restore its activity. *Nature (London)* **313**: 711-714.
- Herrlich, P., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Mallick, U., Pötting, A., Hieber, L., Lücke-Huhle, C. und Schorpp, M. (1986). The mammalian genetic stress response. *Adv. Enzyme Regul.* **25**: 485-504.
- Herrlich, P. und Ponta, H. (1989). "Nuclear" oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *TIG* **5**: 112-116.

- Herrlich, P., Ponta, H., Stein, B., Gebel, S., König, H., Schönthal, A., Büscher, M. und Rahmsdorf, H. J. (1989a). The role of fos in gene regulation. In "Molecular Mechanisms and Consequences of Activation of Hormone and Growth Factor Receptors". (M. N. Alexis und C. E. Sckeris, Ed.) Kluwer Academic Press, Dordrecht, **295**: 77-91.
- Herrlich, P., Ponta, H., Stein, B., Jonat, C., Gebel, S., König, H., Williams, R. O., Ivanow, V. und Rahmsdorf, H. J. (1989b). Transcription factors in normal and malignant cells. In "Molecular Biology of Cancer Genes". (M. Sluysers, Ed.) Ellis Howard Ltd., Amsterdam, 150-168.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. und Sasaki, Y. (1984). Isoquinoline sulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochem.* **23**: 5036-5041.
- Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mehta, F., Bravo, R. und Yaniv, M. (1989). Characterization of *junD*: a new member of the *jun* proto-oncogene family. *EMBO J.* **8**: 1433-1439.
- Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Y., Jameson, J. L. und Habener, J. F. (1988). Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* **242**: 1430-1433.
- Iguchi-Arigo, S. M. M. und Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* **3**: 612-619.
- Israël, A., Le Bail, O., Hatat, D., Piette, J., Kieran, M., Logeat, F., Wallach, D., Fellous, M. und Kourilsky, P. (1989). TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF- $\kappa$ B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* **8**: 3793-3800.
- Ivanov, V., Stein, B., Baumann, I., Dobbelaere, D. A. E., Herrlich, P. und Williams, R. O. (1989). Infection with the intracellular protozoan parasite *Theileria parva* induces constitutively high levels of NF- $\kappa$ B in bovine T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4677-4686.
- Jonat, C., Stein, B., Ponta, H., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1989). Positive and negative regulation of collagenase expression. In "Proceedings of the Matrix Metalloproteinase Conference". Destin, Florida, im Druck.
- Kadonaga, J. T. und Tjian, R. (1986). Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5889-5893.
- Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M. und Herrlich, P. (1989a). Overexpressed human metallothionein II-A gene protects CHO cells from killing by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck.
- Kaina, B., Stein, B., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1989b). An update of the mammalian UV response: gene regulation and induction of a protective function. In "DNA repair mechanism and their biological implications in mammalian cells". (M. W. Lambert et al., Ed.) Plenum Publ. Corp., New York, 149-165.
- Kaplan, J., Shope, T. C. und Peterson, W. D. (1974). Epstein-Barr virus-negative human malignant T-cell lines. *J. Exp. Med.* **139**: 1070-1076.
- Kartasova, T. und van de Putte, P. (1988). Isolation, characterization, and UV stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2195-2203.
- Kaufman, J. D., Valandra, G., Roderiquez, G., Bushar, G., Giri, C. und Norcross, M. A. (1987). Phorbol ester enhances human immunodeficiency virus-promoted gene expression and acts on a repeated 10-base-pair functional enhancer element. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3759-3766.
- Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174.
- Kawakami, K., Scheidereit, C. und Roeder, R. G. (1988). Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF- $\kappa$ B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4700-4704.

- Keller, A. D. und Maniatis, T. (1988). Identification of an inducible factor that binds to a positive regulatory element of the human  $\beta$ -interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3309-3313.
- Klocker, H., Auer, B., Burtscher, H. J., Hirsch-Kauffmann, M. und Schweiger, M. (1984). A synthetic hapten for induction of thymine-dimer-specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* **142**: 313-316.
- Koshland, D. E. (1970). The molecular basis for enzyme regulation. In "The Enzymes". (P. D. Boyer, Ed.) Academic Press, New York, **1**: 342-397.
- Kouzarides, T. und Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature (London)* **336**: 646-651.
- Kryszke, M. H., Piette, J. und Yaniv, M. (1987). Induction of a factor that binds the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature (London)* **328**: 254-256.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Landschulz, W., Johnson, P. und McKnight, S. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- Lavi, S. (1981). Carcinogen-mediated amplification of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6144-6148.
- Lee, K. A. W. und Green, M. R. (1987). A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1A-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function in vitro. *EMBO J* **6**: 1345-1353.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. und Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature (London)* **325**: 368-372.
- Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.
- Lenardo, M. J. und Baltimore, D. (1989). NF- $\kappa$ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**: 227-229.
- Lenardo, M. J., Fan, C.-M., Maniatis, T. und Baltimore, D. (1989). The involvement of NF- $\kappa$ B in  $\beta$ -interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell* **57**: 287-294.
- Lenardo, M. L., Kuang, A., Gifford, A. und Baltimore, D. (1988). NF- $\kappa$ B protein purification from bovine spleen: nucleotide stimulation and binding site specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8825-8829.
- Leung, K. und Nabel, G. J. (1988). HTLV-I transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- $\kappa$ B-like factor. *Nature (London)* **333**: 776-778.
- Leza, M. A. und Hearing, P. (1988). Cellular transcription factor binds to adenovirus early region promoters and to a cyclic AMP response element. *J. Virol.* **62**: 3003-3013.
- Lin, Y.-S. und Green, M. (1989). Similarities between prokaryotic and eukaryotic cyclic AMP-responsive promoter elements. *Nature (London)* **340**: 656-659.
- Liotta, L. A. (1986). Tumor invasion and metastases – role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* **46**: 1-7.
- Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. und Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature (London)* **284**: 67-68.
- Longstreth, J. (1988). Cutaneous malignant melanoma und ultraviolet radiation: a review. *Cancer Metastasis Rev.* **7**: 321-333.

- Lowenthal, J. W., Ballard, D. W., Böhnlein, E. und Greene, W. C. (1989). Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces proteins that bind specifically to  $\kappa$ B-like enhancer elements and regulate interleukin 2 receptor  $\alpha$ -chain gene expression in primary human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2331-2335.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lucibello, F. C., Neubergh, M., Hunter, J. B., Jenuwein, T., Schuermann, M., Wallich, R., Stein, B., Schönthal, A., Herrlich, P. und Müller, R. (1988). Transactivation of gene expression by fos protein: Involvement of a binding site for the transcription factor AP-1. *Oncogene* **3**: 43-51.
- Lücke-Huhle, C. und Herrlich, P. (1986). Gene amplification in mammalian cells after exposure to ionizing radiation and UV. In "Radiation carcinogenesis and DNA alterations". (F. J. Burns et al., Ed.) Plenum Publ. Corp., New York, 405-411.
- Lücke-Huhle, C., Mai, S. und Herrlich, P. (1989). UV-induced early-domain binding factor as the limiting component of Simian Virus 40 DNA amplification in rodent cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4812-4818.
- Luckow, B. und Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5490.
- Maekawa, T., Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Sudo, T., Yoshimura, T., Fujisawa, J.-i., Yoshida, M. und Ishii, S. (1989). Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *EMBO J.* **8**: 2023-2028.
- Mai, S., Lücke-Huhle, C., Kaina, B., Rahmsdorf, H. J., Stein, B. und Herrlich, P. (1990). Ionizing radiation induced formation of a replication origin binding complex involving the product of the cellular oncogene *c-myc*. In "UCLA symposia on molecular and cellular biology, New Series". (S. Wallace und R. Painter, Ed.) Wiley/Liss Inc., New York, im Druck.
- Mai, S., Stein, B., van den Berg, S., Kaina, B., Lücke-Huhle, C., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Kraemer, M., Gebel, S. und Herrlich, P. (1989). Mechanisms of the ultraviolet light response in mammalian cells. *J. Cell Science* **94**: 609-615.
- Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. und Vogt, P. K. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2848-2852.
- Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Yamamoto, N., Ponta, H., Wegner, R.-D. und Herrlich, P. (1982). 12-O-Tetra-decanoylphorbol-13-acetate-inducible proteins are synthesized at an increased rate in Bloom syndrome fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7886-7890.
- Maltzman, W. und Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1689-1694.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- McClure, M. O. und Weiss, R. A. (1987). In "Current topics in AIDS". (M. S. Gottlieb et al., Ed.) John Wiley & Sons, Chichester, England, **1**: 95.
- McKnight, S. und Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* **46**: 795-805.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* **12**: 7035-7056.
- Miksicek, R., Heber, A., Schmid, W., Danesch, U., Posseckert, G., Beato, M. und Schütz, G. (1986). Glucocorticoid responsiveness of the transcriptional enhancer of Moloney murine sarcoma virus. *Cell* **46**: 283-290.
- Minowada, J., Onuma, T. und Moore, G. E. (1972). Rosette forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**: 891-895.

- Miskin, R. und Ben-Ishai, R. (1981). Induction of plasminogen activator by UV light in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6236-6240.
- Montminy, M. R. und Bilezikjian, L. M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic AMP response element of the somatostatin gene. *Nature (London)* **328**: 175-178.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. und Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6682-6686.
- Muesing, M. A., Smith, D. H. und Capon, D. J. (1987). Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* **48**: 691-701.
- Müller, A. D., Verma, I. M. und Curran, T. (1985). Deletion of the gag region from FBR murine osteosarcoma virus does not affect its enhanced transforming activity. *J. Virol.* **55**: 521-526.
- Müller, R., Bravo, R., Müller, D., Kurz, C. und Renz, M. (1987). Different types of modification in *c-fos* and its associated protein p39: Modulation of DNA binding by phosphorylation. *Oncogene Res.* **2**: 19-32.
- Murphy, G., Crockett, M. I., Stephens, P. E., Smith, B. J. und Docherty, A. J. P. (1987). Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* **248**: 265-268.
- Murphy, G. und Reynolds, J. J. (1985). Progress towards understanding the resorption of connective tissues. *BioEssays* **2**: 55-60.
- Nabel, G. und Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature (London)* **326**: 711-713.
- Nakabeppu, Y. und Nathans, D. (1989). The basic region of Fos mediates specific DNA binding. *EMBO J.* **8**: 3833-3841.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. und Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell* **55**: 907-915.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature (London)* **308**: 693-698.
- Nomura, S. und Oishi, M. (1984). UV irradiation induces an activity which stimulates simian virus 40 rescue upon cell fusion. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1159-1162.
- Offringa, R., Gebel, S., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1A: repression of AP-1 activity. *Cell*, im Druck.
- Osborn, L., Kunkel, S. und Nabel, G. J. (1989). Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor  $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2336-2340.
- Picard, D. und Schaffner, W. (1984). A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin kappa gene. *Nature (London)* **307**: 80-82.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature (London)* **335**: 683-689.
- Rahmsdorf, H. J., Mallick, U., Ponta, H. und Herrlich, P. (1982). A B-lymphocyte specific high-turnover protein: constitutive expression in resting B cells and induction of synthesis in proliferating cells. *Cell* **29**: 459-468.
- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rüter, U. und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of *c-fos* mRNA expression. *Nucl. Acids Res.* **15**: 1643-1659.
- Ransone, L. J., Visvader, J., Sassone-Corsi, P. und Verma, I. M. (1989). Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. *Genes Dev.* **3**: 770-781.
- Rao, C. N. R. (1961). Ultraviolet und visible spectroscopy. *Butterworth (London)*

- Rauscher III, F. J., Cohen, D. R., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. und Franza Jr., B. R. (1988a). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**: 1010-1016.
- Rauscher III, F. J., Voullas, P. J., Franza Jr., B. R. und Curran, T. (1988b). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* **2**: 1687-1699.
- Riabowol, K. T., Vosatka, R. J., Ziff, E. B. und Lamb, N. J. (1988). Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 1670-1676.
- Rigby, P. W. J., Diekmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251.
- Risse, G., Neuberg, M., Hunter, J. B., Verrier, B. und Müller, R. (1989). The products of the Fos and Jun proto-oncogenes bind cooperatively to the AP1 recognition sequence. *Env. Health Persp.* im Druck.
- Ronai, Z. A. und Weinstein, I. B. (1988). Identification of a UV-induced *trans*-acting protein that stimulates polyomavirus DNA replication. *J. Virol.* **62**: 1057-1060.
- Rosen, C. A., Sodroski, J. G. und Haseltine, W. (1985). The location of *cis*-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* **41**: 813-823.
- Rosenstein, B. S. und Mitchell, D. L. (1987). Action spectra for the induction of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **45**: 775-780.
- Rotem, N., Axelrod, J. H. und Miskin, R. (1987). Induction of urokinase-type plasminogen activator by UV light in human fetal fibroblasts is mediated through a UV-induced secreted protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 622-631.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerno, E. und Nathans, D. (1989). *Jun-D*: A third member of the *jun* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1500-1503.
- Sakharov, V. N. und Blokhin, A. V. (1983). Effect of screening as a cause of the shift of the action spectra of ultraviolet radiation for mammalian cells. *Biophysics* **28**: 305-309.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W. W., Kamps, M. und Verma, I. M. (1988). Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* **54**: 553-560.
- Scharffetter, K., Heckmann, M., Atsushi, H., Mauch, C., Stein, B., Riethmüller, G., Ziegler-Heitbrock, H.-M. L. und Krieg, T. (1989). Synergistic effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on collagen synthesis of human skin fibroblasts *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **181**: 409-419.
- Schimke, R. T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* **37**: 705-713.
- Schlokot, U. und Gruss, P. (1986). Enhancers as control elements for tissue-specific transcription. In "Oncogenes and growth control". (P. Kahn und T. Graf, Ed.) Springer Verlag, Berlin, 226-234.
- Schönthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1988a). Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **53**: 779-787.
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. und Ponta, H. (1988b). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* **54**: 325-334.
- Schorpp, M., Kugler, W., Wagner, U. und Ryffel, G. U. (1988). Hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. *J. Mol. Biol.* **202**: 307-320.

- Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1984). UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* **37**: 861-868.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986). Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-928.
- Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *TIG* **1**: 224-230.
- Shirakawa, F., Chedid, M., Suttles, J., Pollok, B. A. und Mizel, S. B. (1989). Interleukin 1 and cyclic AMP induce  $\kappa$  immunoglobulin light-chain expression via activation of an NF- $\kappa$ B-like DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 959-964.
- Siekevitz, M., Josephs, S. F., Dukovich, M., Peffer, N., Wong-Staal, F. und Greene, W. C. (1987). Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-1. *Science* **238**: 1575-1578.
- Singh, H., Lebowitz, J. H., Baldwin Jr., A. S. und Sharp, P. A. (1988). Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* **52**: 415-423.
- Smeal, T., Angel, P., Jennifer, M. und Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun:Jun and Jun:Fos complexes. *Genes Dev.* **3**: 2091-2100.
- Stein, B., Gebel, S., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. und Ponta, H. (1990a). Different proteins bind to the phorbol ester responsive sequences in collagenase and *c-jun* promoters. In "Advances in applied biotechnology series: Gene regulation and AIDS". (T. S. Papas, Ed.) Portfolio Publ. Company, The Woodlands, Texas, **7**: 37-43.
- Stein, B., Krämer, M., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1989a). UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J. Virol.* **63**: 4540-4544.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Büscher, M., Ponta, H. und Herrlich, P. (1988). The UV induced signal transduction pathway to specific genes. In "Mechanisms and consequences of DNA damage processing". (E. Friedberg und P. Hanawalt, Ed.) Alan R. Liss Inc., New York, **557-570**.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989b). UV-induced DNA damage is an intermediate in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5169-5181.
- Stein, B., van Dam, H., Ponta, H., van der Eb, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1990b). *c-jun* gene expression is regulated by two homologous cis-acting elements which are recognized by a member of the AP-1 family, other than cJun/Fos. in Vorbereitung.
- Stricklin, G. P. und Welgus, H. G. (1983). Human skin fibroblasts collagenase inhibitors. Purification and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **258**: 12252-12258.
- Studier, F. W. und Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Togni de, P., Niman, H., Raymond, V., Sawchenko, P. und Verma, I. M. (1988). Detection of *fos* protein during osteogenesis by monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2251-2256.
- Tong-Starksen, S. E., Luciw, P. A. und Peterlin, B. M. (1987). Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6845-6849.
- Tschachler, E., Groh, V., Popovic, M., Mann, D. L., Konrad, K., Safai, B., Eron, L., Veronese, F. D., Wolff, K. und Stingl, G. (1987). Epidermal Langerhans cells - a target for HTLV-III/LAV infection. *J. Invest. Dermatol.* **88**: 233-237.
- Turner, R. und Tjian, R. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**: 1689-1694.

- Valerie, K., Delers, A., Bruck, C., Thiriart, C., Rosenberg, H., Debouck, C. und Rosenberg, M. (1988). Activation of human immunodeficiency virus type 1 by DNA damage in human cells. *Nature (London)* **333**: 78-81.
- van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. und Verma, I. M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and *c-fos* (mouse) gene reveals that viral and cellular *fos* gene products have different carboxy termini. *Cell* **32**: 1241-1255.
- van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1990). Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *EMBO J.*, eingereicht.
- Verrier, B., Müller, D., Bravo, R. und Müller, R. (1986). Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the *c-fos* proto-oncogene. *EMBO J.* **5**: 913-917.
- Vogt, P. K. und Bos, T. J. (1990). Jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.*, im Druck.
- Weiber, H., König, M. und Gruss, P. (1983). Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. *Science* **219**: 626-631.
- Woolley, D. E. (1984). Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **3**: 361-372.
- Wu, F. K., Garcia, J. A., Harrich, D. und Gaynor, R. B. (1988a). Purification of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer and TAR binding proteins EBP-1 and UBP-1. *EMBO J.* **7**: 2117-2129.
- Wu, F., Garcia, J., Mitsuyasu, R. und Gaynor, R. (1988b). Alterations in binding characteristics of the human immunodeficiency virus enhancer factor. *J. Virol.* **62**: 218-225.
- Wulff, D. L. (1963). Kinetics of thymine photodimerization in DNA. *Biophys. J.* **3**: 355-362.
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H. und Montminy, M. R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature (London)* **334**: 494-498.
- Yano, O., Kanellopoulos, J., Kieran, M., LeBail, O., Israel, A. und Kourilsky, P. (1987). Purification of KBF1, a common factor binding to both H-2 and  $\beta$ 2-microglobulin enhancers. *EMBO J.* **6**: 3317-3324.
- Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R., Schuermann, M., Müller, R. und Bravo, R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, *fos B*, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* **8**: 805-813.
- Zölzer, F. und Kiefer, J. (1984). Wavelength dependence of inactivation and mutation induction to 6-thioguanine-resistance in V79 chinese hamster fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **40**: 49-53.